



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

LABORATORIO DE ETNOBOTÁNICA

**COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
TÓXICA DE ACEITES ESENCIALES DE SEIS ESPECIES
MEDICINALES DE LAMIACEAE EN EL ESTADO DE HIDALGO**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

JUDITH CAROLINA TOVAR HERNÁNDEZ

DIRECCIÓN DE TESIS

M. en C. MIGUEL ÁNGEL VILLAVICENCIO NIETO

QUIM. BLANCA ESTELA PÉREZ ESCANDÓN

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2007

Te quiero dijiste.

*Te quiero dijiste, tomando mis manos entre tus
manitas de blanco marfil. Y sentí en mi pecho un
fuerte latido, después un suspiro y luego el chasquido de
un beso febril.*

*Muñequita linda de cabellos de oro, de dientes de
perla, labios de rubí, dime si me quieres como yo te
adoro, si de mi te acuerdas como yo de ti.*

*Ya veces escucho un eco divino que envuelto en la
risa parece decir:*

*Si te quiero mucho, mucho, mucho, mucho, tanto
como entonces, siempre hasta el morir.*

A mi mami Caro...

Agradecimientos.

Le doy gracias a Dios por brindarme la oportunidad de cumplir una mas de mis metas en la vida.

Gracias a mi mami Caro por que donde quiera que este yo se que me sigue cuidando y queriendo tanto como yo la quise, así como, por enseñarme a amar la vida y todas las cosas hermosas que esta tiene, por enseñarme amarla y a lograr todas mis metas y mis sueños. Gracias mamita linda te quiero.

A mis hijos, Jarith y Gael por ser la luz y felicidad de mi vida, por ser la fuerza vital de mi existencia, que siempre me acompaña a donde quiera que vaya. Los adoro mis amores hermosos.

Gracias a mi mamá Magdalena Olmos, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por apoyarme en todo lo que he necesitado, por darme tus consejos, por darme la vida, por quererme. Te quiero mucho mamá. Ya vez si te mencione.

A mis hermanos Josué y Paola, quienes de alguna o de otra forma están siempre conmigo y a su forma me apoyan en todas mis cosas.

A Javier Estrada por apoyar a mi mamá en todo así como también por ayudarme aunque no quiera.

A mis tíos José, Carlos, Esther, Filiberto, Juan, Javier, Isidoro por su apoyo incondicional.

A Pablo García, por que a su manera me ha apoyado a lo largo de este tiempo, por cariño. Te quiero mucho flacuchis.

A la Quím. Blanca E. Pérez Escandón y al M. en C. Miguel A. Villavicencio Nieto por darme la oportunidad de conocerlos, así como, brindarme su ayuda al llevar acabo esta investigación y por soportarme durante todo este tiempo, también por que me ayudaron a cumplir una de mis metas. Gracias.

A la Dra. Yolanda López Vidal y al Dr. Gonzalo Castillo Rojas, de la UNAM por haberme hecho la donación de dos cepas bacterianas.

A mis amigos para que no digan que no los mencione, Nadia, Alan, Gina, Yazmín, Alejandro (Gordo), Gerardo (Chino), Jorge, y a todos los que no mencione, por ser mis cómplices de travesuras en toda la carrera.

A la Quím. Claudia Romo Gómez por facilitarme su ayuda con el CG-EM.

A la Biol. Yolanda Marmolejo Santillán por facilitarme su ayuda con el equipo de infrarrojo.

A mis sinodales por darme todas las facilidades para mi titulación.

Esta tesis se realizó con apoyo del programa anual de investigación 2006 dentro del proyecto "Evaluación de la actividad biológica de especies medicinales de Lamiaceae y Asteraceae" clave 74B.

CONTENIDO.

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	VI
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Aceites esenciales.....	4
2.2. Enfermedades infecciosas y plantas medicinales.	6
2.3. Evaluación de la toxicidad de plantas medicinales.	7
3. Antecedentes	8
3.1. Antibacterianos vegetales.	8
4. Planteamiento del problema y justificación	12
5. Objetivos	14
5.1. Objetivo general	14
5.2. Objetivos particulares.....	14
6. Método	15
6.1. Colecta u obtención de ejemplares y muestras vegetales.	15
6.2. Obtención de aceites esenciales.....	16
6.3. Composición química de los aceites esenciales	16
6.4. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales.	17
6.5. Pruebas de actividad antibacteriana de los aceites esenciales con el método de dilución en caldo.....	18
6.6. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CMI y CMB de los aceites esenciales	20

6.7. Ensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	21
6.8. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CL ₅₀	22
6.9. Separación de los aceites esenciales y actividad antibacteriana de las fracciones.....	23
6.10. Identificación del compuesto activo de los aceites esenciales	24
6.11. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL ₅₀	24
7. Resultados	25
7.1. Rendimiento de los aceites esenciales.	25
7.2. Comparación química de los aceites esenciales.....	26
7.3. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales.....	33
7.4. Pruebas de actividad antibacteriana de los aceites esenciales con el método de dilución en caldo.....	34
7.5. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CMI y CMB de los aceites esenciales.	39
7.6. Ensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	40
7.7. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CL ₅₀	41
7.8. Separación de los aceites esenciales y actividad antibacteriana de las fracciones.....	42
7.9. Identificación del compuesto activo de los aceites esenciales	44
7.10. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL ₅₀	45
8. Discusión	47
8.1. Rendimiento de los aceites esenciales.	47
8.2. Composición química de los aceites esenciales	47

8.3 Actividad antibacteriana.	50
8.4. Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	53
8.5. Identificación del compuesto activo de los aceites esenciales.	54
8.6. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL ₅₀	56
9. Conclusiones	57
10. Literatura citada	59
ANEXO I	65
ANEXO II	71
Glosario	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de monoterpenos monocíclicos cetónicos.....	26
Figura 2. Esquema de un compuesto fenólico	28
Figura 3. Esquema de un monoterpeno acíclico hidroxilado	30
Figura 4. Esquema de un monoterpeno bicíclico cetónico	31
Figura 5. Agrupación de las seis especies de Lamiaceae, de acuerdo a los componentes mayoritarios de los aceites esenciales.....	32
Figura 6. Análisis de conglomerados jerárquicos basado en la composición química de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae.	33
Figura 7. CMI y CMB en <i>S. pneumonide</i> (Gram positiva) de los aceites de <i>Hedeoma drummondli</i>	36
Figura 8. CMI y CMB en <i>S. thyphimurium</i> (Gram negativa) de los aceites de <i>Hedeoma piperitum</i>	37

Figura 9. CMI en <i>H. influenzae</i> (Gram negativa) de los aceites de <i>Salvia elegans</i> ...	37
Figura 10. CMI y CMB en <i>S. thyphimurium</i> (Gram negativa) de los aceites de <i>Salvia microphylla</i>	38
Figura 11. Análisis de conglomerados jerárquicos basado en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae.	39
Figura 12. Análisis de conglomerados jerárquicos basados en los valores inversos de CL50 en <i>A. salina</i> de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae.....	42
Figura 13. Efecto inhibitorio y bactericida en <i>S. pneumonide</i> de la fracción 2 de los aceites esenciales de <i>H. drummondii</i>	44
Figura 14. Análisis de Conglomerados jerárquicos basado en la composición química de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae y los valores inversos de CMI, CMB y CL50.	46
Figura 15. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de <i>Hedeoma drummondii</i>	71
Figura 16. Espectro de masas de mentona	72
Figura 17. Espectro de masas de pulegona	73
Figura 18. Espectro de masas de n-metil-piridona-6-acido carboxilico	74
Figura 19. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de <i>Hedeoma piperitum</i>	75
Figura 20. Espectro de masas de mentona	76
Figura 21. Espectro de masas de pulegona	77
Figura 22. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de <i>Hyptis verticillata</i>	78
Figura 23. Espectro de masas de fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil	79
Figura 24. Espectro de masas del compuesto de ciclohexano,1-metil-2,4bis(1-metiletenil)	80
Figura 25. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de <i>Mentha rotundifolia</i>	81

Figura 26. Espectro de masas de 3-decyno	82
Figura 27. Espectro de masas de fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil	83
Figura 28. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de <i>Salvia elegans</i>	84
Figura 29. Espectro de masas de linalool	85
Figura 30. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de <i>Salvia microphylla</i>	86
Figura 31. Espectro de masas de alcanfor	87
Figura 32. Espectro de masas de trans-cariofileno	88
Figura 33. Espectro de masas del compuesto de epi-biciclosesquifelandreno	89
Figura 34. Espectro UV-Vis de pulegona	90
Figura 35. Espectro de infrarrojo de pulegona extraído de <i>Hedeoma drummondii</i> ...	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes de estudios de antibacterianos vegetales.....	10
Tabla 2. Especies de plantas y lugares de colecta.....	15
Tabla 3. Rendimiento porcentual de los aceites esenciales, de seis especies de Lamiaceae.....	25
Tabla 4. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Hedeoma drummondii</i> identificados por CG-EM.....	27
Tabla 5. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Hedeoma piperitum</i> identificados por CG-EM.....	27
Tabla 6. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Hyptis verticillata</i> identificados por CG-EM	28
Tabla 7. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Mentha rotundifolia</i> identificados por CG-EM.	29
Tabla 8. Compuesto mayoritario de los aceites esenciales de <i>Salvia elegans</i> identificados por CG-EM	30
Tabla 9. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de <i>Salvia microphylla</i> identificados por CG-EM	31
Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) en µg/mL, de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae	35
Tabla 11. Porcentaje promedio de mortalidad producida en <i>Artemia salina</i> por los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae y valor promedio de cinco réplicas de la CL ₅₀ ± error estándar.....	41
Tabla 12. Actividad antibacteriana de las fracciones de los aceites esenciales de <i>H. drummondii</i>	43

1. RESUMEN

En la flora medicinal del estado de Hidalgo la familia Lamiaceae ocupa el tercer lugar en cuanto al número de especies utilizadas. Estas plantas tienen un alto contenido de aceites esenciales que pudieran ser los responsables de su efecto medicinal. Se seleccionaron seis especies de Lamiaceae, *Hedeoma drummondii* Benth., *Hedeoma piperitum* Benth., *Hyptis verticillata* Jacq., *Mentha rotundifolia* (L.) Huds., *Salvia elegans* Vahl. y *Salvia microphylla* Kunth. para realizar este estudio, con el objetivo de determinar la composición química de los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae, evaluar la actividad antibacteriana y la toxicidad de los aceites y aislar e identificar por lo menos un principio activo de la especie de mayor actividad antibacteriana. Los aceites se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a masas. La actividad antibacteriana de los aceites se evaluó con el método de dilución en caldo en *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Se determinaron ensayos para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). La toxicidad se evaluó en larvas de *Artemia salina*. La separación de los aceites esenciales se llevó a cabo en cromatografía en placa posteriormente la identificación se hizo por espectroscopía de UV-Vis e IR. Se determinó que los componentes mayoritarios de *H. drummondii* y *H. piperitum* fueron mentona y pulegona; los de *H. verticillata* y *M. rotundifolia*, fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil; el componente mayoritario de *S. elegans* fue linalool y el de *S. microphylla* alcanfor. Cuatro de los seis aceites esenciales inhibieron el crecimiento de al menos una cepa bacteriana, siendo los aceites de *H. drummondii* los más activos debido a que presentaron las CMI y CMB de 400 µg/ml en *Escherichia coli* y de 800 µg/ml en *Haemophilus influenzae*, Los aceites de *H. verticillata* y *M. rotundifolia* no presentaron actividad antibacteriana. Respecto a las pruebas de toxicidad, sólo los aceites de *H. drummondii* se consideraron tóxicos ya que presentaron una $CL_{50} \leq 100$ µg/ml en *A. salina*. Se identificó a la pulegona como uno de los principios activos de *H. drummondii*. Aparentemente la actividad biológica de estas plantas depende de la composición química, se observó que *H. drummondii* y *H. piperitum* fueron las especies que contienen mentona y pulegona, resultando las más activas en los ensayos de actividad antibacteriana y toxicidad. Los resultados obtenidos ayudan a confirmar las propiedades medicinales que tradicionalmente se atribuyen a algunas de las especies de plantas estudiadas.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas se utilizan para satisfacer casi todas las necesidades humanas, otorgan a la gente muchos beneficios, entre los predominantes están el comestible y el medicinal (Schultes and von Reis, 1997). Las plantas medicinales son aquellas especies vegetales a las que se atribuyen propiedades curativas (Bermúdez *et al.*, 2005); según la Organización Mundial de la Salud, OMS, entre el 66 y el 88% de la población humana recurre a las plantas medicinales para atender sus padecimientos y enfermedades (Akerlele *et al.*, 1991; WHO, 2002). Se calcula que en el mundo hay de 35 000 a 70 000 especies de plantas medicinales (Farnsworth and Soejarto, 1991). En México se han registrado e identificado de 3000 a 4000 de estas especies (Argueta, 1994; Huerta, 1997).

El estado de Hidalgo una de las 32 entidades federativas de México, esta ubicado en la zona centro sur del país (INEGI, 1992). En este estado, se ha reportado el uso de 461 especies de plantas medicinales, en esta categoría de uso las familias mejor representadas son Asteraceae, Leguminosae y Lamiaceae (Pérez Escandón *et al.*, 2003).

A nivel mundial la familia Lamiaceae está constituida de aproximadamente de 240 géneros y 6500 especies, (Royal Botanical Gardens, Kew, 2007). En México, Lamiaceae se encuentra en la lista de las quince familias con mayor número de especies nativas en los listados florísticos, en donde ocupa el octavo

lugar con 30 géneros, 530 especies y 64 variedades o subespecies (Villaseñor, 2003). En Hidalgo se ha reportado la presencia de 72 especies pertenecientes a esta familia (Villavicencio *et al.*, 1998), de las cuales 30 tienen uso medicinal. La mayoría se emplea para el dolor e inflamación de estómago, diarrea, disentería, tos, pulmonía, gripa y lavados vaginales, padecimientos a los que pueden estar asociadas algunas infecciones bacterianas (Pérez Escandón *et al.*, 2003). Varias de estas especies se usan y comercializan ampliamente en muchos municipios del estado, tal es el caso de los toronjiles, *Agastache mexicana* (H.B.K.) Lint & Epling ssp. *mexicana* Bye, Linares & Ramamoorthy, *A. mexicana* (H.B.K.) Lint & Epling ssp. *xolocotziana* Bye, Linares & Ramamoorthy y *Dracocephalum moldavica* L., estas especies fueron estudiadas por Cortés (2005) para comprobar la actividad biológica de las sustancias que contienen.

Otras especies son muy importantes a nivel regional, como *Hedeoma drummondii* Benth., que se usa y comercializa en forma intensa en el Valle del Mezquital; *H. piperitum* Benth., se emplea en Mineral del Chico, Mineral del Monte, Pachuca, Atotonilco el Grande, Omitlán, Huasca y Epazoyucan; *Hyptis verticillata* Jacq., la cual se usa ampliamente en la Huasteca; el uso de otras especies es más localizado como *Mentha rotundifolia* Huds. Las especies de *Salvia elegans* Valk. y *Salvia microphylla* Kunth. salvo *H. verticillata* y *M. rotundifolia*, han sido poco estudiadas.

Las especies de la familia Lamiaceae en lo general son aromáticas, característica que se debe a su contenido en aceites esenciales, es decir, sustancias con distintos atributos ecológicos (Romo, 2006), alguno de los cuales han mostrado bioactividad en pruebas *in vitro*, particularmente inhibiendo el crecimiento bacteriano. Se considera que este tipo de actividad fundamenta del uso medicinal de distintas especies de esta familia que se emplea para el tratamiento de padecimientos de posible origen infeccioso.

2.1. Aceites esenciales.

Los aceites esenciales constituyen una fracción de sustancias vegetales volátiles que se obtienen por destilación con arrastre de vapor. Son responsables del aroma de muchas plantas, tienen un papel ecológico fundamental ya que actúan como atrayentes de polinizadores y dispersores de frutos y semillas, además de que forman parte de las defensas químicas de las plantas (Harborne, 1997); tienen importancia comercial en la industria de la perfumería y de los alimentos. Algunas familias de plantas son ricas en aceites esenciales como Asteraceae, Pinaceae, Rosaceae, Rutaceae y Lamiaceae, entre otras. Estos aceites están compuestos por mezclas de monoterpenos como el geraniol, pineno y limoneno y sesquiterpenos como el farnesol y bisaboleno (Domínguez, 1979; Harborne, 1991). Uno de los procedimientos para obtener aceites esenciales es la destilación con arrastre de vapor de muestras vegetales y atracción en disolventes orgánicos insolubles en agua; el método más utilizado para analizar la

composición química de los aceites es la cromatografía de gases acoplado al espectro de masas. Otro método de separación cualitativa y cuantitativa es la cromatografía en gel de sílice (Domínguez, 1979, Harborne, 1980). La investigación de la actividad biológica de los aceites esenciales es un área muy activa, en lo general, se considera que sus componentes son moléculas bioactivas en insectos, hongos y bacterias (Cowan, 1999; Hammer *et al.*, 1999; Dorman, 2000).

Los agentes antimicrobianos afectan el crecimiento de diferentes formas y el estudio de tal acción, en relación con la curva de crecimiento, es importante para conocer su modo de acción. Se pueden observar tres clases distintas de efectos cuando se añade un agente antimicrobiano a un cultivo bacteriano en fase de crecimiento exponencial los cuales pueden ser: bacteriostático, cuando se inhibe el crecimiento pero no se produce la muerte, estos agentes son, con frecuencia, inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. La unión no es fuerte y cuando se baja la concentración del agente, éste se libera de los ribosomas y se reinicia el crecimiento. Los agentes bactericidas matan a las células, pero no produce la lisis o rotura de la célula. Los agentes bactericidas son una clase de agentes químicos que generalmente se unen fuertemente a sus dianas situadas en la célula y no se elimina por dilución. Los agentes bacteriolíticos inducen la muerte mediante la lisis de la célula, lo cual se observa como una disminución del número de células o de la turbidez después de añadir el agente.

Hacia 1975 se empezó a considerar a las cepas bacterianas resistentes a los antibióticos como un problema creciente (Mitscher, 1975), desde entonces ha emergido enfermedades virales o bacterianas como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), mientras que en otras reemergieron, por ejemplo el cólera en 1990 a 1994 reapareció en América Latina la cual afectó a más de un millón de personas (Brandling, *et al.*, 1996), otra enfermedad reemergente es la tuberculosis que resurgió en 1980 en Norteamérica, Asia y África; la neumonía, es otro ejemplo de este tipo de padecimientos, que afecta anualmente a más de 600 000 personas en el mundo (Allene, 1998).

2.2. Enfermedades infecciosas y plantas medicinales.

Las infecciones son la causa del 30% de todas las muertes que ocurren a nivel mundial (WHO, 2006), en México y en el estado de Hidalgo, diferentes tipos de infecciones respiratorias y digestivas ocupan los tres primeros lugares en la lista de los veinte principales causas de enfermedad (Secretaría de Salud, 2005). En la medicina alopática la principal forma de tratamiento de las infecciones, en particular aquellas causadas por bacterias, es el uso de antibióticos de origen microbiano, como la penicilina. Este tipo de antibióticos constituyen el grupo de medicamentos que ocupa los primeros lugares de prescripciones médicas (WHO, 2004), a pesar de lo cual las infecciones son unas de las primeras causas de enfermedad, esto se debe a que un amplio número de especies de bacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos por el uso excesivo e inadecuado de

estos medicamentos e incluso actualmente se observa el resurgimiento de enfermedades infecciosas como tuberculosis y neumonía (Alleyne, 1998).

Ante la elevada presencia de las infecciones y la ineficacia creciente de los antibióticos, se requiere contar con otro tipo de sustancias capaces de inhibir el crecimiento de un amplio contingente de cepas de bacterias (Fauci, 1998). Una alternativa para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, es el uso de plantas medicinales (Cowan, 1999) en particular, de especies aromáticas en muchas de las cuales se han comprobado sus propiedades antimicrobianas (Iwu *et al.*, 1999), pero en muchas falta la evaluación de la toxicidad.

2.3. Evaluación de la toxicidad de plantas medicinales.

Es necesario incluir la evaluación de la toxicidad de las sustancias de origen vegetal como parte de los métodos de estudio de las plantas medicinales, para contar con información acerca de la seguridad de su uso. Sin embargo, esta evaluación se ha llevado a cabo en muy pocas especies de plantas. De hecho, de las plantas existentes sólo una pequeña fracción que va del 10 al 15 %, ha sido investigada desde los puntos de vista fitoquímico, farmacológico y toxicológico (Cragg *et al.*, 1997; Holmstedt and Bruhn, 1997). Respecto a la toxicidad, Meyer *et al.* (1982), propusieron el uso de larvas de *Artemia salina* (Leach) (Crustaceae), un crustáceo pequeño de aguas salobres como organismo de pruebas preliminares de toxicidad y ha sido usado para la detección de toxinas fúngicas, metales

pesados, toxinas de cianobacterias, plaguicidas, micotoxinas, contaminantes en agua, toxinas de dinoflagelados así como en pruebas de toxicidad de extractos de plantas y otras sustancias vegetales (McLaughlin *et al.*, 1998; Awal, *et al.*, 2004). El empleo de estos crustáceos permite hacer ensayos de toxicidad rápidos, económicos y simples, además de que para la prueba no requiere condiciones asépticas, permite utilizar un gran número de organismos para la validación estadística, no requiere de equipo especializado y requiere poca cantidad de muestra (McLaughlin, *et al.* 1998). A partir de esta propuesta, *A. salina* ha sido utilizada por muchos grupos de investigación para explorar extractos de plantas, para detectar compuestos secundarios con actividad biológica relevante así como para evaluar su toxicidad (Alves *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2003; Guerrero y Guzmán, 2004).

3. ANTECEDENTES

3.1. Antibacterianos Vegetales.

Las plantas han sido utilizadas para tratar infecciones, por ejemplo, en Egipto se empleaba extracto de ajo, *Allium sativum* L., y cebolla *Allium cepa* L., como antisépticos (Sumner, 2001). Actualmente, la búsqueda de antibacterianos vegetales se lleva a cabo en diferentes continentes, principalmente en países en desarrollo. Cáceres *et al.* (1990) seleccionaron 16 especies de plantas del Caribe usadas popularmente para el tratamiento de infecciones, evaluaron la actividad

antimicrobiana de sus extractos y observaron que los de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae) resultaron con mayor actividad. En Cuba, Hernández Díaz y Rodríguez (2001), comprobaron que los extractos de dos especies de *Ocimum* (Lamiaceae) inhibieron el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas; en Brasil, Holetz *et al.* (2002), evaluaron la actividad antibacteriana de 13 especies vegetales usadas para tratar infecciones y encontraron que *Piper regnellii* (Piperaceae) fue la planta con mayor actividad en *Staphylococcus aureus*. Coelho de Souza *et al.* (2004) realizaron un estudio etnobotánico en el sur de Brasil y seleccionaron 18 de las especies de mayor uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas para evaluar su efecto antibacteriano, doce fueron activas, entre las que se encontró *Chaptalia nutans* (L.) Polak (Asteraceae). En Zapotitlán de las Salinas, Oaxaca, México, Hernández *et al.* (2003) ensayaron en cultivos de bacterias los extractos de ocho especies de plantas medicinales usadas para problemas gastrointestinales y encontraron que los de *Turnera diffusa* (Willd.) ex Schult. (Turneraceae) presentaron la actividad más elevada. Alanís *et al.* (2005) evaluaron la actividad antibacteriana de extractos de 26 especies de plantas de uso medicinal en varias regiones de México, encontraron que todos los extractos inhibieron el crecimiento de por lo menos una de las ocho cepas de bacterias de prueba. Entre los grupos de sustancias vegetales a los que se deben las propiedades antibacterianas de las plantas, se encuentran los aceites esenciales, los cuales han sido ampliamente estudiados como antibacterianos. En 1999 Hammer, *et al.* investigaron 52 especies de plantas que crecen en Australia y comprobaron que los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* L. (Graminae) y

Origanum vulgare L. (Lamiaceae) inhibieron el crecimiento de las diez cepas bacterianas incluidas en el estudio; Lis-Balchin *et al.* (1998) extrajeron aceites esenciales de *Pelargonium* (Geraniaceae) y al ensayarlos en cultivos de bacterias encontraron una fuerte inhibición del crecimiento de estos microorganismos; Al-Burtamani *et al.* (2005) comprobaron los efectos antibacterianos de los aceites esenciales de *Haplophyllum tuberculatum* (Forsskal) A. Juss. (Rutaceae), especie de Omán, uno de los Emiratos Árabes. Estos efectos también se han comprobado en plantas medicinales de Tailandia (Wannissorn *et al.*, 2005); y en *Chrysanthemum indicum* L. (Asteraceae), procedente de China (Shunying *et al.*, 2005). Al respecto, distintas especies de Lamiaceae han sido investigadas, por ejemplo, especies del género *Mentha* de Grecia (Sivropowlow, *et al.*, 1995); del género *Sideritis* del mismo país (Aligiannis *et al.*, 2001); y de *Lavandula* (Gören *et al.*, 2002); así mismo, *Ocimum basilicum* L., *Origanum vulgare* L. y *Thymus vulgaris* L. mostraron actividad antibacteriana en trece cepas (Bozin, *et al.*, 2006).

