

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES  
ESENCIALES OBTENIDOS DE ACICULAS DE DOS ESPECIES DE PINOS**

**TESIS PROFESIONAL**  
PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

**MARITZA NATALY AMAYA GUTIÉRREZ**

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., NOVIEMBRE DEL 2011



# Universidad de Guadalajara

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

C. MARITZA NATALY AMAYA GUTIÉRREZ  
PRESENTE

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción: **TESIS** con el título: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE ACICULAS DE DOS ESPECIES DE PINOS"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director de dicho trabajo a la **Dra. Sandra Luz Toledo González**, y como asesor a la **Dra. Josefina Casas Solís**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 24 de noviembre, del 2011.



DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



M.C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

COORD-BIO-229/2011

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente





Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e informes**, opción **Tesis** con el título: "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE ACICULAS DE DOS ESPECIES DE PINOS**", que realizó el/la pasante **Maritza Nataly Amaya Gutiérrez** con número de código **399274107** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

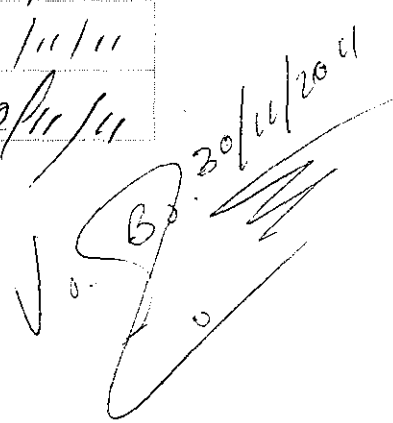
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente  
 Zapopan, Jal., 28 de Noviembre de 2011

  
 Dra. Sandra Luz Toledo González  
 Directora

  
 Dra. Josefina Casas Solís  
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado:	Fecha de aprobación
M. C. Margarita Bonilla Moreno		30/11/11
Dr. Mario Alberto Ruiz López		30/11/11
M.C. Rosa Maria Domínguez Arias Suplente		30/11/11
M.C. Dolores Marina Barragán Reynaga		30/11/11

  
 30/11/2011

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco profunda y eternamente a mi mamá Marisela, quien ha sido mi gran apoyo incondicional en mi vida personal y profesional... Gracias mami por darme la vida y la mejor herencia "El Estudio".

Existe ahora en mi vida un ser muy especial, mi pequeña Karely quien ha venido a darme esa fuerza encantadora y motivadora para continuar con nuevos proyectos de vida; gracias mi niña por darme la dicha y plenitud de ser madre y ser la luz de mi vida.

De igual manera le doy gracias al padre de mi niña, que se que nos cuida desde el cielo, por el tiempo que Dios nos permitió estar juntos para apoyarme y alentarme en continuar con mis estudios.

A mi padre Manuel y hermano Manuel les agradezco también por ser parte importante en mi vida.

A mis maestras hermosas que siempre me ayudaron y apoyaron en mi tesis y en cuestiones personales... Gracias maestra Sandra Luz Toledo, maestra Josefina Casas y maestra Rosa María Domínguez por tenerme paciencia en todo este tiempo y por ser un gran ejemplo en mi camino profesional.

Así mismo agradezco a todos mis sinodales por su tiempo y dedicación para mejorar mi trabajo.

A la maestra Dolores Marina Barragán agradezco por ser mi tutora y orientarme a lo largo de la carrera.

Sin embargo, muy en especial te doy gracias a ti mi Padre Celestial por ser la fuerza principal que nos motiva a emprender un nuevo día, por estar siempre a mi lado bendiciendo mi camino.

## INDICE

	Pág.
Lista de figuras	i
Lista de cuadros	ii
Resumen	iii
Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Uso de las plantas medicinales	3
2.2. Función de los aceites esenciales en las plantas	4
2.3. Procesos de extracción de aceites esenciales	5
2.4. Descripción botánica de los pinos	6
2.5. <i>Pinus douglasiana</i> Martínez	9
2.6. <i>Pinus pseudostrobus</i> Lind	11
2.7. Mecanismo de acción de los antibióticos y la resistencia de las bacterias	13
2.8. Toxicidad de los antimicrobianos	14
2.9. Métodos para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos	15
2.10. Interpretación de la susceptibilidad de los antibióticos	16
2.11. Características generales de los microorganismos	17
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivo general	22
6. Objetivos particulares	22
7. Metodología	23
7.1. Selección de especies de pinos	23
7.2. Obtención de los aceites esenciales de pinos	23
7.3. Cepa utilizadas	24
7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de la dilución en tubo	25
8. Resultados	28
9. Discusión	35
10. Conclusiones	40
11. Bibliografía	41