Tabla 1. Antecedentes de estudios de antibacterianos vegetales

Autor	Nombre científico	Nombre común	Tipo de extracto	Resultados
Sumner, 2001	<i>Allium sativum</i> <i>Allium cepa</i>	Ajo cebolla	No lo menciona	Antisépticos, tratamiento contra la tuberculosis y la salmonelosis
Cáceres <i>et al.</i> , 1990	<i>Mangifera indica</i>	mango	Cocimiento	Tratamiento de infecciones de <i>Candida albicans</i>
Hernández Díaz, <i>et al.</i> 2001	<i>Ocimum basilicum</i> <i>O.tenuiflorum</i>	Albahaca morada Albahaca blanca	Etanólico	Inhibieron el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Actividad
Holetz, 2002	<i>Piper regnellii</i>	Pariparoba	Etanólico	Actividad

Coelho de Souza <i>et al.</i> , 2004	<i>Chaptalia nutans</i>	Diente de león	Metanólico	antibacteriana en <i>Staphylococcus aureus</i>
Hernández, <i>et al.</i> , 2003	<i>Turnera diffusa</i>	Homo real	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>Escherichia coli</i>
Alanis, 2005	26 especies de plantas	No reporta nombre común	Aceites esenciales	Problemas gastrointestinales, activa en bacterias Gram negativas
Hammer, <i>et al.</i> , 1999	<i>Cymbopogon citratos</i>	Té limón	Aceites esenciales	Todas las especies de plantas inhibieron el crecimiento de por lo menos una cepa
Lis-Balchin, <i>et al.</i> , 1998	<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Aceites esenciales	Inhibieron el crecimiento de 10 cepas bacterianas
Al-Burtamani, <i>et al.</i> , 2005	<i>Pelargonium tuberculatum</i>	Melón	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana <i>E. coli</i>
Wannissorn, <i>et al.</i> , 2005	<i>Haplophyllum tuberculatum</i>	No reporta nombre común	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>Bacillus subtilis</i>
Shunying, 2005	<i>Zingiber cassumuna</i>	No reporta nombre común	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>Campylobacter jejuni</i>
Sivropowlow, <i>et al.</i> , 1995.	<i>Chrysanthemum indicum</i>	Crisantemo	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>E. coli</i>
Aliginnis, <i>et al.</i> , 2001	<i>Mentha pulegium</i> <i>Mentha spicata</i>	Menta poleo Hierba buena	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en Gram positivas y Gram negativas
Gören, <i>et al.</i> , 2002	<i>Sinderitis</i>	Chamorra de daute	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>S. aureus</i>
Bozin <i>et al.</i> , 2006	<i>Lavandula stoechas</i>	Cantueso	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>C. albicans</i>
	<i>Ocimum basilicum</i>	No reporta nombre común	Aceites esenciales	Actividad antibacteriana en <i>E. coli</i>
	<i>Origanum vulgare</i> <i>Thymus vulgaris</i>	Orégano Tomillo		

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Puesto que las plantas son consideradas como una fuente potencial de sustancias con actividad antibiótica (Cowan, 1999) en especial las plantas aromáticas que pueden deber su bioactividad a los aceites esenciales, sustancias a las que en general no se les atribuye toxicidad en mamíferos (Hammer *et al.*, 1999) y que la flora medicinal del estado de Hidalgo cuenta con un amplio número de especies de plantas con esas características y ante la necesidad de contar con productos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano, incluyendo el de cepas resistentes, se planteó el presente estudio para explorar el potencial antibacteriano de algunas especies de plantas que forman parte de la flora medicinal del estado, para lo cual se seleccionaron a las seis especies de Lamiaceae ya mencionadas: *Hedeoma drummondii*, *Hedeoma piperitum*, *Hyptis verticillata*, *Mentha rotundifolia*, *Salvia elegans* y *Salvia microphylla*.

En el Anexo I se resumen algunas características de estas especies, la información se presenta como ficha técnica. Se incluye el nombre científico de la especie en cuestión, nombres comunes, una breve descripción botánica, datos de distribución en Hidalgo e información acerca de los usos medicinales en el estado; cada ficha está acompañada de una fotografía. Estas especies tienen en común que se emplean en distintas regiones de Hidalgo para el tratamiento de diversos padecimientos que podrían ser de origen bacteriano, como la diarrea (Pérez Escandón *et al.*, 2003).

El estudio se planteó considerando que si estas plantas aromáticas se usan tradicionalmente para el tratamiento de problemas posiblemente infecciosos, los aceites esenciales que contienen mostrarán actividad antibacteriana en pruebas *in vitro* y no presentarán toxicidad en larvas de *Artemia salina*.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición química, actividad antibacteriana y tóxica de aceites esenciales de seis especies medicinales de Lamiaceae en el estado de Hidalgo.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la composición química de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*, *Hedeoma piperitum*, *Hyptis verticillata*, *Mentha rotundifolia*, *Salvia elegans* y *Salvia microphylla*.

Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las especies seleccionadas en cinco cepas de bacterias.

Evaluar la actividad tóxica de los aceites esenciales de las especies seleccionadas en *Artemia salina*.

Aislar e identificar por lo menos un principio activo de la especie de mayor actividad antibacteriana.

6. MÉTODO

6.1. Colecta u obtención de los ejemplares y muestras vegetales.

Se colectaron o se obtuvieron ejemplares por triplicado así como muestras para la extracción de aceites esenciales de las especies de plantas estudiadas en los sitios que se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies de plantas y lugares de colecta.

Especie	Colecta u obtención	Partes de la planta
<i>Hedeoma drummondii</i>	Tianguis de Actopan, procedente de San Andrés del mismo municipio	Parte aérea, con tallos, hojas y flores
<i>Hedeoma piperitum</i>	Colectada en bosque de <i>Juniperus</i> , en Mineral del Monte.	Planta completa
<i>Hyptis verticillata</i>	Colectada en un sitio perturbado de bosque tropical perennifolio en Huejutla	Parte aérea, con tallo, hojas y flores
<i>Mentha rotundifolia</i>	Plaza de Ixmiquilpan	Parte aérea, con tallos, hojas y flores
<i>Salvia elegans</i>	Colectada en bosque de <i>Abies</i> en Mineral del Chico	Parte aérea, con tallos, hojas y flores
<i>Salvia microphylla</i>	Colectada en bosque de <i>Quercus</i> en Mineral del Chico	Parte aérea, con tallos, hojas y flores

Los ejemplares se prensaron, secaron e identificaron por medio de claves (Rzedowski y Rzedowski, 2001), un ejemplar de cada especie se depositó en el Herbario del Área Académica de Biología de la UAEH. Las muestras vegetales para extracción, se secaron a temperatura de 24°C.

De cada especie se tomaron fotografías en vivo las cuales, se utilizaron para ilustrar las fichas técnicas de este trabajo.

6.2. Obtención de aceites esenciales.

Las muestras vegetales secas se trocearon con unas tijeras de podar y los aceites esenciales se extrajeron por destilación con arrastre de vapor (Domínguez, 1979). Las cantidades de material vegetal extraídas, dependieron del material disponible, se muestran en la Tabla 2 (apartado de resultados). El destilado se extrajo en un embudo de separación con tres porciones de éter etílico anhidro de 30 a 40 ml cada una, las tres porciones se mezclaron y se secaron con sulfato de sodio anhidro 15 y 20 g. Este material se filtró en papel Whatman 42 y el éter se evaporó hasta la eliminación del disolvente en baño María. El residuo constituido por aceites esenciales se pesó y almacenó en un vial a 4°C hasta su uso.

6.3. Composición química de los aceites esenciales.

Para conocer la composición química de los aceites esenciales, se analizaron mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM) marca Hewlett Packard, modelo 5890 serie II, ubicado en el Área Académica de Química.

Las condiciones en las que se corrieron los aceites fueron: columna capilar de 5% metil fenil silicón de 30 m de largo por 1.25 mm de diámetro interno por

0.25 μm de espesor para la fase estacionaria y como fase móvil se utilizó gas helio con flujo de 1.0 ml/min, temperatura del inyector fue de 250°C. Se empleó un gradiente de temperatura, siendo la temperatura inicial de la columna de 70°C y sostenida por dos minutos, seguida de un incremento de 10°C/min, hasta 120°C, mantenida esta última temperatura por cuatro minutos. Con una energía de ionización de 70 eV, se utilizó la técnica de ionización por impacto electrónico.

De cada muestra se obtuvo un cromatograma, una tabla con los tiempos de retención en minutos y el área bajo la curva en % de cada señal. De cada componente se obtuvo su espectro de masas y para identificarlo se comparó con los espectros de la biblioteca del equipo.

6.4. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales.

Una vez que se determinó la composición química de los aceites esenciales, los datos de tiempo de retención se sometieron a análisis de conglomerados jerárquicos con el programa SPSS 12.0, para clasificar a las especies de plantas estudiadas de acuerdo a su contenido de esas sustancias.

6.5. Pruebas de actividad antibacteriana de los aceites esenciales con el método de dilución en caldo.

Para las pruebas se utilizaron cinco cepas de bacterias, tres Gram negativas, *Escherichia coli* ATCC 53868, *Salmonella thyphimurium*, y *Haemophilus influenzae*; y dos Gram positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Streptococcus pneumoniae*. *S. thyphimurium* fue aislada en el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN; *H. influenzae* y *S. pneumoniae* se aislaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las cepas bacterianas se preservaron en tubos de cultivo con agar Mueller-Hinton inclinado a una temperatura de 4°C.

Para la preparación de los cultivos, en condiciones asépticas se tomó una asada que se sembró por estría cruzada en una caja Petri con agar Mueller-Hinton, que se incubó a 37°C durante 24 h., de este cultivo se tomaron cinco colonias con una asa microbiológica, fueron sembradas en 5 ml de caldo de soya triptica, éste se incubó en condiciones similares, luego se tomó 1 ml del tubo y se sembró en 50 ml de caldo soya triptica que también se incubó a 37°C durante 24 h., después se determinó la turbidez de los cultivos midiendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Janway 6405, la turbidez se ajustó añadiendo caldo de soya triptica estéril al patrón 0.5 correspondiente a la escala de McFarland. La escala de McFarland relaciona la turbidez de unos

patrones de sulfato bórico, que se obtienen al mezclar cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1%, con el número de bacterias presentes en la muestra (Díaz, et al. 2003). Este patrón equivale a una concentración de 1.5×10^8 ufc/ml (unidades formadoras de colonias por mililitro), a la cual el cultivo está en fase de crecimiento exponencial que es la recomendada para llevar a cabo las pruebas de actividad antibacteriana.

Por otra parte, 48 mg de aceites esenciales se mezcló con caldo de soya tripticasa previamente esterilizado, que contenía dimetil sulfóxido (DMSO) 0.05% para lograr una mejor disolución de los aceites; a partir de esta mezcla se hicieron diluciones con caldo de soya tripticasa para obtener las siguientes concentraciones de aceites esenciales: 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. De cada mezcla con la concentración de aceites esenciales correspondiente, se tomaron 3 ml que se colocaron en un tubo de ensaye al cual se le añadieron 0.2 $\mu\text{g/ml}$ del inóculo, cada tubo se consideró una réplica, preparándose tres réplicas por concentración. También se prepararon testigos por triplicado, uno negativo con caldo soya tripticasa, DMSO, inóculo y 48 mg de tetraciclina diluida en 6 ml con caldo soya tripticasa. El testigo positivo constó de caldo de soya tripticasa e inóculo.

Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 24 h., y al cabo de ese tiempo se observaron a simple vista los testigos negativos con caldo soya tripticasa, antibiótico e inóculo no presentaron turbidez, lo que se tomó como inhibición del

crecimiento bacteriano, mientras que los testigos positivos sí mostraron turbidez, lo que se tomó como ausencia de inhibición; cuando los triplicados de los tubos con aceites se observaron sin turbidez, la concentración del aceite correspondiente la más baja de la serie se consideró como la Concentración Mínima Inhibitoria, CMI.

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se tomó 0.1 ml de los tubos con las concentraciones en las cuales no hubo turbidez (crecimiento bacteriano) y se resembró por extensión en placa en cajas de Petri con agar Mueller-Hinton con tres réplicas por concentración, estas cajas fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 24 h. Posteriormente, las cajas se observaron y se realizó el conteo de colonias, si en la caja de Petri había menos de 50 colonias se consideró que no hubo crecimiento bacteriano y a la concentración correspondiente de aceites se le consideró como la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

6.6. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CMI y CMB de los aceites esenciales.

Para efectuar este análisis, los valores de CMI y CMB se transformaron en sus inversos $1/CMI$ y $1/CMB$, esto se hizo con el fin de establecer que a mayores valores inversos de CMI y CMB, mayor actividad antibacteriana. Los datos transformados se sometieron a análisis de conglomerados jerárquicos con el

programa SPSS 12.0, para clasificar a las especies de plantas estudiadas de acuerdo a esta actividad.

6.7. Ensayo de toxicidad en *Artemia salina*.

Las pruebas de toxicidad fueron llevadas a cabo usando nauplios o larvas de *A. salina*, siguiendo el método de Meyer *et al.* (1982) y McLaughlin *et al.* (1998). Los quistes de *A. salina* se adquirieron en una tienda para mascotas y para que éstos eclosionaran fueron colocados en un vaso de precipitado que contenía solución salina (NaCl) al 5%, con un pH de 7.5 y temperatura entre 28 y 30°C, con oxigenación e iluminación constantes esto último, se logró con un calentador y bomba para acuario y con un foco encendido de 75 watts cerca del vaso. En estas condiciones, los quistes eclosionaron después de 48 horas de incubación, los nauplios recién emergidos se utilizaron para cada prueba la cual se realizó de la siguiente manera. En un tubo de ensaye de 5 ml se colocaron 3 ml de las soluciones con aceites esenciales preparados previamente con la solución salina después, con una pipeta Pasteur se colocaron 10 nauplios de *Artemia* por tubo, cada tubo se consideró una réplica preparándose cinco réplicas por concentración de aceites, las cuales fueron 0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg/ml. Los testigos negativos se prepararon de la misma manera, pero a éstos no se les adicionaron los extractos. Los tubos destapados se colocaron en una gradilla la cual se colocó cerca del foco encendido durante 24 h., después a simple vista se contó el número de larvas sobrevivientes en cada tubo, el valor promedio por

concentración y se calculó el porcentaje de mortalidad con la fórmula $100 - (100B/A)$, en donde A fue el número promedio de larvas vivas en el testigo y B el número promedio de larvas vivas en el experimental con aceites. Los números de larvas vivas en cada réplica de cada concentración de aceites, fueron analizados mediante una regresión lineal Probit del Programa SPSS 12.0 para calcular la concentración letal 50 (CL_{50}), con límites de confianza de 95%. La CL_{50} es la concentración de un compuesto a la cual mueren el 50% de los individuos expuestos a ese compuesto (McLaughlin *et al.*, 1998) (por lo que a menor CL_{50} , mayor actividad), así que para los aceites de cada especie de planta se obtuvieron cinco valores de CL_{50} . Los valores de CL_{50} obtenidos en la prueba se sometieron a análisis de varianza de una vía y las medias se separaron con la prueba de rango múltiple de Duncan con una $p < 0.05$, con el Programa SPSS 12.0. Los resultados se expresaron como valores promedio de $CL_{50} \pm$ error estándar de cinco réplicas. Se consideró que los aceites esenciales produjeron toxicidad en *A. salina* cuando presentaron un valor promedio de $CL_{50} \leq 100 \mu\text{g/ml}$ (Zani *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 2000).

6.8. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CL_{50} .

Para efectuar este análisis, los valores de CL_{50} se transformaron en sus inversos $1/CL_{50}$, con el fin de establecer que a mayores valores inversos de CL_{50} mayor actividad. Los datos transformados se sometieron a análisis de

conglomerados jerárquicos con el programa SPSS 12.0, para clasificar a las especies de plantas estudiadas de acuerdo a su actividad en *A. salina*.

6.9. Separación de los aceites esenciales y actividad antibacteriana de las fracciones.

Una vez comprobada la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se seleccionaron los más activos y se procedió a fraccionarlos, para lo cual los aceites esenciales totales se aplicaron a una cromatoplaaca de silicagel F₂₅₄ de 20 x 20 cm, con espesor de capa de 2 mm, como fase móvil se usó hexano/éter etílico (1:1), después de hacer la cromatografía, la cromatoplaaca se observó bajo luz ultravioleta de longitud de onda larga y corta, apreciándose claramente las bandas o fracciones a los cuales se les midió el Rf (Rf = distancia que recorrió la fase móvil/distancia que recorrió el compuesto).

Para obtener las sustancias contenidas en las bandas o fracciones, se rasparon de la placa y se colocaron por separado en matraces Erlenmeyer, donde se les agregaron 50 ml de éter etílico, después se filtraron con papel filtro Whatman núm. 42, por último, el éter se evaporó a baño María, obteniéndose de esta forma y por separado un residuo constituido por las sustancias de cada fracción.

Una vez obtenidas las fracciones se probaron a 2000 µg/ml, en cada una de las cepas bacterianas, para observar cuál de las fracciones es la que inhibía el crecimiento bacteriano.

6.10. Identificación del compuesto activo de los aceites esenciales.

Una vez que se comprobó cual fue la fracción activa, se obtuvo el espectro de UV-Vis. El equipo usado fue de la marca Perkin Elmer en una solución con éter etílico. También se obtuvo el espectro de infrarrojo en un equipo PARAGON1000, versión 3.02 en pastilla de KBr la identificación se realizó comparando el espectro obtenido con los de la base de datos del equipo, ambos equipos están ubicados en el Área Académica de Química.

6.11. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀.

Para determinar si existe una relación entre la composición química de los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae estudiadas y la actividad reportada como los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀, los datos correspondientes se sometieron a análisis de conglomerados jerárquicos con el programa SPSS 12.0.

7. RESULTADOS.

7.1. Rendimiento de los aceites esenciales.

Al extraer los aceites esenciales de las muestras de las seis especies de Lamiaceae seleccionadas para realizar el presente estudio, se obtuvieron diferentes cantidades de estas sustancias las cuales dependieron de la especie, los resultados se presentan en la Tabla 3, en la que se observa que la especie con mayor rendimiento fue *H. piperitum* con 2%, *S. microphylla* con el 0.6% y *H. drummondii* con un rendimiento del 0.3%, *S. elegans* tuvo un rendimiento del 0.2% y por último se encuentra *H. verticillata* y *M. rotundifolia* con un rendimiento de 0.1%.

Tabla 3. Rendimiento porcentual de los aceites esenciales, de seis especies de Lamiaceae.

Especie	Cantidad de planta extraída en g	Cantidad de aceites obtenidos en g	Rendimiento de los aceites esenciales en %
<i>Hedeoma drummondii</i>	330	1.0005	0.3
<i>Hedeoma piperitum</i>	63	1.3095	2.0
<i>Hyptis verticillata</i>	666	1.02	0.1
<i>Mentha rotundifolia</i>	105.4	0.1728	0.1
<i>Salvia elegans</i>	152.5	0.3407	0.2
<i>Salvia microphylla</i>	75	0.4514	0.6

7.2. Comparación química de los aceites esenciales.

Al inyectar los aceites totales de las seis especies de plantas al cromatógrafo de gases acoplado a masas e identificar los componentes mayoritarios mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca del equipo, se obtuvieron los cromatogramas y espectro que se muestran en el Anexo II. Se encontró que los aceites esenciales de *H. drummondii* están constituidos por una mezcla de diez sustancias ya que en el cromatógrama de estos aceites (Anexo II, Figura 15) se observa igual número de señales, siendo tres las mayoritarias, con tiempos de retención de 8.33, 9.65 y 10.31 minutos. Al comparar los espectros de masas de estas tres sustancias con los de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (Anexo II, Figura 16-18), éstas se identificaron como mentona, pulegona y n-metil-piridona-6-acido carboxílico, en la Tabla 4 se presentan los tiempos de retención reportada en % área y datos espectrales de estas sustancias. La mentona y la pulegona son monoterpenos monocíclicos cetónicos (Figura 1) (Harborne, 1980; Young-Su *et al.*, 2005).

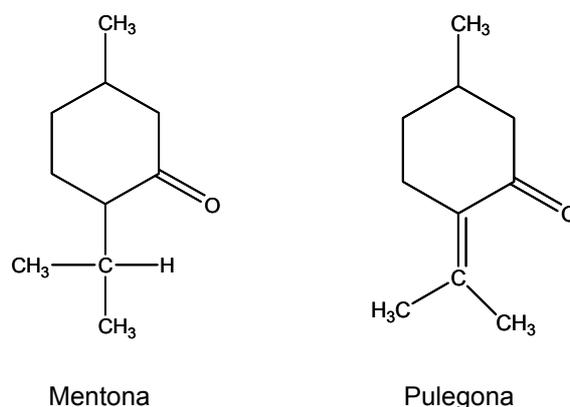


Figura1. Esquema de monoterpenos monocíclicos cetónicos

Tabla 4. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii* identificados por CG-EM.

Tiempo de Retención minutos	Área %	Datos del Espectro de Masas ^a	Compuesto
8.33	33.5	112, 69, 55, 139, 154, 97, 111, 83, 125, 156, 93, 58, 137	mentona
9.65	17.7	81, 67, 152, 109, 137, 69, 95, 53, 96, 119, 124, 150, 170	pulegona
10.31	8.6	153, 97, 55, 69, 59, 135, 111, 79, 95, 150, 125, 122	n-metil-piridona-6-ácido carboxílico

^a Iones de mayor fragmentación, el pico base es el primero de la lista, otros iones en orden decreciente de abundancia relativa.

El cromatograma de los aceites esenciales de *H. piperitum* (Anexo II, Figura 19) presentó cinco señales correspondientes a otras tantas sustancias de las cuales dos fueron mayoritarias, con tiempos de retención de 8.44 y 9.68 minutos con base en sus espectros de masas, comparadas con las de la biblioteca del equipo (Anexo II, Figura 20-21) estas sustancias fueron identificadas como mentona y pulegona respectivamente, los datos de estos componentes se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Hedeoma piperitum* identificados por CG-EM

Tiempo de Retención minutos	Área %	Datos del Espectro de Masas ^a	Compuesto
8.44	46.8	112,69,55,139,97,154,83,95,57,125,156,126	mentona
9.68	41.7	81,67,152,109,82,137,53,95,119,124,105,63	pulegona

^a Iones de mayor fragmentación, el pico base es el primero de la lista, los otros iones en orden decreciente de abundancia relativa.

El cromatograma de los aceites esenciales de *H. verticillata* (Anexo II, Figura 22) presentó dos señales, el primero según su espectro de masas comparado con la biblioteca del cromatógrafo de gases (Anexo II, Figura 23), fue un compuesto fenólico (Figura 2), (Harborne, 1980), fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil presentó un tiempo de retención de 13.48 y un área de 36.8%; el segundo (Anexo II, Figura 24) fue ciclohexano,1-metil-2,4bis(1-metiletenil)- presentó un tiempo de retención de 14.21 y un área de 21.2%. (Tabla 6).

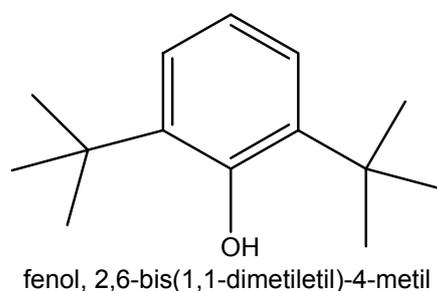


Figura 2. Esquema de un compuesto fenólico.

Tabla 6. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Hyptis verticillata* identificados por CG-EM

Tiempo de retención minutos	Área %	Datos del Espectro de Masas ^a	Compuesto
13.48	36.8	205, 57, 220, 81, 145, 177, 206, 67, 95, 121, 161, 131, 189, 51	fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil
14.21	21.2	81, 93, 107, 55, 69, 150, 22, 135, 220, 159, 177, 205, 178, 202	ciclohexano,1-metil-2,4bis(1-metiletenil)

^a Iones de mayor fragmentación, el pico base es el primero de la lista, otros iones en orden decreciente de abundancia relativa.

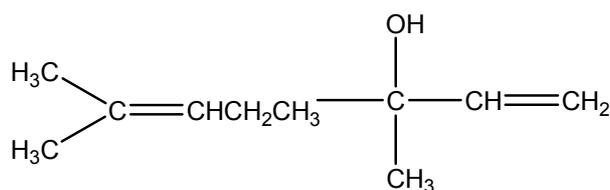
El cromatograma de los aceites esenciales de *M. rotundifolia* (Anexo II, Figura 25) mostró dos señales, según su espectro de masas comparado con la biblioteca digital del equipo, éstos se identificaron como 3-decino (Anexo II, Figura 26) y fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil (Anexo II, Figura 27); el primero tuvo un tiempo de retención de 11.37 con el 76.6% de su área y el segundo tuvo 13.49 de tiempo de retención y 23.4% de área (Tabla 7).

Tabla 7. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Mentha rotundifolia* identificados por CG-EM.

Tiempo de Retención minutos	Área %	Datos del Espectro de Masas ^a	Compuesto
11.37	76.6	67, 138, 68, 53, 166, 79, 109, 123, 95, 151, 148, 96, 120	3-decino
13.49	23.4	205, 57, 220, 81, 145, 177, 67, 95, 121, 131, 161, 189, 51, 207	fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil

^a Iones de mayor fragmentación, el pico base es el primero de la lista, otros iones en orden decreciente de abundancia relativa.

El cromatograma de los aceites esenciales de *S. elegans* (Anexo II, Figura 28) mostró 28 señales de las cuales sólo una es el compuesto mayoritario, según su espectro de masas comparado con la biblioteca del cromatógrafo de gases (Anexo II, Figura 29) el compuesto se identificó como linalool, con un tiempo de retención de 7.42 y el 16.98% de área (Tabla 8), el linalool es un monoterpeno acíclico hidroxilado (Figura 3), (Harborne, 1980; Young-Su *et al.*, 2005).



linalool

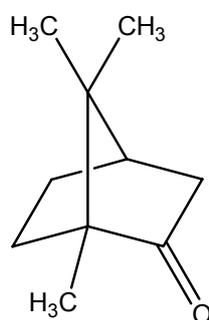
Figura 3. Esquema de un monoterpeno acíclico hidroxilado.

Tabla 8. Compuesto mayoritario de los aceites esenciales de *Salvia elegans* identificados por CG-EM

Tiempo de Retención minutos	Área %	Datos del Espectro de Masas ^a	Compuesto
7.42	16.98	71,55,93,80,121,136,96,107,57,127,154	linalool

^a Iones de mayor fragmentación, el pico base es el primero de la lista, otros iones en orden decreciente de abundancia relativa.

El cromatograma de los aceites esenciales de *S. microphylla* (Anexo II, Figura 30) presentó 35 señales, de las cuales tres fueron los compuestos mayoritarios identificados como alcanfor (Anexo II, Figura 31), un monoterpeno bicíclico cetónico (Figura 4), (Harborne, 1980; Young-Su *et al.*, 2005), trans-cariofileno (Anexo II, Figura 32) y epi-biciclosesquifelandreno (Anexo II, Figura 33) según sus espectros de masas comparados con la biblioteca del equipo, con un tiempo de retención de 8.02, 12.55 y 15.31 minutos, con el 14.8%, 7.7% y 7.15% de área (Tabla 9).



Alcanfor

Figura 4. Esquema de un monoterpeno bicíclico cetónico.

Tabla 9. Compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *Salvia microphylla* identificados por CG-EM

Tiempo de Retención minutos	Área %	Datos del Espectro de Masas ^a	Compuesto
8.02	14.8	95, 81, 69, 55, 108, 83, 152, 137, 57, 105, 119, 123	alcanfor
12.55	7.7	93, 69, 133, 79, 105, 120, 55, 161, 147, 134, 189, 204, 175, 51	trans-cariofileno
15.31	7.15	161, 204, 105, 81, 119, 95, 134, 189, 55, 69, 147, 51, 176, 207, 222	epi-biciclosesquifelandreno

^a Iones de mayor fragmentación, el pico base es el primero de la lista, otros iones en orden decreciente de abundancia relativa.

De acuerdo con sus compuestos mayoritarios, estas seis especies de Lamiaceae se pueden clasificar de la siguiente manera: las que contienen terpenoides y las que contienen compuestos fenólicos. Los constituyentes de las primeras son monoterpenos, que se subdividen en tres grupos: monocíclicos cetónicos, como mentona y pulegona (Figura 1), característicos de *Hedeoma*

drummondii y *H. piperitum*; acíclicos hidroxilados, como linalool (Figura 3), contenido en *S. elegans* y bicíclicos cetónicos, como alcanfor (Figura 4), presente en *S. microphylla*. Las especies que contienen compuestos fenólicos (Figura 2) como fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil, forman un cuarto grupo aislados de *H. verticillata* y *M. rotundifolia* (Figura 5).

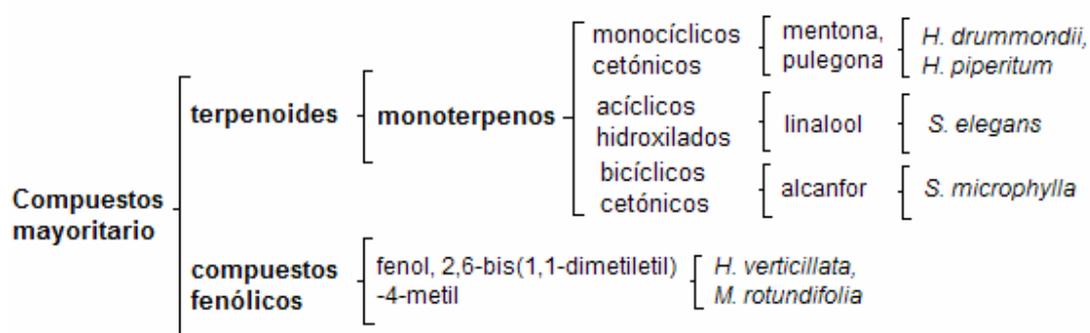


Figura 5. Agrupación de las seis especies de Lamiaceae, de acuerdo a los componentes mayoritarios de los aceites esenciales.

7.3. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales.

Al procesar los datos de tiempo de retención de los componentes mayoritarios de las seis especies de Lamiaceae, por medio del análisis de conglomerados jerárquicos en el dendograma obtenido (Figura 6), se observó la formación de cuatro grupos. El primero estuvo formado por *H. drummondii* y *H. piperitum* que se caracterizan por su contenido en mentona y pulegona; otro incluye *H. verticillata* y *M. rotundifolia* que tienen en común el compuesto fenol, 2,6- bis(1,1-dimetiletil)-4-metil; *S. elegans* y *S. microphylla* formaron, los otros dos grupos, con linalool y alcanfor, respectivamente.

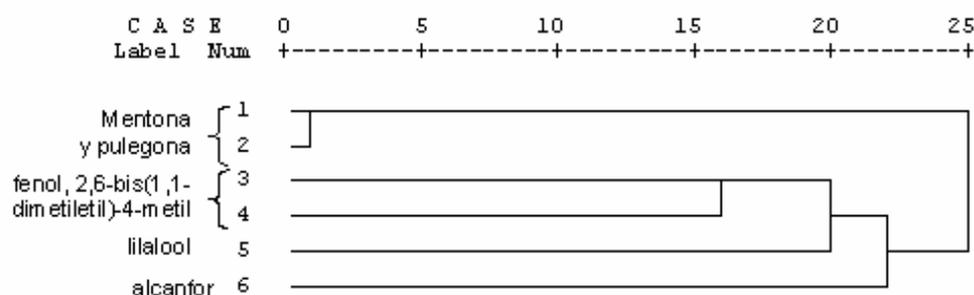


Figura 6. Análisis de conglomerados jerárquicos basado en la composición química de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae.

1. *Hedeoma drummondii*, 2. *H. piperitum*, 3. *Hyptis verticillata*, 4. *Mentha rotundifolia*, 5. *Salvia elegans*, 6. *S. microphylla*.

7.4. Pruebas de actividad antibacteriana de los aceites esenciales con el método de dilución en caldo.

Los resultados obtenidos al probar los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae seleccionadas, se presentan en la Tabla 10, en donde se observan que cuatro de los seis aceites inhibieron el crecimiento y produjeron efecto bactericida en por lo menos una de las cinco cepas bacterianas.

Los aceites esenciales de *H. drummondii* fueron los más activos ya que produjeron inhibición del crecimiento y efecto bactericida en las cinco cepas bacterianas, tanto Gram negativas, como Gram positivas, mostrando en cada caso CMI y CMB a diferentes concentraciones, en *E. coli* representó la mayor actividad de los aceites pues exhibieron una CMI a 400 µg/ml. Le siguieron en actividad antibacteriana los aceites *H. piperitum* que presentaron efecto en las tres cepas Gram negativas, la CMI de 100 µg/ml en *S. thyphimurium* fue la más baja de toda la prueba, en *E. coli* y *H. influenzae* estos aceites sólo presentaron CMI. Los aceites esenciales de *S. microphylla* mostraron actividad en dos cepas *E. coli* y *S. thyphimurium*, en la primera sólo produjo inhibición del crecimiento (CMI) pero no efecto bactericida (CMB) y los de *S. elegans* sólo presentaron CMI a 2000 µg/ml en una cepa, *H. influenzae*. Los aceites de *H. verticillata* y *M. rotundifolia* fueron inactivos. La cepa más susceptible fue *S. thyphimurium*, debido a que tres aceites esenciales presentaron CMI y CMB; siguiendo en susceptibilidad *E. coli* que también fue inhibida por tres aceites, pero en este caso dos aceites sólo

exhibieron CMI; lo mismo ocurrió con *H. influenzae*. Las cepas que resultaron más susceptibles fueron las Gram negativas. Las dos cepas Gram positivas, *S. pneumoniae* y *S. aureus*, fueron las menos susceptibles ya que sólo un aceite produjo CMI y CMB.

Tabla 10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) en $\mu\text{g/ml}$, de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae

Especie	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella thyphimurium</i>		<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Hedeoma drummondii</i>	400	1600	2000	2000	800	1600	1600	1600	1600	1600
<i>Hedeoma piperitum</i>	1600	0	100	400	2000	0	0	0	0	0
<i>Hyptis verticillata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mentha rotundifolia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salvia elegans</i>	0	0	0	0	2000	0	0	0	0	0
<i>Salvia microphylla</i>	2000	0	1600	2000	0	0	0	0	0	0

Los resultados obtenidos en la prueba de dilución en caldo con los aceites esenciales de *H. drummondii*, en *S. pneumoniae* se presentan en la Figura 7, en la que se observa ausencia de turbidez a partir del tubo con una concentración de 1600 $\mu\text{g/ml}$, por lo que a ésta se le consideró como la CMI, igualmente se observa que al sembrar muestras del testigo positivo en agar Mueller-Hinton, si hubo crecimiento del cultivo bacteriano y que al sembrar una muestra de cultivo con aceites a 1600 $\mu\text{g/ml}$, ya no se observó crecimiento en la caja de Petri, por lo que a esta misma concentración se consideró como la CMB.

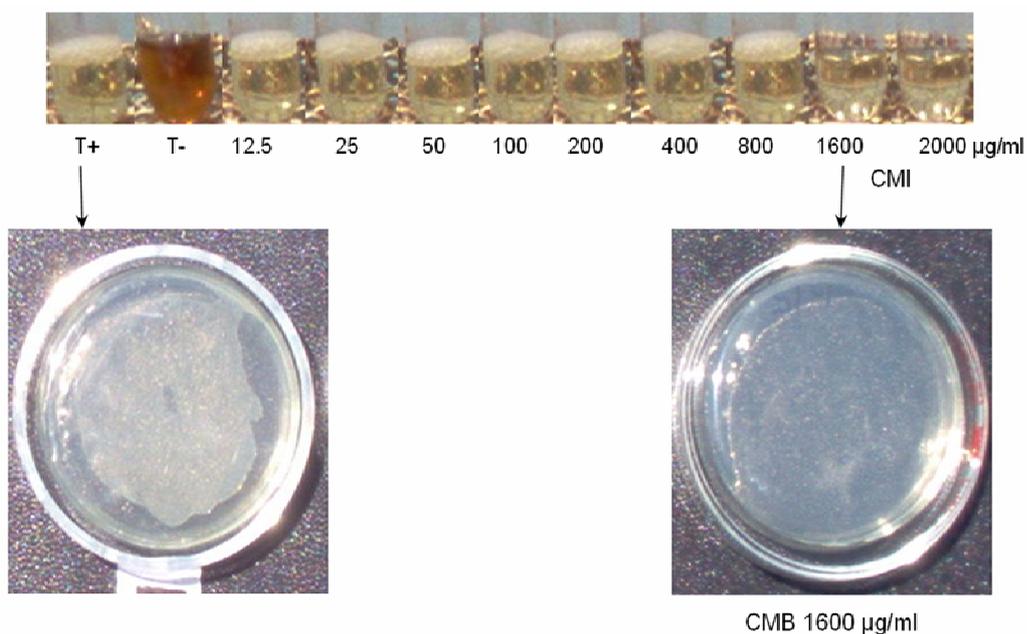


Figura 7. CMI y CMB en *S. pneumoniae* (Gram positiva) de los aceites de *Hedeoma drummondii*; T+, Testigo positivo; T-, Testigo negativo.

En la Figura 8 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de dilución en caldo con los aceites esenciales de *H. piperitum*, en *S. thyphimurium*, en la que se observa ausencia de turbidez a partir del tubo con una concentración de 100 µg/ml, por lo que a ésta se le consideró como la CMI, igualmente se observa que al sembrar muestras del testigo positivo en agar Mueller-Hinton, si hubo crecimiento de las bacterias y que al sembrar una muestra de cultivo con aceites a 400 µg/ml, ya no hubo crecimiento en la caja de Petri, por lo que a esta misma concentración se consideró como la CMB.

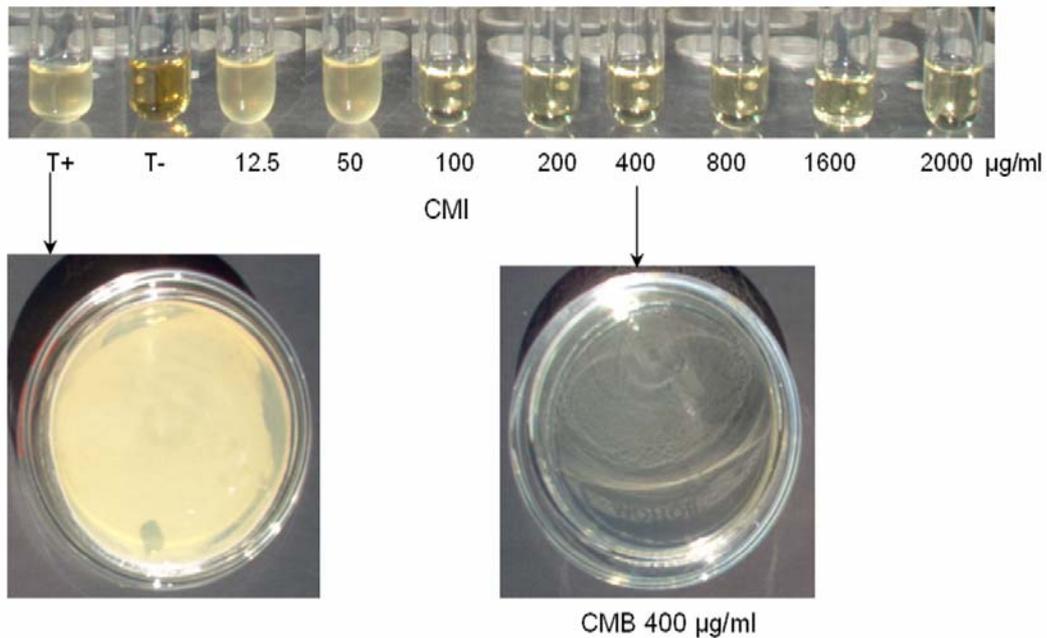


Figura 8. CMI y CMB en *S. typhimurium* (Gram negativa) de los aceites de *Hedeoma piperitum*; T+, Testigo positivo; T-, Testigo negativo.

En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de dilución en caldo con los aceites esenciales de *S. elegans*, en *H. influenzae*, se observa ausencia de turbidez a partir del tubo con una concentración de 2000 µg/ml, por lo que a ésta se le consideró como la CMI, en este resultado no hubo CMB.

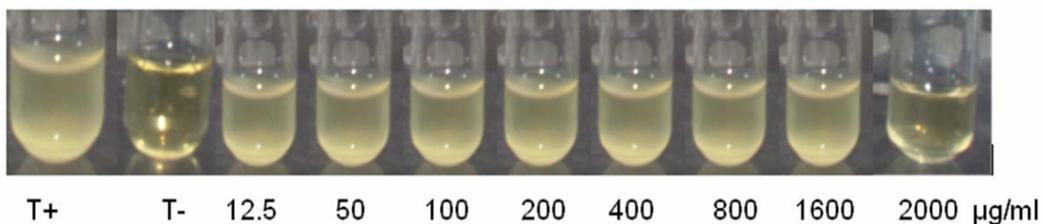


Figura 9. CMI en *H. influenzae* (Gram negativa) de los aceites de *S. elegans*; T+, Testigo positivo; T-, Testigo negativo.

En la Figura 10 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de dilución en caldo con los aceites esenciales de *S. microphylla*, en *S. thyphimurium*, en la que se observa ausencia de turbidez a partir del tubo con una concentración de 1600 $\mu\text{g/ml}$, por lo que a ésta se le consideró como la CMI, igualmente se observa que al sembrar muestras del testigo positivo en agar Mueller-Hinton, si hubo crecimiento de las bacterias y que al sembrar una muestra de cultivo con aceites a 2000 $\mu\text{g/ml}$, ya no hubo crecimiento en la caja de Petri, por lo que a esta misma concentración se le consideró como la CMB.

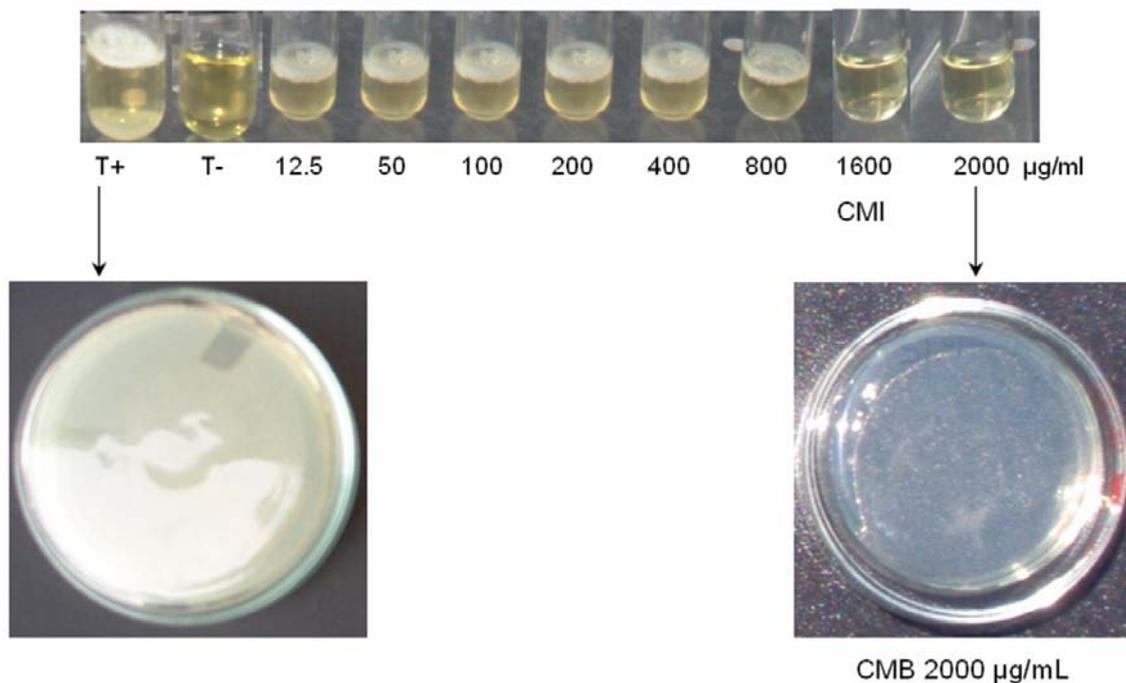


Figura 10. CMI y CMB en *S. thyphimurium* (Gram negativa) de los aceites de *Salvia microphylla*; T+, Testigo positivo; T-, Testigo negativo.

7.5. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CMI y CMB de los aceites esenciales.

Al procesar los datos de los valores inversos de CMI y CMB por medio del método de análisis de conglomerados jerárquicos, se observan tres grupos (Figura 11), el primer grupo estuvo formado por *H. drummondii* y *H. piperitum* cuyos aceites esenciales mostraron la mayor actividad antibacteriana, a éstos se les consideró como muy activos; el segundo grupo incluyó a *S. elegans* y *S. microphylla*, las dos especies que ocuparan el siguiente lugar en actividad antibacteriana por lo que a los aceites se les consideró como activos y el tercer grupo estuvo formado por *H. verticillata* y *M. rotundifolia*, las especies inactivas.