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Acículas de <i>P. douglasiana</i> Martínez	10
Figura 2. Acículas de <i>P. pseudostrobus</i> Lind	12
Figura 3. Conos de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lin	13
Figura 4. Extractor de aceites esenciales por el método de arrastre de vapor	24
Figura 5. Método de dilución en tubo para determinar la CMI de los aceites de pinos, donde se observa turbidez	26
Figura 6. Cuantificación de UFC/mL	27
Figura 7. Inhibición de <i>Salmonella</i> Enteritidis a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. pseudostrobus</i>	29
Figura 8. Inhibición de <i>S. aureus</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. pseudostrobus</i>	29
Figura 9. Inhibición de <i>E. coli</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. pseudostrobus</i>	30
Figura 10. Inhibición de <i>S. aureus</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. douglasiana</i>	31
Figura 11. Inhibición de <i>E. coli</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. douglasiana</i>	32
Figura 12. Inhibición de <i>S. Enteritidis</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. douglasiana</i>	32
Figura 13. Inhibición de <i>C. albicans</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>P. douglasiana</i>	33

## LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Concentraciones de los dos aceites esenciales	25
Cuadro 2.	Acción del aceite esencial de <i>Pinus pseudostrobus</i> Lind	34
Cuadro 3.	Acción del aceite esencial de <i>Pinus douglasiana</i> Martínez	34

## RESUMEN

Ante la resistencia de ciertos microorganismos patógenos a la medicina alópata, se han enfocado investigaciones en descubrir nuevas alternativas que sean eficaces contra los microorganismos, por ello la medicina natural es una buena opción ya que existe gran diversidad de plantas que presentan una actividad antimicrobiana por lo que es importante evaluar dicha actividad. Por ejemplo algunos aceites esenciales de las plantas son excelentes para combatir a los microorganismos.

En el presente trabajo se evaluaron la actividad antimicrobiana de dos especies de pinos, *Pinus pseudostrobus* y *Pinus douglasiana*, en el cual se pusieron a prueba cuatro microorganismos de importancia médica, tres bacterias y una levadura (*E. coli*, *S. aureus*, *S. Enteritidis* y *C. albicans*).

Se manejaron diferentes concentraciones en cada aceite (desde 50% hasta 0.02%) por cada microorganismo, se realizaron por el método de dilución en tubo, y se dejaron en la incubadora a 37°C por 24 horas.

Una vez examinado los tubos se observó que el aceite esencial con mayor actividad antimicrobiana fue el de *Pinus douglasiana* Martínez ya que los cuatro microorganismos utilizados fueron susceptibles y además presentó mayores porcentajes de inhibición en comparación con el aceite de *Pinus pseudostrobus* Lind donde *C. albicans* fue resistente y los demás microorganismos fueron sensibles pero con un bajo porcentaje de inhibición.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se podrá continuar investigando sobre la actividad antimicrobiana de estos dos aceites esenciales de pinos, para determinar las dosis efectivas en animales de prueba y ver los efectos biológicos que se puedan presentar, así mismo como establecer una dosis estándar ante enfermedades que provoquen dichos microorganismos.



# EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES OBTENIDOS DE ACICULAS DE DOS ESPECIES DE PINOS

## 1. INTRODUCCIÓN

Las diferentes condiciones fisiográficas, ecológicas y climáticas son las principales causas que han dado lugar a la existencia de una gran diversidad de elementos florísticos que conforman la cubierta vegetal de México, siendo una de las más ricas y variadas del planeta, varía desde la existencia de ecosistemas áridos hasta ecosistemas tropicales, abarcando los diferentes tipos de pastizales, los bosques caducifolios y los bosques de coníferas. Dentro de los bosques de coníferas, los pinos son catalogados como el primer género de árboles en distribución y área, que ocurren de manera natural prácticamente en todos los estados de México, a excepción de Tabasco, Campeche y Yucatán (Bermejo y Pontones, 1994).