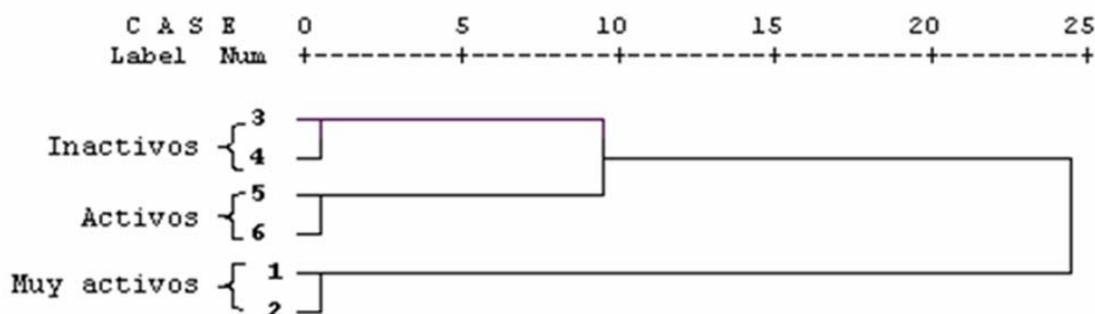


Figura 11. Análisis de conglomerados jerárquicos basado en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae.

1. *Hedeoma drummondii*, 2. *H. piperitum*, 3. *Hyptis verticillata*, 4. *Mentha rotundifolia*, 5. *Salvia elegans*, 6. *S. microphylla*.

7.6. Ensayo de toxicidad en *Artemia salina*.

Al probar los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae en nauplios o larvas de *Artemia salina*, éstos produjeron mortalidad en los organismos de prueba, la cual fue dependiente de los aceites de cada planta y de su concentración; en la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos donde se observa que los aceites de *H. drummondii* presentaron la mayor mortalidad ya que produjeron la muerte de todas las larvas expuestas a 100 y 1000 µg/ml, en consecuencia estos aceites tuvieron el valor de CL₅₀ más bajo de la prueba que fue de 34.81 µg/ml, puesto que esta CL₅₀ tuvo un valor < 100 µg/ml. Se consideró que estos aceites esenciales fueron tóxicos, de acuerdo con el criterio previamente establecido (Zani *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 2000). La CL₅₀ del resto de los aceites presentaron valores >100 µg/ml por lo que no se les consideró tóxicos. De acuerdo con el análisis de varianza empleando los valores de CL₅₀, los aceites produjeron un efecto experimental significativo en *A. salina* (ANOVA, $p < 0.01$).

Sin embargo los valores de CL₅₀ de los aceites de *H. drummondii*, *H. piperitum*, *H. verticillata* y *M. rotundifolia*, no fueron significativamente diferentes entre sí (prueba de Rango Múltiple de Duncan $p < 0.05$), a su vez, estos valores de CL₅₀ fueron significativamente diferentes de los que produjeron los aceites de las especies de *Salvia* (Tabla 11).

Tabla 11. Porcentaje promedio de mortalidad producida en *Artemia salina* por los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae y valor promedio de cinco réplicas de la $CL_{50} \pm$ error estándar.

Especie	Concentración $\mu\text{g/ml}$					Promedio de la CL_{50}	Límites de Confianza
	0.1	1	10	100	1000		
<i>Hedeoma drummondii</i>	0	0	6	100	100	34.81 ± 7.75 a	0.0 - 0.0
<i>Hedeoma piperitum</i>	0	0	0	30	100	200.11 ± 87.04 a	0.0 - 0.0
<i>Hypsis verticillata</i>	0	14	32	34	100	173.66 ± 35.9 a	0.0 - 0.0
<i>Mentha rotundifolia</i>	0	0	0	40	100	190.13 ± 87.8 a	0.0 - 0.0
<i>Salvia elegans</i>	0	8	8	20	34	1341.79 ± 123.7 b	0.0 - 0.0
<i>Salvia microphylla</i>	0	0	2	4	60	324.15 ± 132.3 b	0.0 - 0.0

En esta columna las cifras con letras iguales no difieren significativamente con la prueba de Rango Múltiple de Duncan, $p < 0.05$.

7.7. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en los valores inversos de CL_{50} .

Al procesar los datos de los valores inversos de las CL_{50} por medio del método de análisis de conglomerados jerárquicos, se observó que se formaron dos grupos (Figura 12), el primer grupo quedó formado por *H. drummondii* cuyos aceites produjeron el valor más alto de $1/CL_{50}$, a esta especie se le consideró como tóxica. En el segundo grupo se incluyeron el resto de las especies, *H. piperitum*, *M. rotundifolia*, *H. verticillata*, *S. elegans* y *S. microphylla*, cuyos valores de $1/CL_{50}$ fueron menores que los de *H. drummondii*, estas especies se consideraron como no tóxicas.

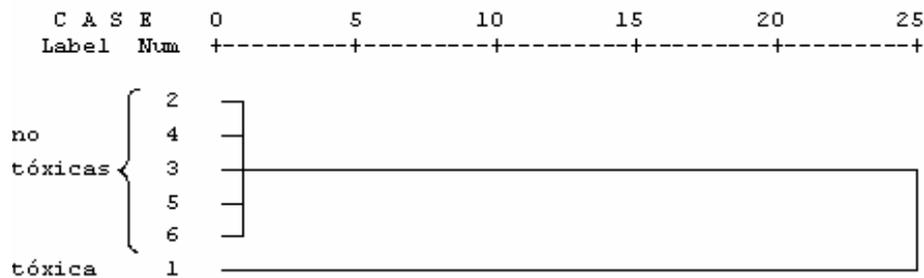


Figura 12. Análisis de conglomerados jerárquicos basados en los valores inversos de CL_{50} en *A. salina* de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae.

1. *Hedeoma drummondii*, 2. *H. piperitum*, 3. *Hyptis verticillata*, 4. *Mentha rotundifolia*, 5. *Salvia elegans*, 6. *S. microphylla*.

7.8. Separación de los aceites esenciales y actividad antibacteriana de las fracciones.

Para realizar esta separación se seleccionaron a los aceites esenciales que presentaron la mayor actividad antibacteriana, los de *H. drummondii*. De la cromatoplaqueta se obtuvieron tres fracciones, las cuales se probaron en las cepas de bacterias, los resultados se presentan en la Tabla 12, en donde se observa que las tres fracciones presentaron actividad antibacteriana en por lo menos una de las cepas. La fracción 1 presentó actividad inhibitoria, CMI, y bactericida, CMB, en *S. aureus* y en *H. influenzae* sólo presentó inhibición; la fracción dos fue activa en cuatro cepas, produjo inhibición en *E. coli*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, esta fracción sólo mostró efecto bactericida en dos cepas, *S. aureus* y *H. influenzae*. La fracción tres fue activa en una sola cepa, *H. influenzae* en la que presentó inhibición y efecto bactericida.

Tabla 12. Actividad antibacteriana de las fracciones de los aceites esenciales de *H. drummondii*.

Fracción	<i>E. coli</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>S. pneumoniae</i>		<i>S. aureus</i>	
	E f e c t o							
	inhibitorio	bactericida	inhibitorio	bactericida	inhibitorio	bactericida	inhibitorio	bactericida
1	-		+	-	-		+	+
2	+	-	+	+	+	-	+	+
3	-	-	+	+	-	-	-	-

+ positivo, - negativo

En la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos en la prueba de dilución en caldo con la fracción dos de los aceites esenciales de *H. drummondii*, en *S. pneumoniae* en la que se observa ausencia de turbidez en el tubo con esta fracción, a una concentración de 2000 µg/ml, por lo que a ésta se le consideró como efecto inhibitorio, igualmente se observó que al sembrar muestras del testigo positivo en agar Mueller-Hinton, hubo crecimiento de la bacteria y que al sembrar una muestra de cultivo con dicha fracción, no hubo crecimiento en la caja de Petri por lo que esto se consideró como efecto bactericida.

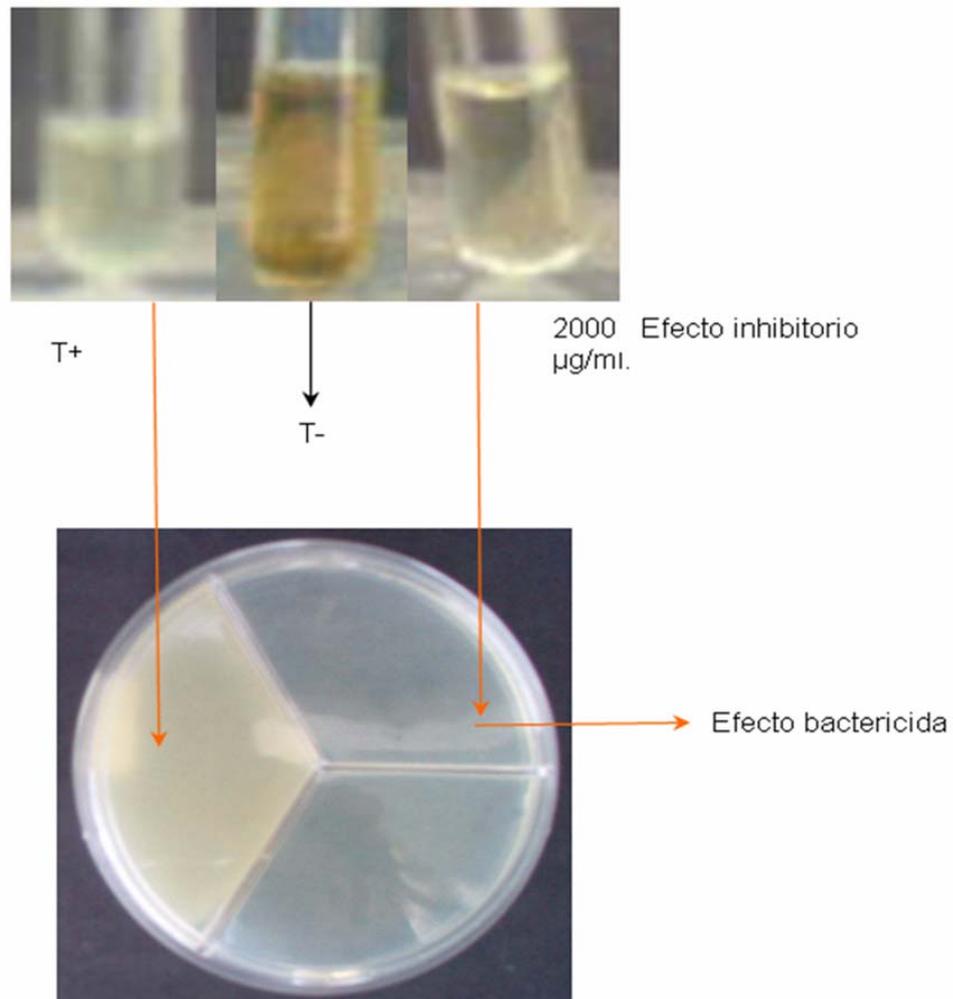


Figura 13. Efecto inhibitorio y bactericida en *S. pneumoniae* de la fracción 2 de los aceites esenciales de *H. drummondii*. T+, testigo positivo; T-, testigo negativo.

7.9. Identificación del compuesto activo de los aceites esenciales.

Puesto que la fracción dos fue la mas activa presentando actividad inhibitoria y bactericida, se separó por medio de cromatografía en placa fina y se encontró que estaba formada por una sola sustancia, por lo que se consideró que se había aislado a uno de los componentes activos de los aceites esenciales de *H.*

drummondii; así que para identificar a esta sustancia se obtuvieron los espectros de UV e IR. El espectro de UV se presenta en el anexo II, figura 34 donde se observa un valor mínimo de absorbancia de 211.6 nm y un máximo de 244.06, que son característicos de la pulegona.

En el anexo II, figura 35 se presenta el espectro de IR de la fracción dos, el cual al ser comparado con el equipo de UV-Vis, se encontró que el espectro coincide con el de la pulegona, con base en los datos espectrales de UV-Vis e IR, la fracción dos fue identificada como pulegona.

7.10. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀.

Al analizar los datos de la composición química de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀, de las seis especies de Lamiaceae estudiadas por medio del método de conglomerados jerárquicos con el programa SPSS 12.0, se obtuvo el dendrograma que se presenta en la Figura 14, en donde se observa que se formaron cuatro grupos. El primer grupo formado por las dos especies de *Hedeoma*, se caracteriza por la presencia de mentona y pulegona, también formó el grupo de mayor actividad antibacteriana. El grupo que incluyó a las especies *H. verticillata* y *M. rotundifolia*, caracterizado por su contenido en común de fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil, formó el grupo inactivo en las bacterias probadas. Cada especie de *Salvia* formó un grupo independiente en el

dendograma elaborado con los datos de composición química, pero en el actividad de actividad antibacteriana dichas especies se incluyeron en un sólo grupo.

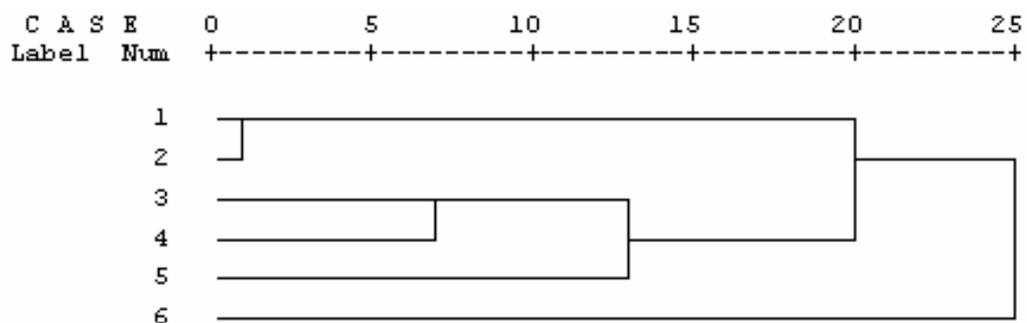


Figura 14. Análisis de Conglomerados jerárquicos basado en la composición química de los aceites esenciales de seis especies de Lamiaceae y los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀.

1. *Hedeoma drummondii*, 2. *H. piperitum*, 3. *Hyptis verticillata*, 4. *Mentha rotundifolia*, 5. *Salvia elegans*, 6. *S. microphylla*.

8. DISCUSIÓN

8.1. Rendimiento de los aceites esenciales.

El contenido de los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae, medido como rendimiento porcentual mostró una variabilidad interespecifica. Esta variabilidad entre las especies de plantas es una característica reconocida por otros autores como Harborne y Barbaran (1991). El rendimiento de los aceites esenciales se encontró en el rango de 0.1 a 2% el cual se ubica dentro de los parámetros de rendimiento en los que según Domínguez (1979) se encuentran estas sustancias en las plantas aromáticas. En las dos especies de *Salvia* estudiadas, se encontró que su contenido en aceites esenciales fue de 0.2% en *S. elegans* y de 0.6% en *S. microphylla*, estos valores se encuentran en el rango de contenido de aceites esenciales reportado para la mayoría de las especies de *Salvia*, el cual es de 0.1 a 1% (Schulz *et al.*, 2005).

8.2. Composición química de los aceites esenciales.

En las dos especies de *Hedeoma* investigadas, se encontró que los aceites esenciales de ambas contienen mentona y pulegona entre los componentes mayoritarios. La diferencia es que en *H. drummondii* la pulegona está en mayor concentración que en *H. piperitum*, la primera especie además contiene n-metil-piridona-6-ácido carboxílico, componente del cual carece *H. piperitum*, en esta

última especie la pulegona ya había sido reportada (Romo, 2000). En cuanto a *H. drummondii*, no se encontraron antecedentes de estudio de esta especie. Por su contenido en común en mentona y pulegona, las dos especies de *Hedeoma* formaron un grupo, tanto al clasificar a las especies estudiadas por su contenido en terpenoides y compuestos fenólicos (Figura 1), como al someter los datos de composición química al análisis de conglomerados jerárquicos (Figura 2).

En México, existe 20 especies de *Hedeoma*, la mayoría de las cuales no se han investigado desde el punto de vista químico Esquivel *et al.* (1996) consideraron que es necesario aportar datos acerca de las características del género, por lo tanto, los resultados del presente estudio contribuyen al conocimiento químico de este grupo de plantas mexicanas.

En lo que corresponde a los componentes mayoritarios de los aceites de *H. verticillata* el programa del cromatógrafo de gases los identificó como, fenol, 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metil y ciclohexano,1-metil-2,4bis(1-metiletil), estas sustancias no habían sido encontradas en *H. verticillata*, Facey *et al.* (2005) reportaron que esta especie presenta quimiotipos, dependiendo de los países de procedencia, las muestras vegetales de Jamaica tienen como componente mayoritario a cadina-4,10(bis)-dien-3-ona y escuamulosona; las muestras de Alemania contienen α -pineno, β -pineno y timol y los de Cuba contienen cadina-4, 10(15)-dien-3-ona y epóxido de isocariofileno. Entonces, *H. verticillata* procedente de Huejutla, analizada en este estudio, es otro quimiotipo caracterizado por su

contenido en fenol 2,6-bis(1,1dimetiletil)-4-metil y ciclohexano,1-metil-2,4bis(1-metiletenil), de este quimiotipo no existen antecedentes.

Los componentes mayoritarios encontrados en los aceites de *M. rotundifolia*, 3-decino y el compuesto fenol, 6-bis(1,1dimetiletil)-4-metil, no habían sido reportados en esta especie. Lorenzo *et al.* (2002) reconocieron que en el género *Mentha* existen quimiotipos y reportaron que *Mentha rotundifolia* procedente de Uruguay es uno de estos quimiotipos caracterizado por la presencia de óxido de piperitenona (80.8%) y sabineno como componentes mayoritarios de los aceites esenciales de esa planta. Según lo anterior, *M. rotundifolia* del presente estudio, procedente de Ixmiquilpan, Hidalgo, corresponde a quimiotipo de esta especie.

Por otra parte, *M. rotundifolia* y *H. veticillata* tienen en común su contenido en fenol, 2,6-bis(1,1dimetiletil)-4-metil, al clasificar a las especies estudiadas por su contenido en terpenoides y compuestos fenólicos (Figura 1) y mediante el análisis de conglomerados jerárquicos, ambas especies formaron un grupo (Figura 2).

Las dos especies de *Salvia* de esta investigación no cuentan con antecedentes de análisis químicos. Puesto que los componentes identificados en las dos especies de *Salvia* estudiadas, linalool en *S. elegans* y alcanfor, trans-cariofileno y epi-biciclosesquifelandreno en *S. microphylla*, fueron exclusivos de

cada una de ellas, al clasificar a las especies estudiadas por su contenido en terpenoides y compuestos fenólicos (Figura 1) y por medio del en el análisis de conglomerados jerárquicos cada especie de *Salvia* constituyeron un grupo (Figura 2).

En México, el género *Salvia* está constituido por 312 especies, de los cuales sólo el 15% han sido analizadas, particularmente en lo que se refiere a su contenido en triterpenoides (Esquivel *et al.*, 1996.), por lo que este estudio contribuye al conocimiento de la composición química de este género de plantas.

8.3. Actividad antibacteriana.

Se comprobó que los aceites esenciales de cuatro de las seis especies de Lamiaceae estudiadas presentaron actividad antibacteriana en pruebas *in vitro*, esto se puede considerar como una evidencia de que las propiedades medicinales que tradicionalmente se atribuyen a estas plantas tienen como fundamento a estas sustancias. Además, estos resultados apoyan la premisa de que afirma que en general las especies de Lamiaceae poseen un amplio rango de actividades farmacológicas, las cuales están relacionadas con la presencia de aceites esenciales, particularmente el que corresponde a la actividad antimicrobiana (Tabacana *et al.*, 2001; Bozin *et al.*, 2006). Este aspecto adquiere particular importancia si se tiene en cuenta el incremento de la resistencia a antibióticos comunes de muchas cepas bacterianas y de que las infecciones que causan estos

microorganismos son de alto riesgo para la salud, por lo que existe la necesidad de nuevos productos antimicrobianos de eficacia comprobada (Alves *et al.*, 2000; Awal *et al.*, 2004), como los encontrados en *H. drummondii*, que no sólo fueron los que mostraron la mayor actividad antibacteriana en esta investigación, sino que produjeron inhibición del crecimiento tanto en cepas Gram positivas, como Gram negativas, lo que evidencia su amplio espectro de acción. Este efecto, en ambos tipos de bacterias también ha sido reportado por otros autores como Dorman *et al.* (2000), quienes lo observaron en aceites esenciales de otra especie de Lamiaceae *Thymus vulgaris* y por Bozin *et al.* (2006) en *Origanum vulgare* L. Se ha observado que en lo general las bacterias Gram positivas son más susceptibles a los aceites esenciales que las bacterias Gram negativas (Dorman *et al.*, 2000).

Respecto de *H. piperitum*, no se había evaluado la actividad antibacteriana de sus aceites esenciales, esta especie ocupó el segundo lugar en este tipo de actividad pues inhibió el crecimiento en tres de las cinco cepas bacterianas utilizadas en la prueba, es interesante observar que este efecto inhibitorio se presentó en las tres bacterias Gram negativas, *E. coli*, *S. typhimurium* y *H. influenzae*, lo que es contrario a lo observado por Dorman *et al.* (2000) acerca de la menor susceptibilidad a los aceites de este tipo de bacterias, pero en dos cepas *E. coli* y *H. influenzae* sólo presentaron CMI, por lo que su efecto solo fue bacteriostático (Díaz, 2003), sin embargo, en *S. typhimurium* sí presentaron ambos valores y el de la CMI fue el más bajo de toda la prueba.

Respecto a la actividad antibacteriana de las dos especies de *Hedeoma*, como se dijo, si uno de los principios activos de *H. drummondii* fue la pulegona, que corresponde al 17.7 % de sus aceites (ver Tabla 3), se cuestiona por qué los aceites de *H. piperitum* fueron menos activos que los de *H. drummondii*, si también contienen pulegona y en mayor concentración, correspondiente al 41.7% (ver Tabla 4). Una posible explicación es la siguiente. Los aceites de *H. drummondii* además contienen n-metil-piridona-6-ácido carboxílico, sustancia que pudiera presentar un efecto sinérgico con la pulegona e incrementar su actividad; este efecto producido por los componentes de aceites esenciales ya se ha observado en otras especies como *Hesperozygis marifolia* (Briq.) Epl. (Lamiaceae) (Garrido *et al.*, 2007).

No se encontraron antecedentes de estudio de *Salvia microphylla*. En las pruebas realizadas sus aceites esenciales presentaron inhibición del crecimiento de dos bacterias, *E. coli* y *S. typhimurium*, ambas Gram negativas. Los aceites de la otra especie de *Salvia* ensayada, *S. elegans*, sólo presentaron CMI en *H. influenzae*, Gram negativa.

No se encontraron antecedentes de estudio de las dos especies de *Salvia* incluidas en la investigación, *S. microphylla* y *S. elegans*, ambas ocuparon el tercer y cuarto lugar respectivamente en las pruebas antibacterianas, los aceites de ambas especies sólo exhibieron inhibición en las cepas Gram negativas.

En cuanto a las dos especies de plantas inactivas en las bacterias usadas, *H. verticillata* y *M. rotundifolia*, en otro estudio los aceites de esta última presentaron inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* (Argueta, 1994). En pruebas efectuadas en artrópodos, los aceites de las dos especies han resultado activos, los de *H. verticillata*, quimiotipo de Jamaica, fueron tóxicos en *Cylas formicarius elegantulus* Sumner (Coleoptera) plaga de especies de *Ipomoea* (Facey *et al.*, 2005) y los de *M. rotundifolia*, procedente de Omitlán, Hidalgo, produjeron mortalidad en *Sitophilus zeamais* Mostch. (Coleoptera), una de las plagas del maíz almacenado (Cruz, 2000).

Los resultados de la actividad antibacteriana tomados como los inversos de CMI y CMB, se reflejaron en el dendrograma obtenido al hacer el análisis de conglomerados jerárquicos (Figura 7) en el que se formaron tres grupos, el de los aceites muy activos, que incluye a las dos especies de *Hedeoma*, el de los activos, con las dos especies de *Salvia* y el de los inactivos con *H. verticillata* y *M. rotundifolia*.

8.4. Toxicidad en *Artemia salina*.

De acuerdo con los resultados obtenidos al probar los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae, sólo resultaron tóxicos los de *H. drummondii* pues el valor promedio de la CL₅₀ de 34.81 µg/ml, menor que el propuesto como criterio de toxicidad ≤ 100 µg/mL (Zani *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 2000); McLaughlin *et al.*

(1998) consideran que los resultados de toxicidad en *A. salina*, no necesariamente se pueden extrapolar a otros sistemas biológicos. Con los otros aceites se obtuvieron valores $CL_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$, por lo que no se consideraron tóxicos. Esta diferenciación se observó cuando los valores inversos de CL_{50} , $1/CL_{50}$, se sometieron al análisis de conglomerados jerárquicos y en el dendograma resultante se formaron dos grupos, el de la especie tóxica y el de las especies no tóxicas. Como la mayoría de las especies se clasificaron como no tóxicas, se consideró que los resultados permiten aceptar la propuesta acerca de la nula o baja toxicidad de los aceites esenciales en *A. salina*.

8.5. Identificación del compuesto activo de los aceites esenciales.

En el presente estudio se comprobó que uno de los compuestos que le confieren la actividad antibacteriana a los aceites esenciales de *H. drummondii*, es la pulegona, contenida en la fracción 2 sustancia que carece de antecedentes de investigación en lo referente a su efecto en bacterias; al igual para *H. drummondii*.

En otros organismos la pulegona ha resultado muy activa, Franzios *et al.* (1997), determinaron que los aceites esenciales de *Mentha pulegium* y *Mentha spicata*, así como sus principales constituyentes, pulegona, mentona y carvona presentaron fuerte actividad insecticida en *D. melanogaster*, siendo la pulegona el monoterpeno más tóxico. En ratas, la dosis letal cincuenta, DL_{50} de la pulegona es de 2 g/kg. La Agencia de Protección al Medio Ambiente, la EPA por sus siglas en

inglés, de los Estados Unidos de Norteamérica, exige que las sustancias para las que se solicita registro para ser utilizadas como plaguicidas, deben tener una $DL_{50} > 2$ g/kg para que se les considere como no tóxicas (Isman, 2000), entonces la pulegona se encuentra en el límite. Por otra parte, en este estudio se encontró que 100 g de *H. drummondii* contienen 0.3 g de aceites esenciales (Tabla 2) de los cuales el 17.7% son pulegona (Tabla 3), es decir que 100 g, de esta planta contienen 0.053 g, de pulegona, así, se puede considerar que esta es una baja concentración y que *H. drummondii* es una planta que posiblemente carece de toxicidad, si se toma en cuenta que la DL_{50} de la pulegona es de 2 g/kg (Isman, 2000). El requisito de la EPA para clasificar a una sustancia como tóxica, es que tenga una $DL_{50} > 2$ g/kg. Sin embargo, los aceites de *H. drummondii* resultaron tóxicos en *A. salina*, presentaron una $CL_{50} < 100$ µg/ml, pero esto no necesariamente significa que deban ser tóxicos en otro sistema biológico (McLaughlin *et al.*, 1998), como en el caso de ratas.

El caso de *H. piperitum* resulta similar, contiene 2% de aceites esenciales (Tabla 2), de los cuales el 41.7% son pulegona (Tabla 4), esto es, 100 g, de planta contienen 0.834 g de pulegona la cual también es una concentración baja, de acuerdo a los criterios citados, por lo que la planta podría ser considerada como no tóxica; en *A. salina* no presentó toxicidad, su CL_{50} fue > 100 µg/ml.

8.6. Análisis de conglomerados jerárquicos con base en la composición de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀.

Al analizar los datos de la composición química de los aceites esenciales y los valores inversos de CMI, CMB y CL₅₀, de las seis especies de Lamiaceae estudiadas por medio del método de conglomerados jerárquicos, se observó la formación de cuatro grupos (Figura 10), similar al dendrograma obtenido al analizar la composición de los aceites esenciales, lo cual podría indicar que la actividad biológica de los aceites, depende de su composición.

9. CONCLUSIONES.

Se comprobó que el contenido de los aceites esenciales de las seis especies de Lamiaceae, está dentro de los parámetros de rendimiento de estas sustancias en las plantas.

La mayoría de las especies de Lamiaceae estudiadas presentan actividad antibacteriana, siendo las cepas más susceptibles las bacterias Gram negativas.

Estos resultados ayudan a validar el uso de estas plantas y confirman que tienen el efecto que tradicionalmente se les atribuye.

Hedeoma drummondii fue la especie que tuvo la mayor actividad antibacteriana con un amplio espectro, ya que inhibió a las cinco cepas bacterianas utilizadas, tanto Gram negativas, como Gram positivas. Una de las sustancias que le confiere esta actividad a los aceites, es la pulegona.

Las especies que no presentaron toxicidad en *A. salina* fueron *H. piperitum*, *H. verticillata*, *M. rotundifolia*, *S. elegans* y *S. microphylla*. La única especie que presentó toxicidad fue *H. drummondii*.

La actividad biológica de estas plantas, evaluada en bacterias y en *A. salina*, depende de la composición química de los aceites esenciales, las que

contienen terpenoides son activas; siendo las de mayor actividad las que contienen monoterpenos monocíclicos cetónicos, seguidas de las que tienen monoterpenos bicíclicos cetónicos y después las que contienen monoterpenos acíclicos hidroxilados; las especies que contienen compuestos fenólicos fueron inactivas, es probable que estas últimas sean quimiotipos.

Las cualidades de aroma y sabor agradables de las dos especies de *Hedeoma*, ambas conocidas como Santo Domingo, aunadas a su posible eficacia medicinal, basada en parte en sus propiedades antibacterianas y a que probablemente carecen de toxicidad, podrían explicar que estas plantas sean muy apreciadas y utilizadas por los habitantes del Valle del Mezquital y Pachuca (Villavicencio y Pérez Escandón, observación personal), que son las áreas de crecimiento de estas especies.

10. Literatura citada.

Akerele, O., Heywood, V. H. and Syuge, H. 1991. The conservation of medicinal plants. (Ed) Cambridge University Press New York. 366 pp.

Alanís, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J. and Ceballos, G.M. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 153-157.

Al-Burtamani, S.K.S., Fatope, M.O., Marwah, R.G., Onifade, A.K. and Al-Saidi, S.H. 2005. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 107–112.

Aliyiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I.B. and Mitakou, S. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of *Sideritis* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2): 811-815.

Alves, T. M. A., Fonseca, S., Brandão, T., Mesquita, G., Smânia, J. y Leomar, C. 2000. Biological screening of Brazilian medical plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (3): 367-373.

Alleyne, G.A. 1998. Emerging Diseases. What-now. *Emerging Infections Diseases* 4(3):498-500.

Argueta, A. (Coord.). 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 3 Vols. Instituto Nacional Indigenista. México, D. F. 1786 pp.

Awal, M. A., Nahar, A., Shamim, M., Bari, M.A., Rahman, M. and Haque, M. E. 2004. Brine Srimp Toxicity of leaf and seed extracts of *Cassia alata* Linn. and their antibacterial potency. *Journal of Medical Science* 4(3):188-193.

Brandling, B. A. D. and Pinheiro, F. 19969. Infectious diseases in Latin America and the Caribbean: are they really emerging and increasing?. *Emerging Infectious Diseases* 2(1):59-61.

Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M.A. y Velásquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia* 30(8): 453-459.

Bozin, B., Mimica- DuKici, N., Simin, N. and Anackov, G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (5):1822-1828.

Cáceres, A., Morales, C., Girón, L.M. y Navarro, M.C. 1990. Demostración de la actividad antimicrobiana de algunas especies vegetales usadas popularmente como medicinales en la cuenca del Caribe. *Ciencia y Tecnología* 81-87.

Coelho de Souza, G., Haas, A.P.S., Poser, G.L., Schapoval, E.E.S. and Elisabetsky, E. 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 90:135-143.

Cortés M. F. 2005. Bioactividad de aceites esenciales de siete especies de plantas medicinales de Lamiaceae de la región centro-sur de Hidalgo. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 124 pp.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4):564-582.

Cragg, G.M., D.J. Newman and Snader K.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60:52-60.

Cruz, B.M. 2000. Actividad insecticida en *Fitophilus zeamais* (Coleoptera) de aceites esenciales de *Mentha rotundifolia* (Labiata). Tesis de licenciatura en química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 63pp.

Díaz, R., Gamazo, C. y López-Goñi, I. (Eds.). 2003. Manual práctico de microbiología. Masson. Barcelona. 216 pp.

Domínguez, X. A. 1979. Método de investigación fitoquímica. (Ed) Limusa, México D. F. 281 pp.

Dorman, H. J. D. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308-316.

Esquivel, B., Calderon, J., Sánchez, A., Ramamoorthy, T. P., Flores, E. y Domínguez, R. M. 1996. Recent advances in phytochemistry and biological activity of mexican Labiate. *Revista Latinoamericana de Química* 24(2):44-64.

Facey, P.C., Porter, R., Reese, P.B. and Williams, L. 2005. Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(12):4774-4777.

Fauci, A. 1998. New and Reemerging Diseases. The importance of biomedical research. *Emerging Infections Diseases* 4(3):374-378.

Farnsworth, N. R. and Sotejano, D. D. 1991. Global importance of medicinal plants. In: *The conservation of medicinal plants*. Cambridge University Press. New York. 366pp.

Franzios, G., Mirotsoy, M., Hatziaepostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G. and Mavragani-Tsipidou, P. 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(7): 2690-2694.

Garrido, G.M., Pérez Escandón, B.E. y Villavicencio Nieto, M.A. 2007. Efecto sinérgico y antagónico en la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Hesperozygis marifolia*. IV Reunión de la Sociedad Química de Productos Naturales. Monterrey, Nuevo León.

Gören, A.C., Topçu, G., Bilsel, G., Bilsel, M., Aydoğmuş, Z. and Pezzuto, J.M. 2002. The chemical constituents and biological activity of essential oil of *Lavandula stoechas* ssp. *stoechas*. *Zeitschrift für Naturforschung* 57c: 797-800.

Guerrero, R. y Guzmán, A. 2004. Bioactivities of latexes from selected tropical plants. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 9 (1): 1-7.

Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308-316.

Harborne, J. B. 1980. *Phytochemical methods*. Chapman and Hall. New York. 278 pp.

Harbone, J. B. and Barbaran. 1991. Recent advances in the ecological biochemistry of plants terpenoids. in: *ecological chemistry and biochemistry of plants terpenoids*. In: Harborne, J. B. and Barberan, F.A.T. (Eds). Oxford Sci. p. 399-426.

Harborne, J. B. 1997. *Introduction to ecological biochemistry*. Academic Press. London. 318 pp.

Hernández Díaz, L. y Rodríguez J. M. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana Plantas Medicinales* 2:44-47.

Hernández, T., Canales M., Avila, J. G., Duran, A., Caballero, J, Romo de Vivar, A. y Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapótitlan de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology* 88:181-188.

Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., García Cortez, D.A., Nakamura, C.V. and Dias Filho, B.P. 2002. Screening of some plants used in to the Brazilian folk medicine for the treatment in infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(7):1027-1031.

Holmstedt, B.R. and Bruhn J.G. 1997. Ethnopharmacology-A challenge. In: Schultes, R.E. and S. von Reis (Eds.). *Ethnobotany. Evolution of a discipline.* Dioscorides Press. Portland. p. 338-342.

Huerta, C. 1997. La herbolaria mito o realidad. *Biodiversitas* 3(12)

INEGI, 1992. Síntesis geográfica del estado de Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes. 134 pp.

Isman, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603-608.

Iwu, M. M. Duncan, A. R. and Okunji, C. O. 1999. New antimicrobials of plant origin. In: Janick, J. (Ed). *Perspectives on new uses.* ASHS Press. Alexandria p. 457-462.

Lis-Balchin, M., Buchbauer, G., Ribisch, K. and Wenger, M.-T. 1998. Comparative antibacterial effects of novel *Pelargonium* essential oils and solvent extracts. *Letters in Applied Microbiology* 27: 135-141.

Lorenzo, D., Paz, D., Dellacasa, E., Davies, P., Vila, R. and Cañigueral, S. 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 45(4):519-524.

McLaughlin, J. L., Rogers, L. L. y Anderson. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Information Journal* 32: 513-524.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putman, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. and McLaughlin, J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* 45:31-34

Mitscher, L. A. 1975. Antimicrobial agents from higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 9:243-282.

Moreira, F.P.M., Coutinho, V., Pimentel Montanher, A.B., Balparda Caro, M.S., Costa Brighente, I.M. e Pizzolatti, M.G. 2003. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. *Quimica Nova* 26 (3): 309-311.

Pérez Escandón, B. E., Villavicencio Nieto, M. A. y Ramírez Aguirre A. 2003. Lista de plantas útiles del Estado de Hidalgo. (Ed) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. 133 pp.

Romo de Vivar, A. 2006. Química de la flora mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 224 pp.

Romo, G.C. 2000. Aceites esenciales de *Hedeoma piperitum* en *Sitophilus zeamais* (Coleoptera). Tesis de licenciatura en química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 59 pp.

Royal Botanical Gardens, Kew. 2007. <http://www.kew.org.uk/scihort/lamwhat.html>. (consultada 12/03/ 2007).

Rzedowski, G. C. y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del valle de México. Instituto de Ecología, A. C. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro 1406 pp.

SSA. Secretaria de Salud. 2005. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Dirección General de Epidemiología. SSA

Schultes, R.E. and von Reis, S. 1997. *Ethnobotany. Evolution of a discipline.* Dioscorides Press. Portland. 414 pp.

Schulz, H., Özkan, G., Baranska, H. K. y Özcan M. 2005. Characterisation of essential oil plants from Turkey by ir and raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. 39: 249-256.

Shunying, Z., Yang, Y., Huaidong, Y., Yue, Y. and Guolin, Z. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal of Ethnopharmacology* 96 151–158.

Sivropowlow, A., Kokkini, S. Lanaras, T. and Arsenakis, M. 1995. Antimicrobial activity fo mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(9).2384-2388.

Summer, J. 2001. *The natural history of medicinal plants.* Timber Press. Portland. 235pp

Tabacana, N., Kirimer, N., Demirci, B., Demirci, F. and Hüsniük. 2001. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the enantiomeric Distribution of Borneol. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 49:4300-4303.

Villaseñor, J.L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*. 28 (3): 160-167.

Villavicencio Nieto, M. A. y Pérez Escandón, B. E. 1995. Plantas útiles del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. 128 pp.

Villavicencio Nieto, M. A. y Pérez Escandón, B. E. y Ramírez, A. 1998. Lista florística del Estado de Hidalgo. Recopilación bibliográfica. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. 147 pp.

Villavicencio Nieto, M. A. y Pérez Escandón, B. E. 2005. Guía de la flora útil de la Huasteca y la zona Otomí-Tepehua, Hidalgo I. (Ed). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. 171pp.

Villavicencio Nieto, M. A., Pérez Escandón, B. E. y Ramírez, A. A. 2000. Plantas útiles del Estado de Hidalgo II. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca. 247 pp.

Wannissorna, B., Jarikasemb, S., Siriwangchaib, T. and Thubthimthed, S. 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia* 76: 233– 236.

WHO, 2002. WHO Traditional medicine strategy 2002-2005. World Health Organization. Geneva. p. 7-18.

WHO. 2004. The World Health Report. 2004. Geneva. 96 pp.

WHO, 2006. World Health Statistics 2006. World Health Organization. Geneva. p. 14-15.

Young-Su, J. Young-Cheol, Y., Dal-Soon, Ch. and Young-Joon, A. 2005. Vapor phase toxicity of marjorana oil compounds and their related monoterpenoids to *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(20): 7892-7898.

Zani, C.L., Chaves, P.P.G., Queiroz, R., de Oliveira, A.B., Cardoso, J., Anjos, A.M.G. and Grandi, T.S.M. 1995. Brine shrimp lethality as a prescreening system for anti-trypanosoma cruzi activity. *Phytomedicine* 2(1):47-50.

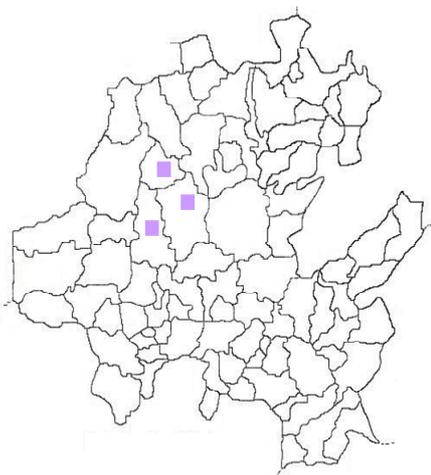
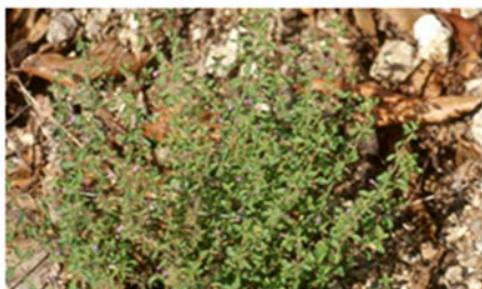
ANEXO I.

Ficha Técnica de *Hedeoma drummondii* Benth.

Nombre común: Santo Domingo.



Descripción: Hierba aromática, perenne, muy ramificada, tallos erectos, alcanza hasta 30 cm de altura; hojas opuestas de 3-5 mm de largo; flores tubulares, moradas, de 7 mm de longitud. Crece en bosque de *Quercus* y *Juniperus*.



Ubicación: Se encuentra en Ixmiquilpan, Cardonal y Nicolás Flores.

Uso medicinal: Para el susto, dolor de estómago y gripa.

Ficha Técnica de *Hedeoma piperitum* Benth.

Nombre común: Santo Domingo.



Descripción: Hierba, perenne, tendida o ascendente, con tallos numerosos, de unos 15 cm de altura, muy aromática al estrujarse; hojas opuestas, flores tubulares, blancas o blanco-violáceas, de aproximadamente 7 mm de largo. Florece de julio a

octubre (Villavicencio *et al.* 1995).

Ubicación: Se encuentra en bosques de *Abies*, *Pinus*, *Quercus* y en pastizales, en Pachuca, Mineral del Chico, Mineral del Monte, Epazoyucan, Huasca, Omitlán, Zempoala y Tepeapulco.



Utilización principal: El té se bebe como agua de tiempo o en las comidas.

Uso medicinal: Para el dolor de estómago, las ramas se hierven y el te se bebe caliente.

Ficha Técnica de *Hyptis verticillata* Jacq.



Huehuetla y San Bartolo Tutotepec.

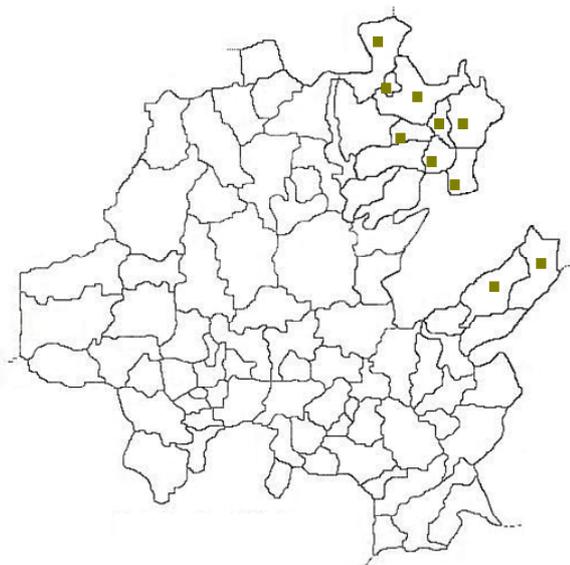
Nombre común: Hierba negra.

Descripción: Hierba erecta, ramificada, de 1 a 2 m de alto; hojas lanceoladas, de 2 a 8 cm de largo, aserradas ; inflorescencias con flores verdosas, de unos 3 mm de largo.

Ubicación: Se encuentra en la zona de bosque tropical perennifolio en Atlapexco, Huautla, Huazalingo, Huejutla, Jaltocán, Orizatlán, Xochiatipan, Yahualica,

Uso medicinal: Para quitar el dolor de cabeza, para cortar hemorragias nasales o de oído, para hacer limpias o barridas para tratar infecciones (Villavicencio *et al.* 2005).

Plaguicida: La planta se coloca en los nidos de las gallinas para eliminar chahuistles.



Ficha Técnica de *Mentha rotundifolia* Huds.



Nombre común: Mastranzo, Mastranto.

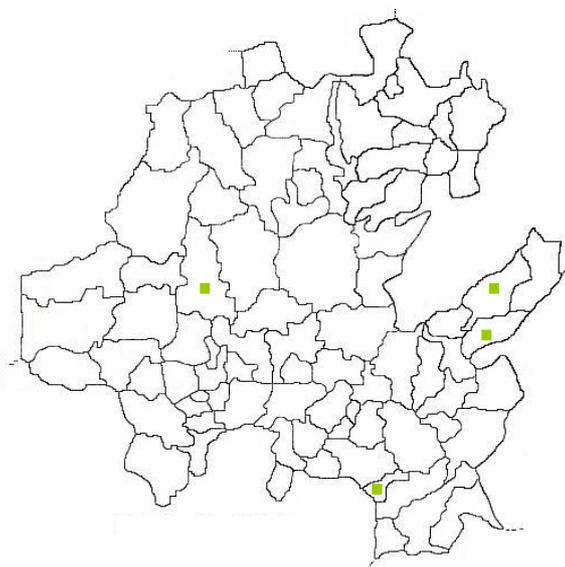
Descripción: Hierba perenne, de unos 60 cm de alto, de aspecto lanoso, aromática; hojas hasta de 6 cm de largo; flores blancas, de unos 4 mm de largo. Es una planta de origen europeo naturalizada en el país.

Ubicación: Crece como maleza en sitios con bosque de *Pinus-Quercus* y mesófilo de

montaña, en Mineral del Monte, San Bartolo Tutotepec, Tenango e Ixmiquilpan.

Uso medicinal: Se utiliza para regular la menstruación cuando es muy escasa o se presenta de manera irregular o existen cólicos, así como para la gripa y el catarro (Villavicencio *et al.* 2005).

Plaguicida: Se utiliza para matar chinches, pulgas y piojos.



Ficha Técnica de *Salvia elegans* Valh.

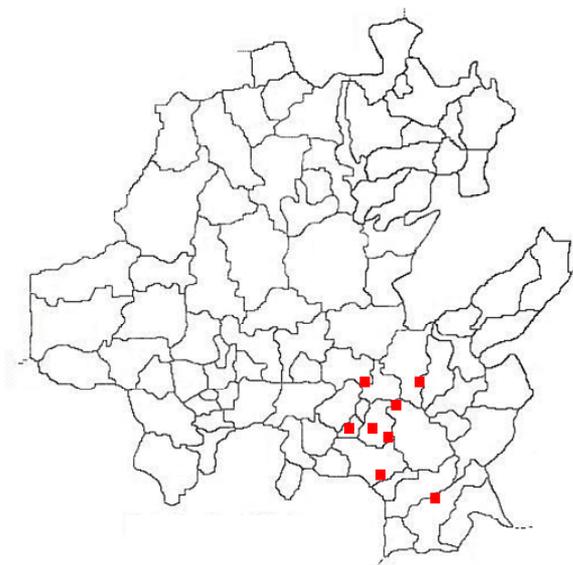


Nombre común: Mirto de campo.