Actualmente se han reportado aproximadamente cien especies de pinos existentes en el planeta, Norteamérica es especialmente rica con un total de 65 especies, de estas 38 crecen al norte de México y 43 existen en México y América Central. Varias especies están distribuidas a través de la frontera entre los EE.UU. y México. Las 9 especies que se encuentran en América Central también son nativas en México, por lo que en el país se cuentan con más especies de pinos que en ningún otra parte del mundo (Farjon, *et al*, 1997). El resto de los pinos se encuentran distribuidos en el continente europeo (Koukos, *et al*, 2000).

Los pinares en México representan el grupo de especies que sustentan la industria forestal para la elaboración e industrialización de uno de los productos más importantes, la celulosa y papel; además de madera aserrada para la construcción de muebles, postes, casas, instrumentos musicales y artesanías (Bermejo y Pontones, 1994).

Por otra parte a nivel regional diversas especies tienen usos no maderables que representan buenos ingresos económicos como la cosecha de semillas comestibles (*Pinus cembroides*, *P. nelsonii* y *P. discolor*), usos ornamentales y medicinales (Bermejo y Pontones, 1994)

El estado de Jalisco cuenta con 85,966 Ha de pino natural y 926,428 Ha de pino-encino, éstas se aprovechan como madera y representan un 85 % de la tala (PRODEFO 2003); en la región de la Sierra Occidental existen 10 especies, la mayoría son utilizadas con fines maderables.

En especies como *Pinus sylvestris*, *P. caribaea* y *P. tropicalis* se ha demostrado actividad farmacológica de sus aceites, sin embargo en *Pinus douglasiana* y *P. pseudostrobus*, presentes en el estado de Jalisco no se tiene información documentada de ésta aplicación. Debido a las características de los aceites, varios estudios reportan sobre las diferentes propiedades, tales como insecticidas, antioxidante y efecto antibacteriano, por lo que dicha actividad no se puede atribuir a un compuesto químico en particular. Esta actividad puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida. Sin embargo en estudios recientes, se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados "terpenoides" (Maguna, et al, 2006).

En virtud de que en la composición química de los aceites esenciales de pino se encuentran principalmente los terpenoides, se considera útil investigar el efecto antimicrobiano de éstos aceites frente a microorganismos patógenos (Zekaria, 2007), como *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Uso de las plantas medicinales.

Las plantas desde la antigüedad, han representado una fuente esencial en la elaboración de productos medicinales, principalmente de los países en desarrollo (Olaya y Méndez, 2003). Se ha demostrado un efecto farmacológico importante de éstos productos en enfermedades dermatológicas, respiratorias, del sistema digestivo y circulatorio, entre otras; principalmente de origen microbiológico (Martínez, *et al*, 2006).

Las plantas medicinales de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1979, define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Oliveira, *et al*, 2005).

En México, existe una amplia diversidad de plantas medicinales cuyo efecto terapéutico compite y/o complementa tratamientos en algunos procesos patológicos (Martínez, *et al*, 2006). Las plantas y productos medicinales, ejercen una acción global sobre el organismo por la interacción de sus principios activos, que tienden a estimular acciones de protección y regulación de las funciones metabólicas y presentan menores efectos secundarios que algunos medicamentos de síntesis química (Olaya y Méndez, 2003).

Las plantas sintetizan dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios. Los primarios son sustancias fundamentales para la nutrición, la estructura y la energía (Olaya y Méndez, 2003). Los metabolitos secundarios con frecuencia actúan como agentes biológicos contra los depredadores, parásitos y enfermedades o pueden cumplir con las funciones fisiológicas intrínsecas para su producción. Los metabolitos secundarios incluyen diversas clases de pequeñas moléculas, tales como alcaloides, terpenos, glicósidos o péptidos. (Jenke-Kodama, *et al*, 2008).

## 2.2. Función de los aceites esenciales en las plantas

Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos de aromas volátiles tales como terpenoides (monoterpenoides, sesquiterpenoides), alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles. Son sustancias olorosas, que se almacenan en distintos órganos de la planta y que están presentes en las hojas, corteza y flores (Zekaría, 2007).