Descripción: Planta herbácea, perenne, alcanza 1.5 m de largo; tallo delgado, quebradizo, glanduloso; hojas ovadas de unos 5 cm de largo; flores rojas de 2 a 3 cm de longitud, glandulosas. Flórece de diciembre a abril (Villavicencio *et al.* 2000).

Ubicación: Se encuentra en bosques de *Abies*, *Pinus*, y *Quercus* en Pachuca, Epazoyucan, Zempoala, Tepeapulco, Mineral del Monte, Mineral del Chico, Omitlán y Huasca.

Uso medicinal: Para combatir el insomnio, para curar a los niños de espanto y para la diarrea.



Ficha Técnica de *Salvia microphylla* Kunth.



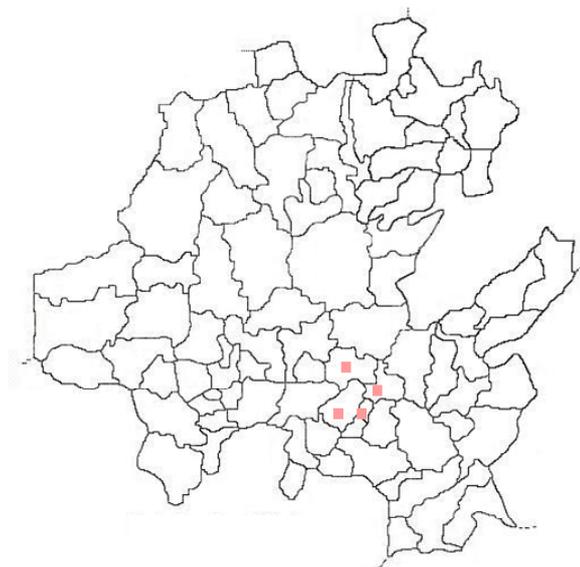
Mineral del Chico.

Uso medicinal: Se utiliza para combatir el insomnio, para el susto y dolor de estómago.

Nombre común: Mirto rosa.

Descripción: Arbusto llega a medir de 1 a 2 m de largo; hojas lanceoladas a ovaladas, de 1 a 2 cm de largo; flores rojas, de aproximadamente 2 cm de largo. Florece de agosto a noviembre (Villavicencio *et al.* 2000).

Ubicación: Se encuentra en bosques de *Abies*, *Juniperus*, y *Quercus* en Pachuca, Omitlán, Mineral del Monte y



ANEXO II.

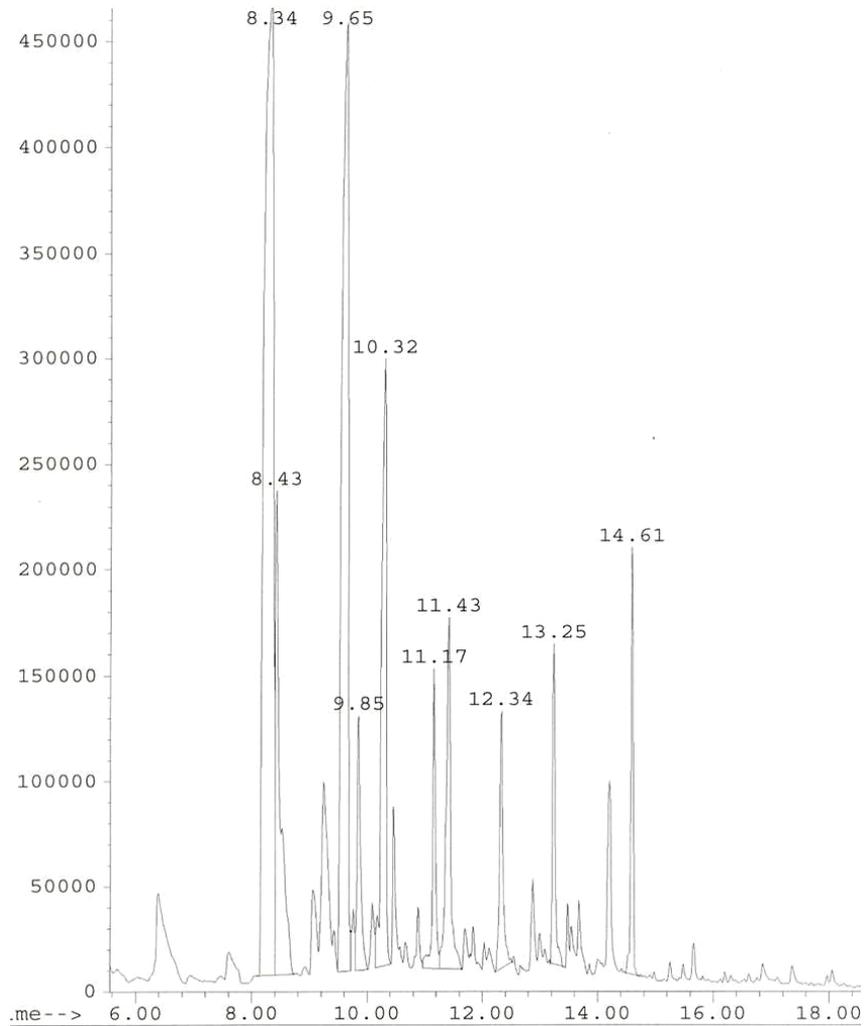


Figura 15. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de *Hedeoma drummondii*, en columna capilar de 5% metil fenil silicón de 30 mm x 0.25 mm, como fase móvil gas helio con flujo de 1.0 ml/minutos. Con la técnica de ionización por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV para EM.

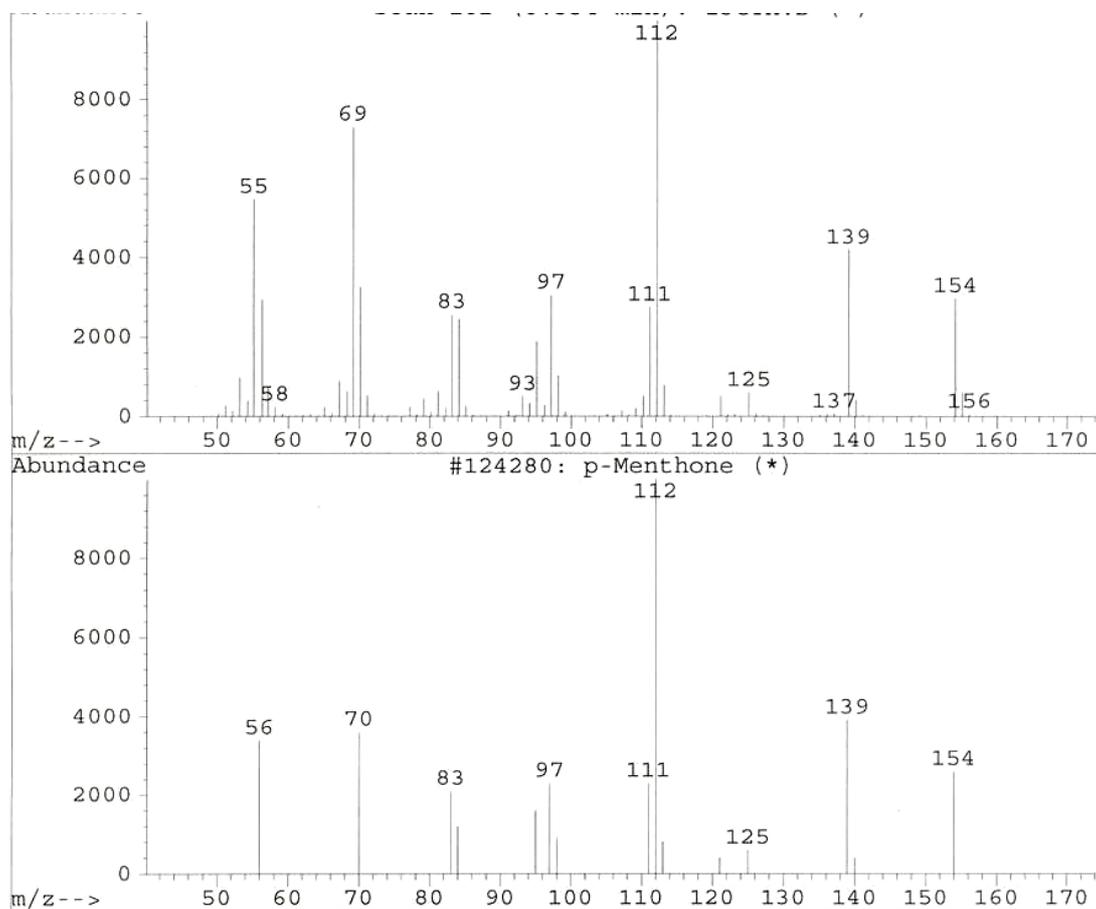


Figura 16. Espectro de masas de mentona con tiempo de retención de 8.33 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con el espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

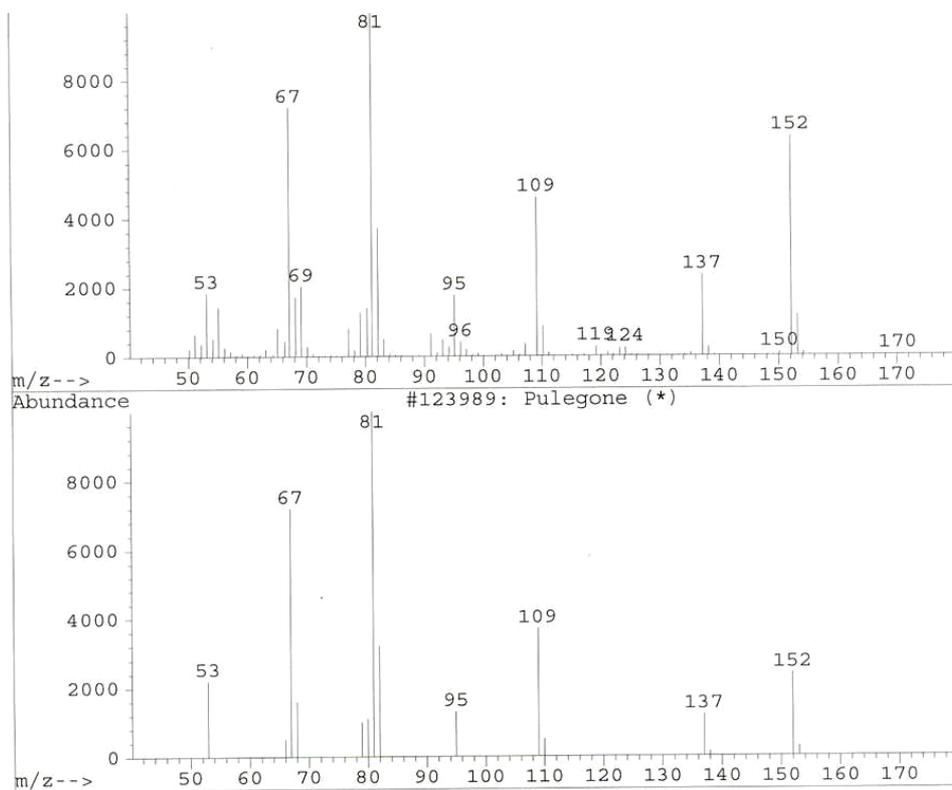


Figura 17. Espectro de masas de pulegona con tiempo de retención de 9.65 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con el espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

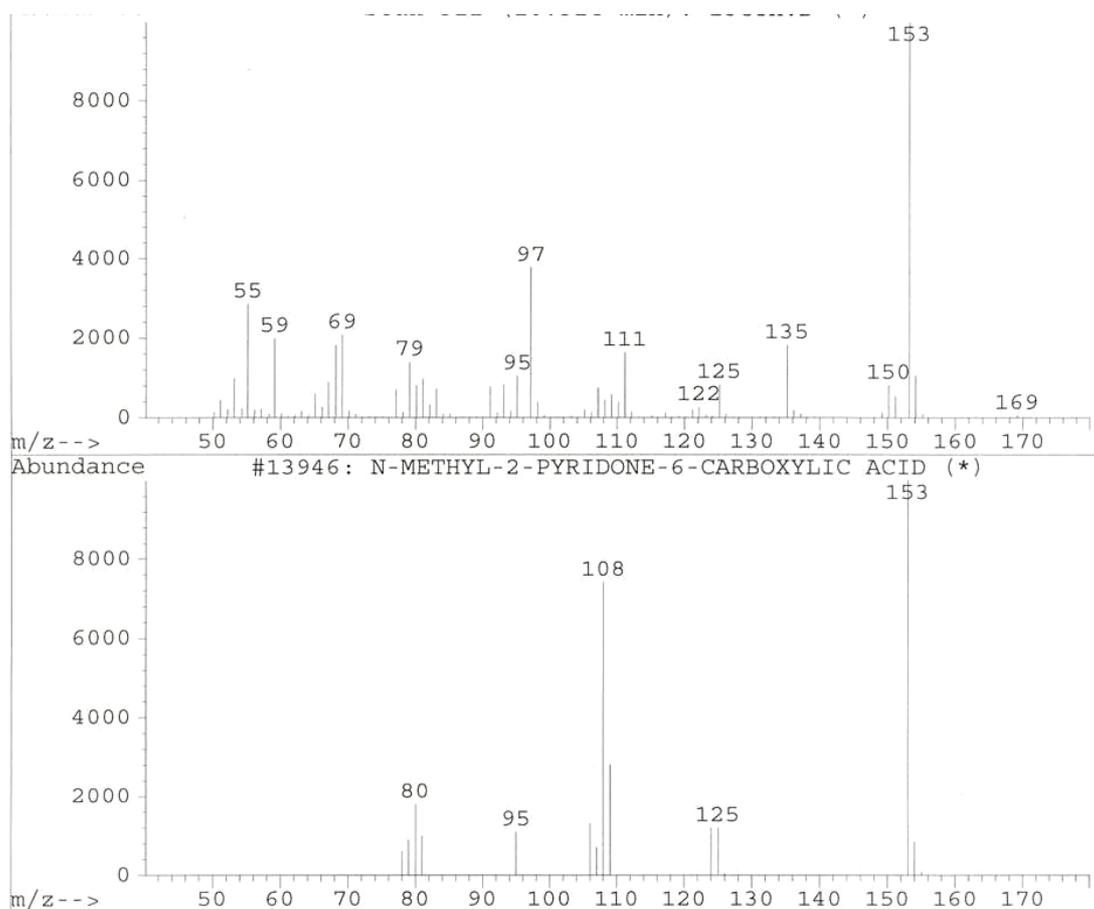


Figura 18. Espectro de masas de n-metil-piridona-6-acido carboxilico con tiempo de retención de 10.31 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con el espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

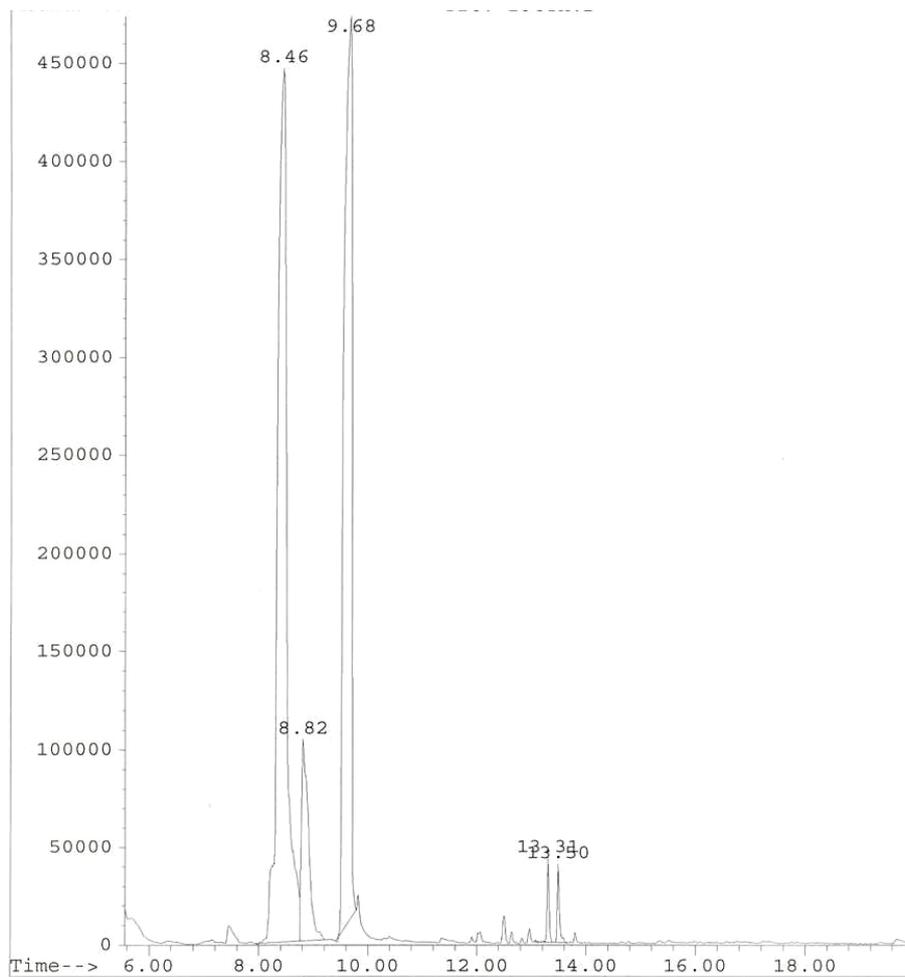


Figura 19. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de *Hedeoma piperitum*, en columna capilar de 5% metil fenil silicón de 30 mm x 0.25 mm, como fase móvil gas helio con flujo de 1.0 ml/minutos, con la técnica de ionización por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV para EM.

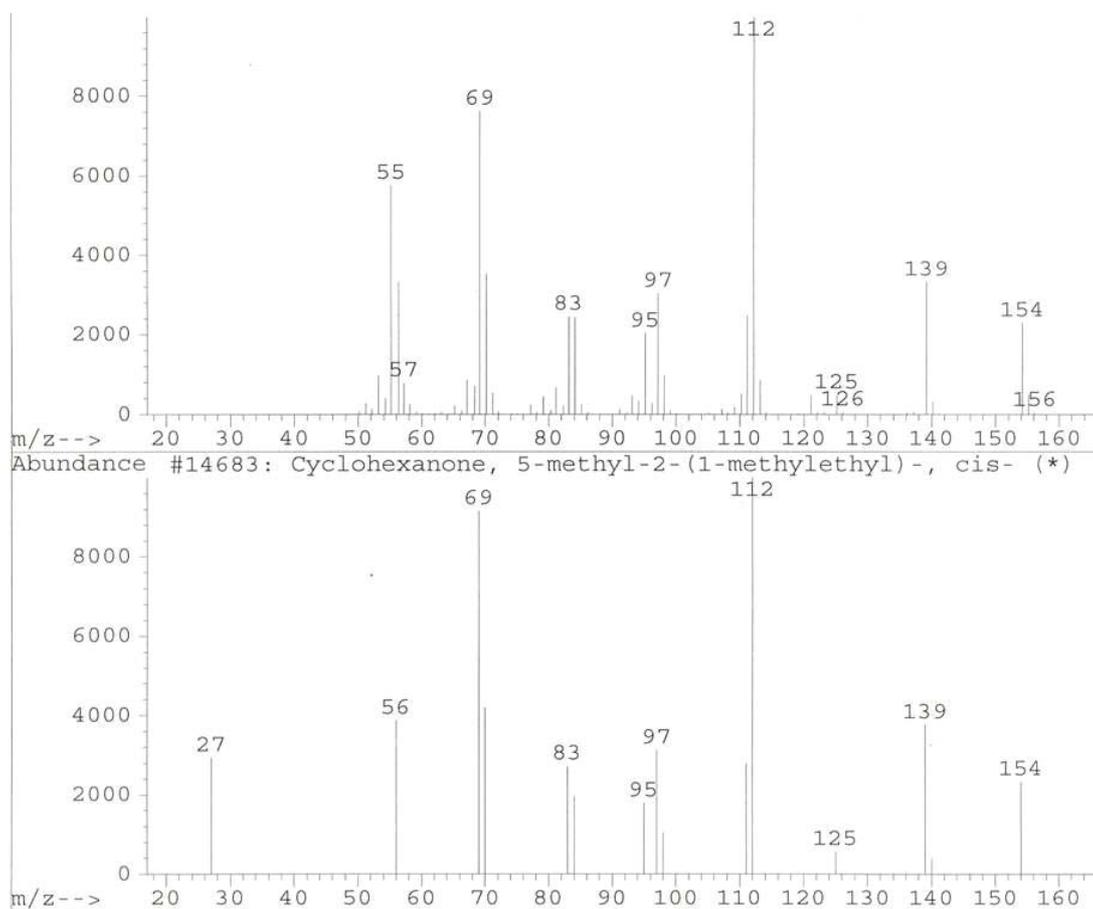


Figura 20. Espectro de masas de mentona con tiempo de retención de 8.44 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con el espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

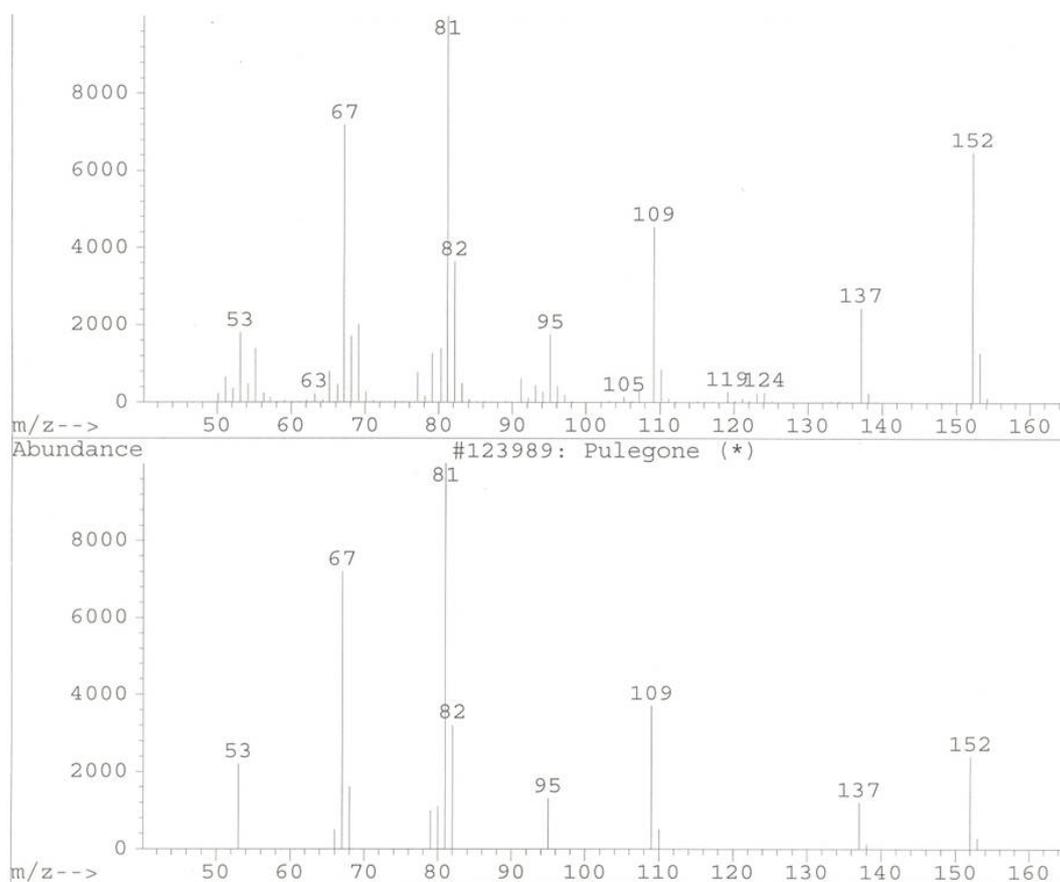


Figura 21. Espectro de masas de pulegona con tiempo de retención de 9.68 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

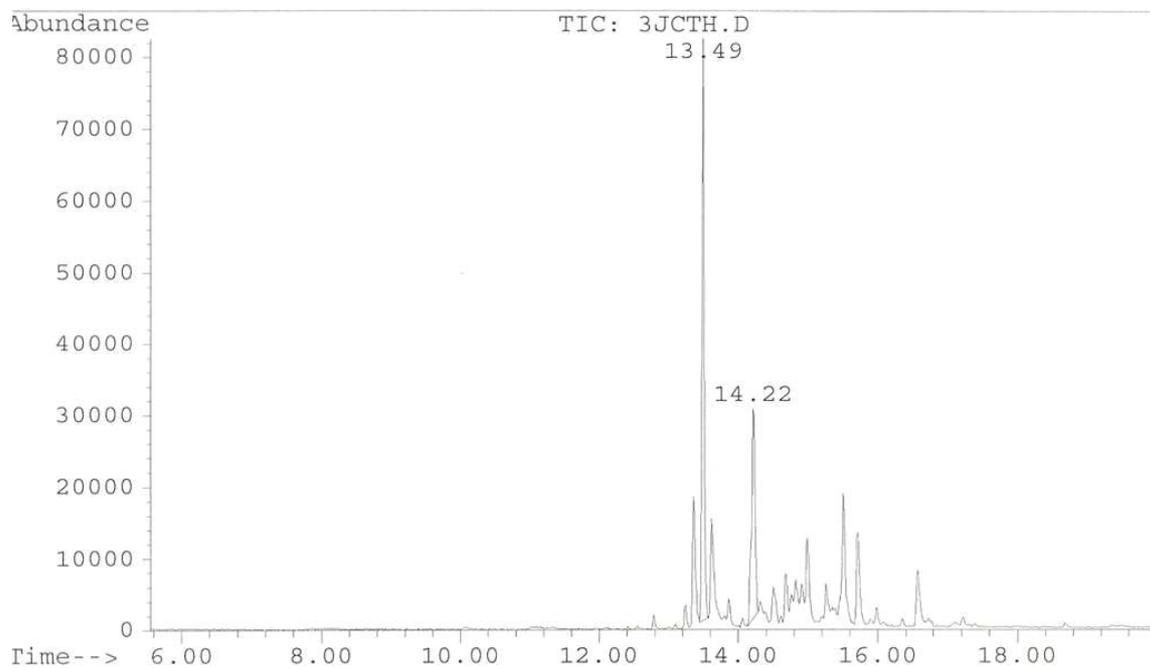


Figura 22. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de *Hyptis verticillata*, en columna capilar de 5% metil fenil silicón de 30 mm x 0.25 mm, como fase móvil gas helio con flujo de 1.0 mL/minutos, con la técnica de ionización por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV para EM.