Schricket y Bittner en el 2001 establecieron experimentalmente que los aceites esenciales tienen un papel ecológico, alguno de ellos como inhibidores de la germinación, protección contra los depredadores e intervienen como hormonas en la polinización atrayendo a los insectos, además de que regulan la transpiración.

De las plantas con propiedades medicinales y que contienen aceites esenciales, se extraen para la preparación de medicamentos que funcionan como analgésicos, sedantes, antiespasmódicos y antibióticos, por lo que numerosas investigaciones se han enfocado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales (García, *et al*, 2006). Por ejemplo, de las hojas de la canela (cinamaldehído) y el orégano (carvacrol) se obtienen productos que presentan actividad antimicrobiana (Zekaría, 2007).

Los aceites esenciales se pueden aplicar en forma interna a través del tubo digestivo e inhalaciones y de forma externa como baños y cataplasmas, ya que son capaces de penetrar a la piel y las mucosas de vías respiratorias. (Zekaría, 2007).

### **2.3. Procesos de extracción de aceites esenciales.**

Los aceites esenciales se pueden extraer mediante diferentes métodos como: expresión, arrastre con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.

-En la expresión, el material vegetal es exprimido mecánicamente para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para la extracción de esencias cítricas (Barindelli, 2010).

-En la destilación por arrastre con vapor de agua, por efecto de la temperatura del vapor (100 °C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial (Sánchez, 2006). En la parte inferior del tanque extractor se coloca agua, posteriormente una parrilla que soporta el material vegetal, que debe ser fresco y cortado en pequeños trozos (Barindelli, 2010). La salida de vapores, que puede ser lateral al tanque o ubicarse en la tapa del mismo, pasa a un serpentín ó espiral enfriado por agua y posteriormente, el vapor condensado y el aceite esencial se recolectan en un separador de fases, el cual debe de tener la suficiente altura y diámetro para evitar la pérdida de aceite y además permita la recolección del mismo (Sánchez, 2006).

-En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes como alcohol o cloroformo. Estos compuestos solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias.

-En el método de enflorado o enfleurage, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con una grasa. La esencia es solubilizada en la grasa que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa (el concreto) la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. En general se recurre al agregado de alcohol

caliente a la mezcla y su posterior enfriamiento para separar la grasa y el extracto aromático. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

-El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más eficiente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO<sub>2</sub>). Las esencias son así solubilizadas y arrastradas, el fluido supercrítico que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente. Finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción (Barindelli, 2010).

#### **2.4. Descripción botánica de los pinos**

Los pinos son árboles de follaje persistente, con hojas de tres tipos:

- a) Las primordios, notables en las plántulas, árboles jóvenes y rara vez se les observa sobre madera vieja; son de forma lineal, lanceolada, con borde aserrado, solitarias, insertas en forma espiral a lo largo del hipocótilo o de las ramas jóvenes.
- b) Brácteas, de lámina reducida a pequeñas brácteas, de forma triangular, con borde entero, insertas en la axila de brotes cortos;
- c) Hojas adultas, aciculares o triangulares, insertas en los nudos y se agrupan en acículas de 2, 3 ó 5 formando fascículos, rara vez mayor número, ocasionalmente solitarias, envueltas en su parte baja por una vaina membranosa, persistente en el árbol de dos años o más, manteniendo al árbol con follaje persistente (Vidal, 1962).

Las flores masculinas aparecen en los extremos de los brotes de color amarillo anaranjado, sobre las que van insertas en espiral flores estaminadas compuestas por dos antenas y un conectivo en forma de cuña.

Las flores pistiladas, verdosas o púrpuras, colocadas en la axila de una pequeña bráctea producen dos óvulos internamente, cerca de la base. Después de la fertilización el cono adquiere desarrollo y las escamas leñosas se cierran fuertemente, permaneciendo comprimidas, hasta la madurez, guardando en su interior las semillas.

Los principales elementos de un cono los constituyen las escamas (carpelos), unidas al eje central leñoso siguiendo una línea espiral; estas escamas, llevan dos depresiones u ombligos en los que van colocadas las semillas. La parte expuesta al exterior de la piña, el apófisis, presenta por lo común una forma romboide y presenta un color más claro que el resto del cono; la superficie lisa, rugosa, con hoyos o surcos.