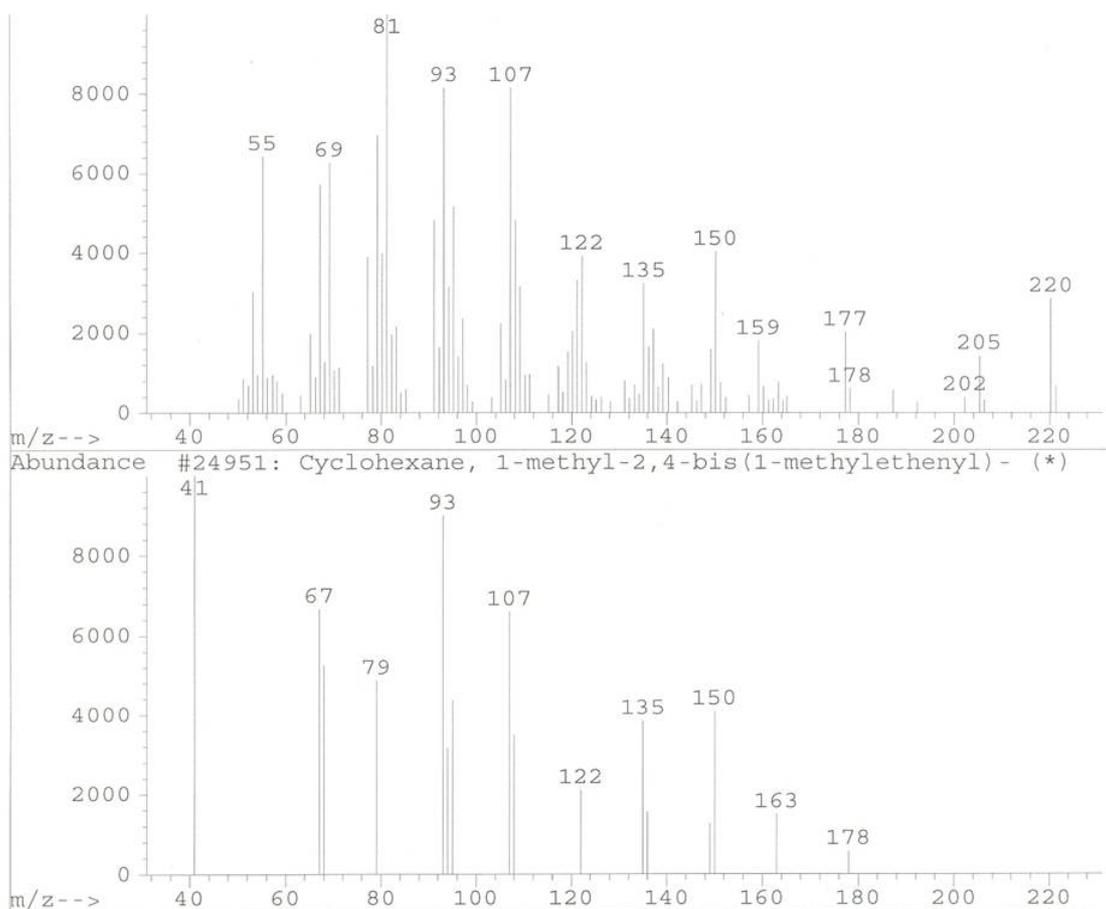


Figura 23. Espectro de masas de fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil con tiempo de retención de 13.48 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

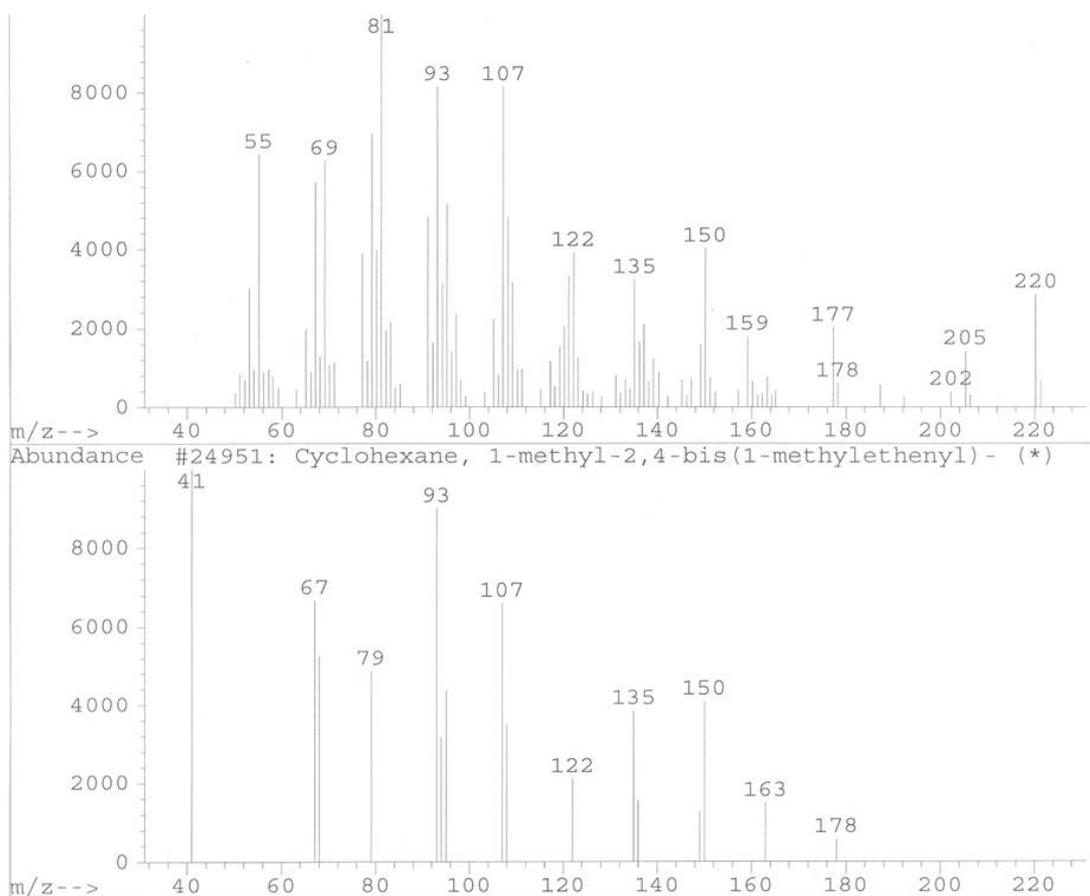


Figura 24. Espectro de masas del compuesto de cyclohexano,1-metil-2,4bis(1-metiletenil) con tiempo de retención de 14.21 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

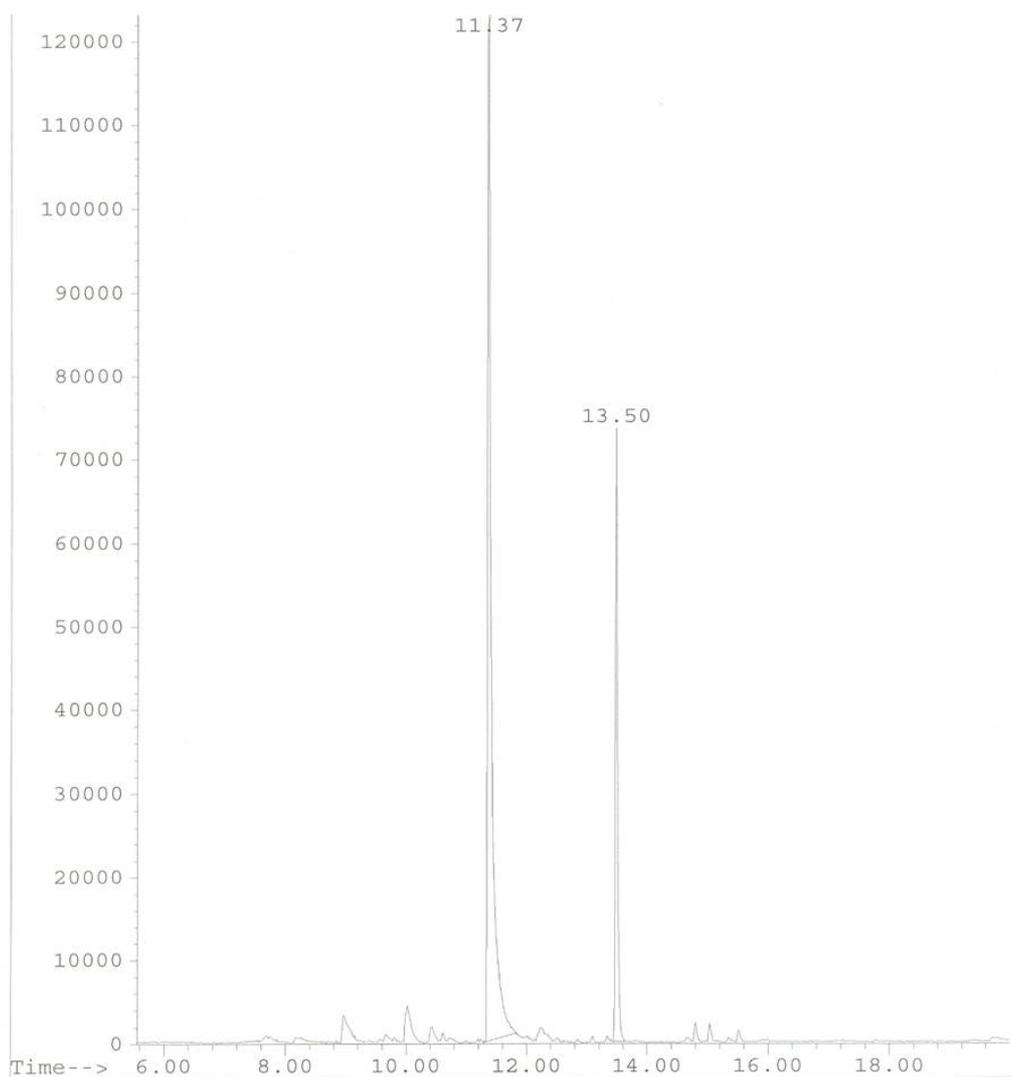


Figura 25. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de *Mentha rotundifolia*, en columna capilar de 5% metil fenil silicón de 30 mm x 0.25 mm, como fase móvil gas helio con flujo de 1.0 ml/minutos, con la técnica de ionización por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV para EM.

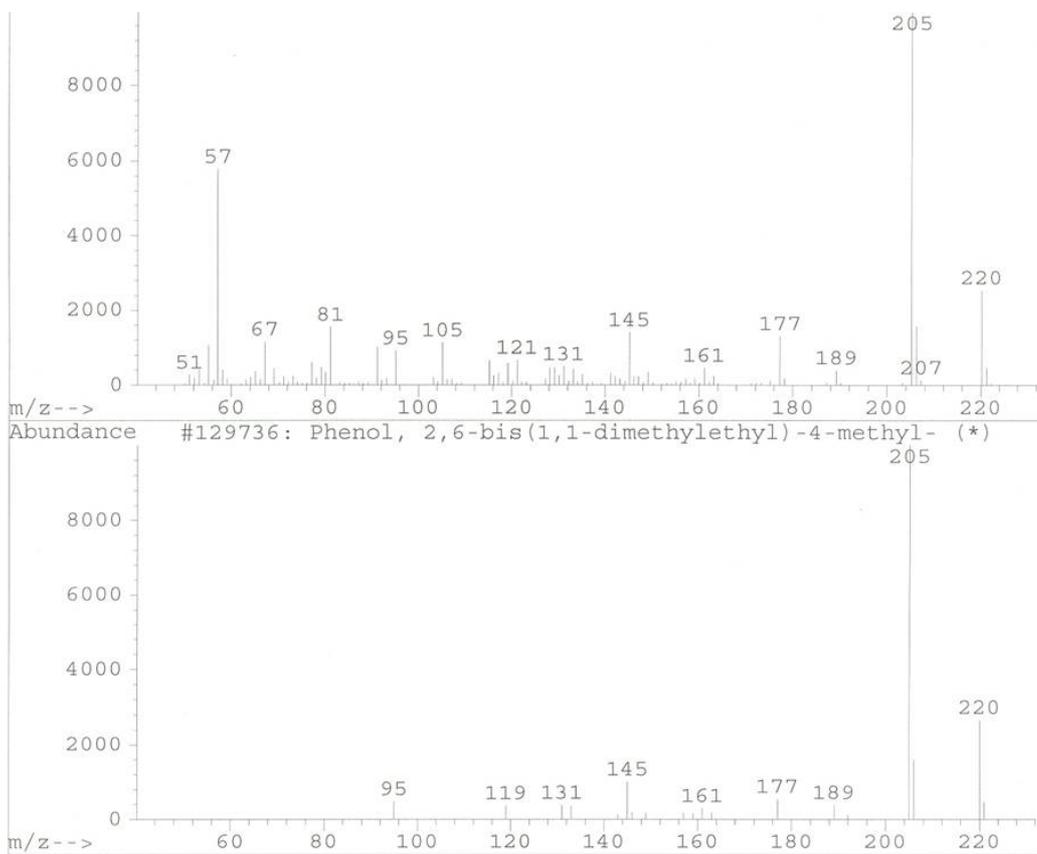


Figura 26. Espectro de masas de 3-decino con tiempo de retención de 11.37 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

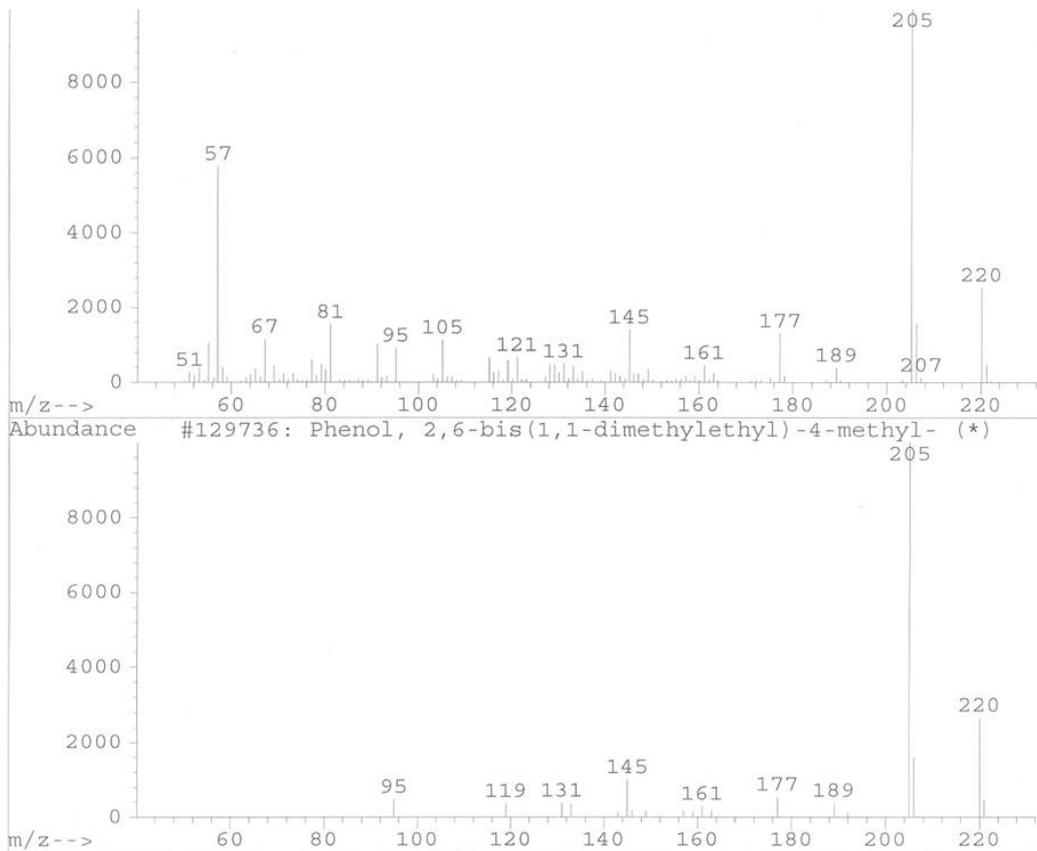


Figura 27. Espectro de masas de fenol, 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metil con tiempo de retención de 13.49 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

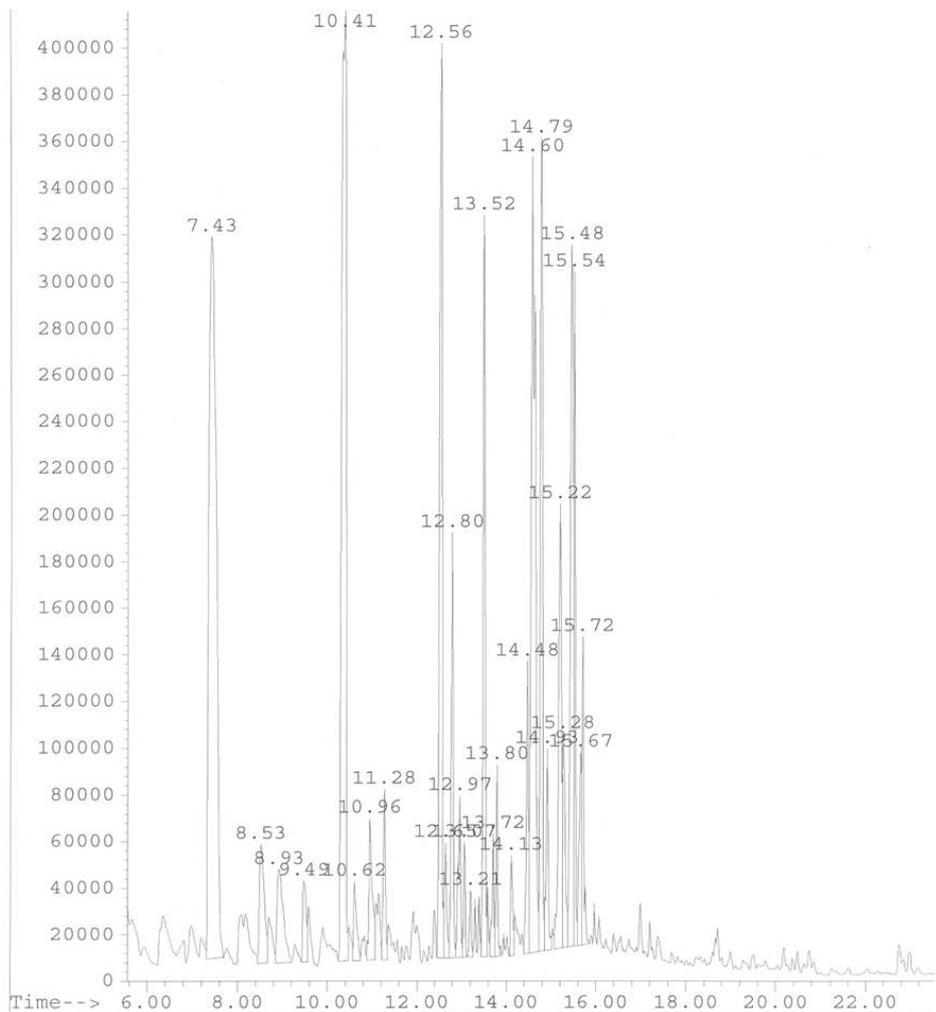


Figura 28. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de *Salvia elegans*, en columna capilar de 5% metil fenil silicón de 30 mm x 0.25 mm, como fase móvil gas helio con flujo de 1.0 ml/minutos, con la técnica de ionización por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV para EM.

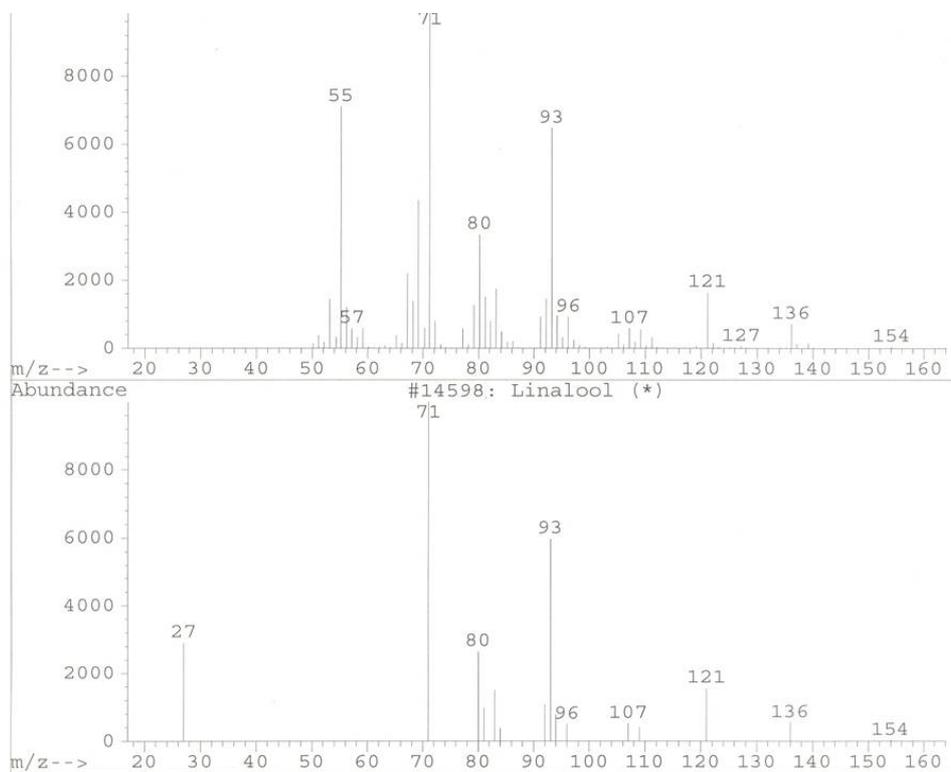


Figura 29. Espectro de masas de linalool con tiempo de retención de 7.42 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases, en (inferior).