El cono se forma en la primavera, pero el polen alcanza los óvulos en la primavera del segundo año; a partir de este momento alcanza rápido desarrollo, madurando sus granos a fines de verano y otoño.

La semilla es una nuez de tamaño variable; además de germen contiene una almendra con reservas amiláceas, aceitosas, que en varias especies las hace apetecibles y, por lo tanto, frecuentemente se usan en la alimentación humana. En la mayoría de las especies, la semilla, de pequeño tamaño, esta recubierta por una envoltura negruzca, marrón, que se prolonga por una ala de tamaño variable; de mayor longitud que el grano en algunas, en otras rudimentaria o bien puede encontrarse ausente (Vidal, 1962).

De algunos componentes de los órganos de las plantas se pueden obtener productos medicinales con actividad terapéutica, por ejemplo, en los pinos, los terpenoides, son el principal compuesto del aceite, y pueden constituir en su composición química hasta un 85% del total, mientras que el resto de los componentes se presentan como trazas (Zekaría, 2007).

Existen varios estudios farmacológicos y bioquímicos del aceite esencial del pino marítimo (*Pinus pinaster* Sol) y el pino silvestre (*Pinus sylvestris* L), que se obtuvieron de las hojas y brotes. En la farmacopea europea su uso está

indicado para tos, bronquitis agudas y crónicas y en general para todas las afecciones de las vías respiratorias (menos asma bronquial y tosferina). También se recomienda en caso de reumatismo y neuralgias (Schrickel y Bittner, 2001).

Por su parte Macchioni, *et al*, (2002) evaluaron la actividad acaricida del aceite esencial de cuatro especies de *Pinus* (*P. pinea* L., *P. halepensis* Mill., *P. pinaster* Soil y *P. nigra* Arnold), sobre una plaga (*Tyrophagus putrescentiae*) que ataca productos alimenticios almacenados. Los cuatro tipos de aceites esenciales dieron resultados favorables, pero el aceite de *P. pinea* fue el que registro al 100 % actividad acaricida.

Uno de los aceites esenciales de pino más estudiado y más conocido por sus efectos biológicos hacia la salud, es el *Pinus sylvestris*, mayormente difundido en países europeos, que tienen la propiedad de desinfectante, expectorante y antiséptico, utilizado para el sistema respiratorio y en el sistema genitourinario (Frescuet, *et al*, 1996)

Sin embargo, el mecanismo de acción específico de estos compuestos aun no ha sido claramente caracterizado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular bacteriana donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos bactericidas y bacteriostáticos (Maguna, 2006).



## 2.5. *Pinus douglasiana* Martínez.

Los nombres comunes como se conoce a *P. douglasiana* Martínez es ocote, pinabete, pino blanco y pino real.

El tronco del árbol es recto de hasta 20-45 m de alto y 80 a 100 cm de diámetro a la altura del pecho (1.30 M) (Farjon, *et al*, 1997); la copa es redondeada y densa (Martínez, 1992). Esta especie de pinos habita en pinares, bosque de coníferas y bosque de pino-encino de montaña, en zonas moderadamente calientes a templadas. Su altitud es de: (1100-2700 m) (Farjon, *et al*, 1997).

Se distribuye principalmente en Jalisco, Michoacán, México y norte de Morelos extendiéndose hasta el norte de Nayarit y la zona limítrofe entre Sinaloa y Durango, también localizada en Guerrero y Oaxaca (Farjon, *et al*, 1997). Esta especie (*P. douglasiana*) se encuentra dentro de la categoría de especies no amenazadas (SEMANART, 2002).

La corteza en el tronco es gruesa, escamosa, dividida en largas e irregulares placas y fisuras profundas, de color café-rojizo que con el tiempo se vuelve gris-café. Las ramillas son rugosas, con prominentes pero no persistentes bases de las hojas (de los fascículos), de color café oscuro o gris oscuro; fascículos extendidos y un poco flácidos, persistiendo 2-2.5 años (Farjon, *et al*, 1997).

Las acículas se agrupan en fascículos de 5, raro 4 o 6, de 22-35 cm de longitud y 0.7-1.2 mm de ancho, (Figura 1) son rectas, laxas o en algunas ocasiones más rígidas (Farjon, *et al*, 1997); con bordes finamente aserrados, de color verde claro, algo amarillento y brillantes (Martínez, 1992). Las ramas están extendidas, agrupadas en la parte superior del tronco (Martínez, 1992).



Figura 1. Acículas de *P. douglasiana* Martínez.

Sus conos son largamente ovoides, simétricos, reflejados, ligeramente encorvados, atenuados hacia el ápice, de color moreno rojizo, opacos y caedizos; de 7.5 a 10.5 cm de largo. Se presentan solitarios (Farjon, *et al*, 1997) ó en grupos de 3 a 5, sobre pedúnculos de 12 mm, los cuales son oblicuos y quedan adheridos al cono cuando este cae (Martínez, 1992). El número de escamas del cono es de 110-130, abriendo pronto, son rígidas, lignificadas; la apófisis generalmente levantada o en ocasiones plana y transversalmente aquillada (Farjon, *et al*, 1997).

Sus semillas son oscuras, casi ovoides, de 5 mm; con ala de 25 mm de largo, por 8 mm de ancho y de color moreno (Martínez, 1992).

## 2.6. *Pinus pseudostrobus* Lind

Los nombres comunes que se le dan a *P. pseudostrobus* Lind es pino blanco, pino chalmaite, pino lacio y pino liso. Su altitud es de: 1900-3000 m (Farjon, *et al*, 1997). El crecimiento del tronco del árbol es recto de hasta 20 a 40 m de alto, 80 a 100 cm de diámetro.

Su distribución es principalmente en el eje volcánico transversal (centro de México) y hacia el sur hasta el oeste de Honduras, Guatemala y el Salvador, hacia el norte existen poblaciones disyuntas en Sinaloa/Durango así como en el sureste de Coahuila/Nuevo León. Esta especie habita en pinares y bosques de pino-encino, es muy común y se encuentra mezclada con otras especies de pino o con otras coníferas. (Farjon, *et al*, 1997).

*P. pseudostrobus* se encuentra dentro de la categoría de especies no amenazadas, según la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002).

La corteza es lisa durante mucho tiempo, en la vejez es áspera y agrietada (Martínez, 1992). Gruesa en el tronco, escamosa, con placas alargadas y fisuras longitudinales profundas, de color café-oscuro o café-gris (Farjon, *et al*, 1997). Las ramillas son delgadas lisas, con las bases de las hojas (de los fascículos) pequeñas y recurrentes, siendo glaucas primero; con fascículos o más frecuentemente flácidos hasta casi péndulos; persistiendo por 2 a 3 años (Farjon, *et al*, 1997).

Sus acículas se agrupan de 5, de 17 a 24 cm de largo, muy delgadas, triangulares y flexibles (Figura 2), de color verde intenso, a veces con ligero tinte amarillento, o glauco, finamente aserradas, con los dientecillos uniformes (Martínez, 1992).



Figura 2. Acículas de *Pinus pseudostrobus* Lind.

Los conos se encuentran solitarios o en pares, en pedúnculos cortos y robustos, dejando algunas escamas basales en la ramilla cuando caen (Farjon, *et al*, 1997), por lo general son ovoides o largamente ovoides, de 8 a 10 cm., a veces más, de color café claro, amarillentos o morenos, extendidos, muy levemente encorvados, un poco asimétricos (Martínez, 1992).

El número de escamas del cono es de 140 a 190, abriendo gradualmente, por lo general son gruesas y lignificadas; la apófisis de ligera a fuertemente levantadas, sobre todo en un lado del cono transversalmente aquilladas, (Figura 3), de color café opaco que en el tiempo se vuelva grisáceo; con el umbo obtuso (Farjon, *et al*, 1997).