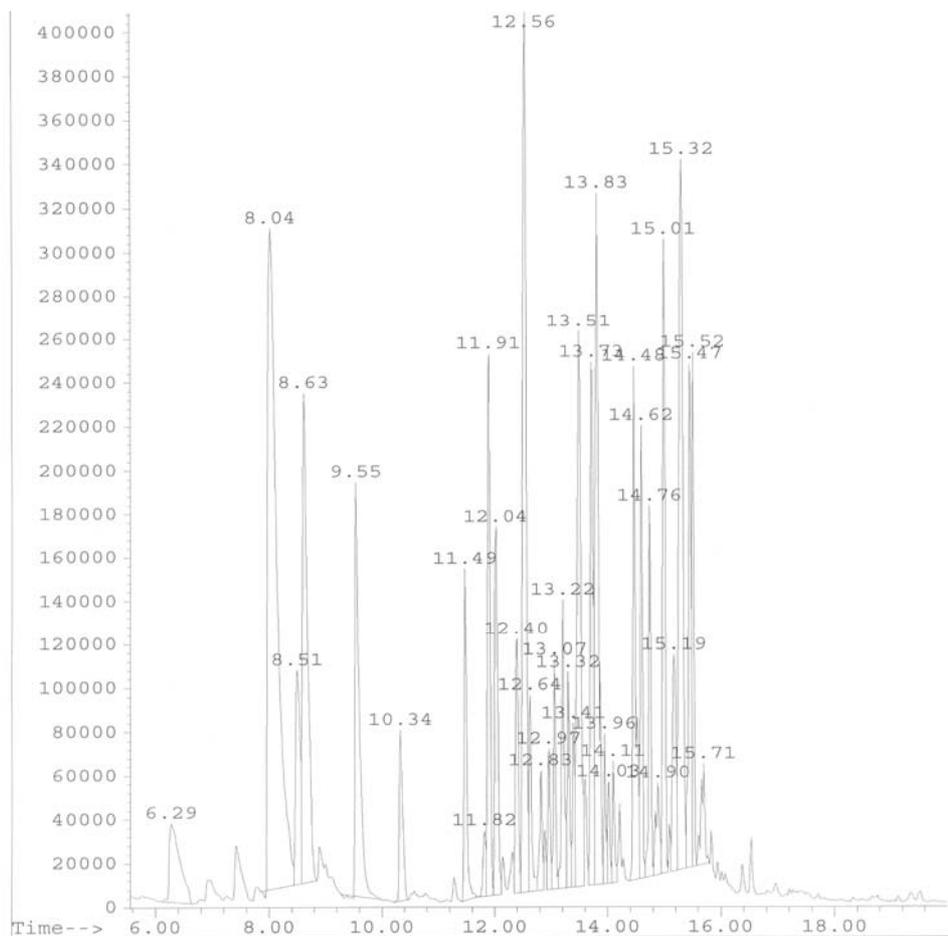


Figura 30. Cromatograma de CG/EM de los aceites esenciales de *Salvia microphylla*, en columna capilar de 5% metil fenil silicon de 30 mm x 0.25 mm, como fase móvil gas helio con flujo de 1.0 ml/minutos, con la técnica de ionización por impacto electrónico, con una energía de ionización de 70 eV para EM.

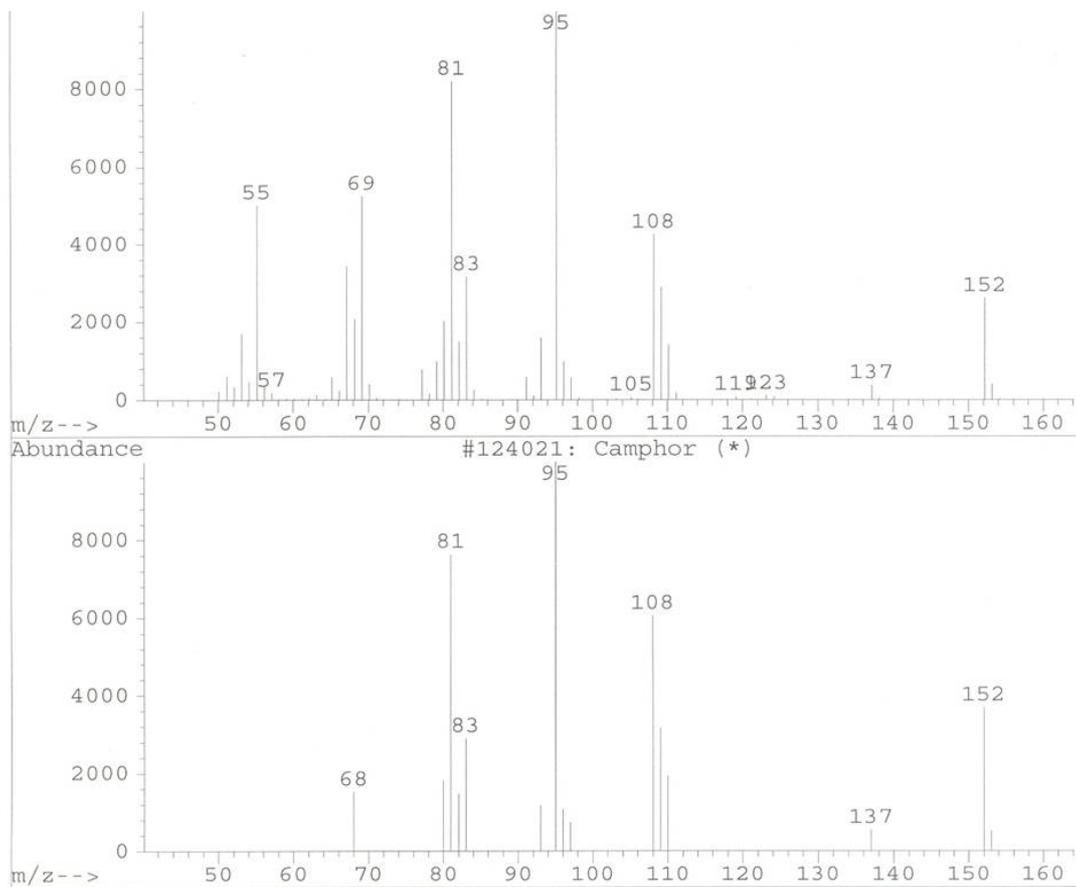


Figura 31. Espectro de masas de alcanfor con tiempo de retención de 8.02 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

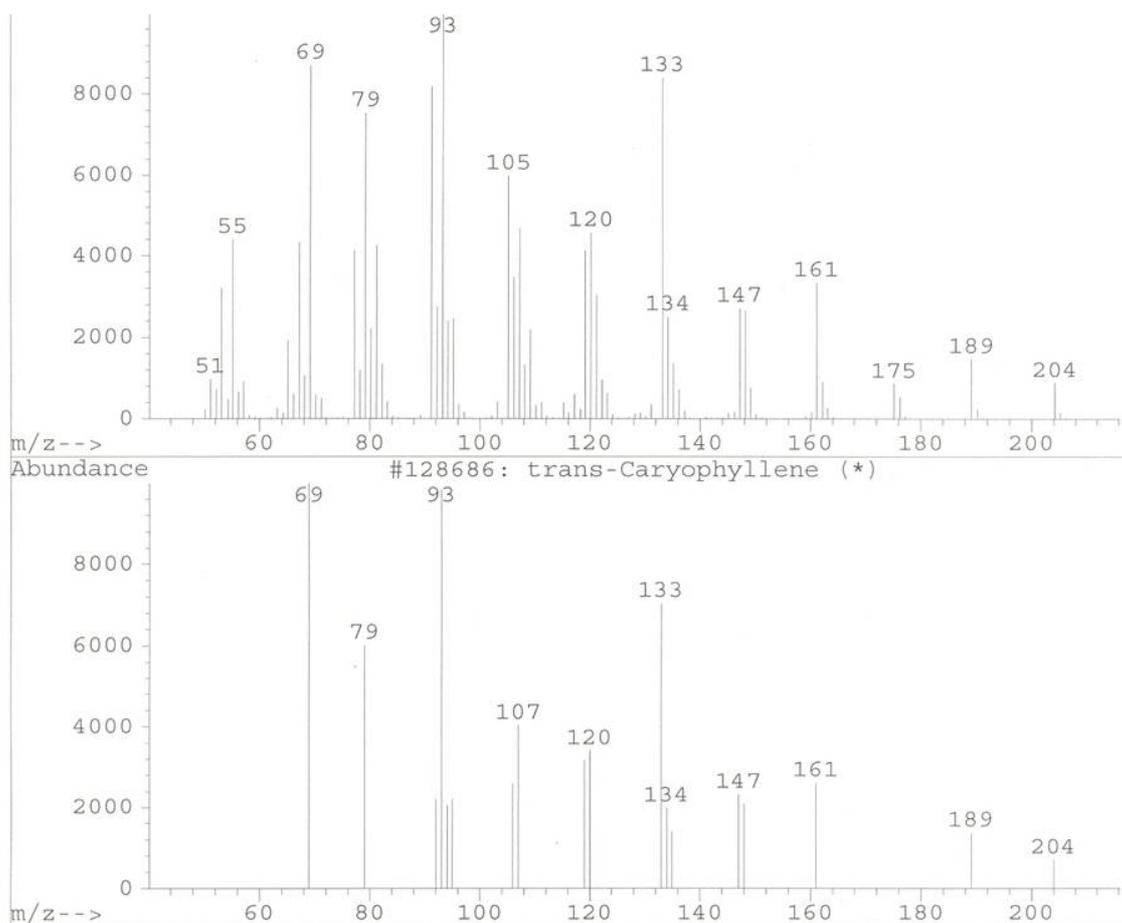


Figura 32. Espectro de masas de trans-cariofileno con tiempo de retención de 12.55 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

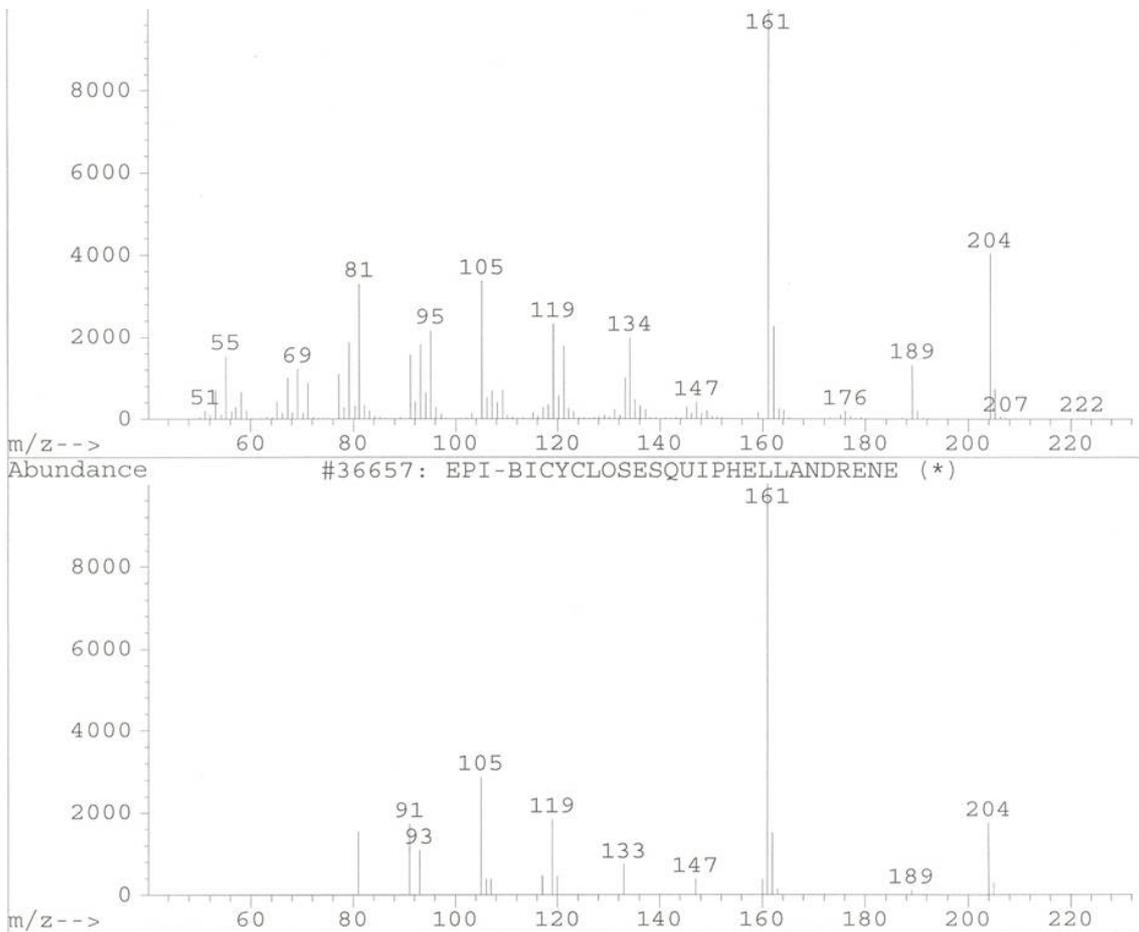


Figura 33. Espectro de masas del compuesto de epi-biciclosesquifelandreno con tiempo de retención de 15.31 minutos, (superior), disuelto en éter etílico, con la técnica de ionización por impacto electrónico con una energía de 70 eV, comparado con un espectro de la biblioteca digital del cromatógrafo de gases (inferior).

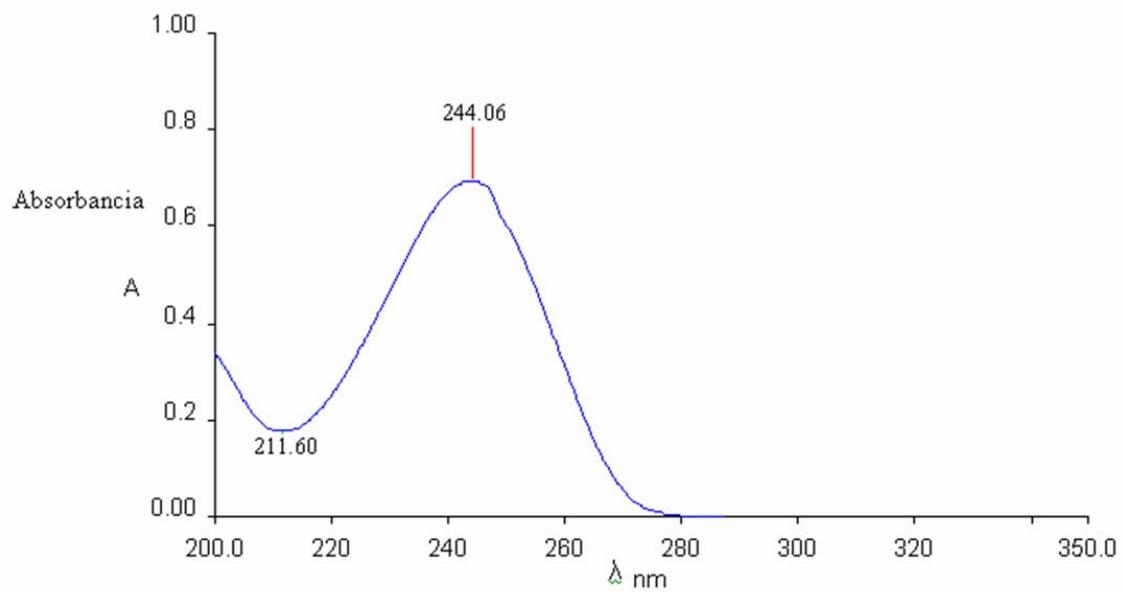


Figura 34. Espectro UV-Vis de pulegona.

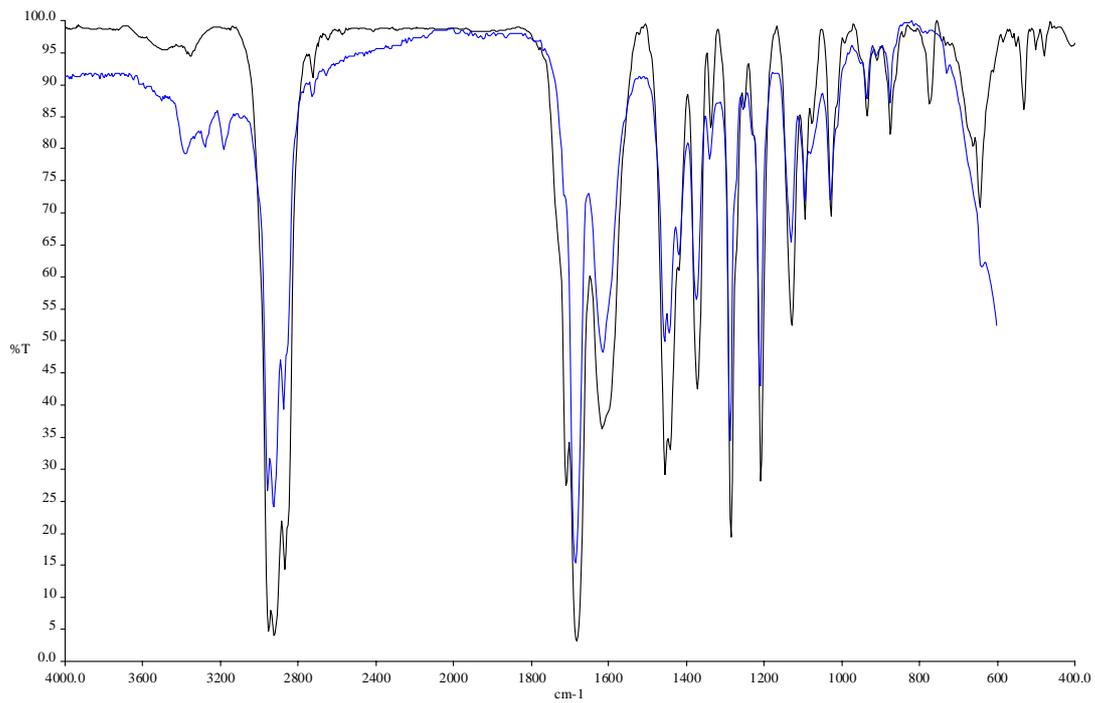


Figura 35. Espectro de infrarrojo de pulegona extraído de *Hedeoma drummondii* (color azul), comparado con el espectro de la biblioteca digital del espectro de infrarrojo (color negro).

Glosario.

Agua de tiempo: remedio acuoso que sustituye el agua que se toma a lo largo del día.

Algodoncillo: enfermedad frecuente en recién nacidos provocada por la infección en hongos en la mucosa bucal, presenta el aspecto de algodón, de ahí su nombre.

Anemia: estado de debilitamiento en que se ven afectados el volumen y/o calidad de la sangre.

Antiblenorrágico: agente que se usa contra la blenorrea (inflamación contagiosa de la mucosa genital).

Aperitivo: estimulante del apetito.

Apostema: golpe recibido en el interior del estomago, el afectado presenta enflaquecimiento, arrojando constante de sangre "molida", sea en forma de vómitos o al defecar.

Asma: respiración fatigosa y acelerada.

Barrida: método terapéutico que se utiliza para tratar varias enfermedades culturales; se usan ramas de diferentes especies con fuerte olor o color.

Bilis: padecimiento que se manifiesta por trastornos del aparato digestivo. Se reconocen como principales causas desencadenantes de la bilis emotivas críticas, sobre todo el miedo, ira, el susto y, con mucho mayor frecuencia el coraje.

Buche: tratamiento oral para afecciones de la boca y garganta, mediante el cual se hace un lavado con una infusión de plantas medicinales.

Caldeado: acción de aplicar rociados con el agua del cocimiento de algunas plantas en zonas afectadas, el agua debe de estar lo más caliente posible.

Calentura: fiebres generales.

Calor en el estomago: afección que se orina por asolearse demasiado tiempo, el calor se encierra en el cuerpo.

Cáncer: tumor maligno.

Caquético: relativo a la pérdida de peso progresivo.

Cashana: enfermedad cultural que se manifiesta debido a que la persona sufre un golpe brusco y fuerte o también por cargar objetos pesados.

Cataplasma: es una maceración del material vegetativo con una consistencia blanda que se aplica en la piel como calmante, emoliente o astringente.

Catarro constipado: popularmente es identificado como gripa caracterizada por secreción abundante de moco espeso.

Chincualo: granitos, erupciones en el cuerpo de los niños pequeños.

Chípil: designación que recibe el lactante o el hijo menor, cuando presenta ciertos trastornos orgánicos y de conducta, que suelen manifestarse durante el nuevo embarazo de su madre y/o en las primeras semanas del nacimiento de su hermano.

Cocimiento: así se llama cuando se pone a hervir desde el principio el agua y la parte de planta empleada.

Débil: falta de vigor orgánico o anímico que hace a las personas más propensas a enfermarse. Por lo común, el origen de la debilidad suele explicarse como resultado de una dieta deficiente o desequilibrada.

Depurativo: limpia la sangre.

Diabetes: enfermedad del metabolismo que se manifiesta por ineptitud para oxidar los carbohidratos.

Disentería: enfermedad infecciosa caracterizada por diarrea con masa de moco y sangre.

Dispepsia: digestión difícil y dolorosa.

Diurético: agente que aumenta la secreción de la orina.

Empacho: afección que resulta por comer demasiado, lo que no permite una digestión adecuada. Síntomas: inflamación en el estomago, diarrea y falta de apetito.

Enlechado: malestar estomacal en niños pequeños provocados por la leche, produce vomito y diarrea.

Espanto o susto: terminología popular que se designa a cualquier sintomatología relacionada con la aparición de difuntos, fantasmas y otras visiones. Las principales manifestaciones de este mal son la falta de apetito, decaimiento, somnolencia, inquietud tanto en la vigilia como en el sueño, palidez, tristeza y ataques de ira.

Estomáquico: agente que favorece la digestión.

Febrífugo: agente que favorece el descenso de la temperatura.

Infusión: consiste en poner material vegetal (hojas, raíces, etc.) en agua hirviendo, retirando éste del fuego inmediatamente.

Limpias: técnica usada para tratar enfermedades como el susto, mal aire, pasando sobre el cuerpo enfermo un ramo de plantas olorosas.

Macerado: consiste en poner material vegetal en agua a temperatura ambiente durante 12 horas o más.

Mal aire: padecimiento cultural que consiste en la introducción de un “aire” emanado de los difuntos o muertos.

Té: término general usado para las formas de preparación como cocimiento e infusión.

Tizana: sinónimo de té.

Tónico: agente que estimula, que da vigor.

Vulnerario: que cura llagas y heridas.