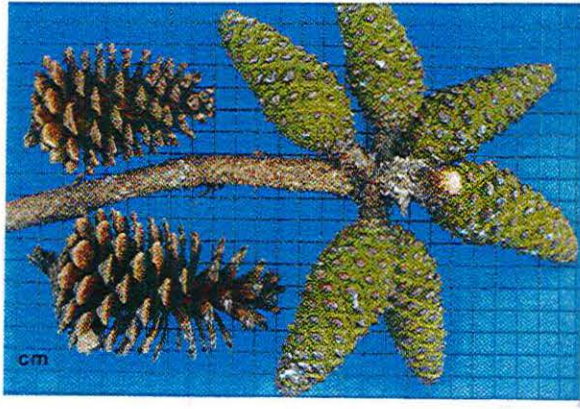


Figura 3. Conos de *Pinus pseudostrobus* Lind, a la izquierda se observan conos maduros que se han desprendido de la ramilla, y a la derecha se observan conos inmaduros que continúan en la ramilla.

Las semillas son vagamente triangulares, oscura, de unos 6 mm., con ala de unos 23 mm de largo por 6 a 9 de ancho (Martínez, 1992).

## **2.7. Mecanismo de acción de los antibióticos y la resistencia de las bacterias.**

En la actualidad, el consumo (uso y/o abuso) de los antibióticos convencionales influye en las resistencias, no sólo de los microorganismos patógenos, sino también de los saprofitos y oportunistas, por lo que ahora han disminuido su eficacia de algunos grupos antibacterianos (betalactámicos, aminoglucósidos, glucopéptidos, macrólidos y lincosamidas, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol) (Pérez, 1998), esto sugiere a buscar nuevas alternativas de antimicrobianos naturales dentro del campo de la etnobotánica, éstos no presentaran mayores efectos tóxicos en el organismo (Maguna, *et al*, 2006).

Para inhibir a los microorganismos, los antibióticos deben atravesar la barrera superficial de la bacteria y modificar las estructuras o mecanismos bioquímicos que le son necesarios para multiplicarse o sobrevivir. Los mecanismos de acción de los antibióticos son diversos, algunos de los mas comunes son impedir la síntesis de ácidos nucleicos, de proteínas o de la pared celular o

alterando la membrana celular del microorganismo sobre la que actúan (Pérez, 1998).

Las bacterias y demás microorganismos tienen la capacidad de adaptarse y desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos (Pérez, 1998). Muchos antimicrobianos son derivados de microorganismos, y por lo tanto su resistencia es un fenómeno natural. Los microorganismos que inicialmente pierden el sitio diana a un antimicrobiano se dicen que poseen una resistencia natural o intrínseca (Noa, 2004).

En otros la resistencia es adquirida, debido a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de recombinación genética. La primera ocurre por selección de las mutantes resistentes (rifampicina, macrólidos) (Pérez, 1998); y en la recombinación se transfieren los genes entre bacterias (conjugación, transformación, transducción y transposición) (Noa, 2004) mediados por plásmidos, transposones o integrones (Pérez, 1998).

## **2.8. Toxicidad de los antimicrobianos**

La toxicidad de los antimicrobianos puede provocar efectos adversos en el organismo, como es el caso de las cefalosporinas que pueden provocar hipoprotrombinemia, trombocitopenia y disfunción plaquetaria.

Con las penicilinas orales son frecuentes los trastornos gastrointestinales. También pueden presentarse hipoplasia medular, granulocitopenia, hepatitis, trastornos de agregación plaquetaria, convulsiones y reacciones locales a las inyecciones intramusculares (Mendoza, 2002).

Los efectos adversos de los aminoglucósidos son nefrotoxicidad y ototoxicidad, además de bloqueo de la unión neuromuscular.

En cuanto a las tetraciclinas se presentan reacciones de hipersensibilidad, erupciones morbiliformes, fotosensibilidad, decoloración de dientes y huesos en

los niños menores de ocho años e hipoplasia de la dentina, así como retardo de crecimiento óseo (en infantes prematuros) (Mendoza, 2002).

La clindamicina produce náuseas y dolor abdominal, erupción dérmica y anafilaxia. También produce diarrea tóxica y colitis pseudomembranosa, así como trombocitopenia y agranulocitosis (Mendoza, 2002).

La toxicidad de los antimicóticos suele actuar sobre enzimas hepáticas y causar hepatitis fulminantes, porque el mecanismo descrito compromete funciones que dependen de la membrana, en la que puede haber otras enzimas. Así, se altera el transporte de nutrientes y la síntesis de quitina, lo que puede inhibir el crecimiento (Tapia, 2005).

La toxicidad presenta una diferencia importante entre los dos grupos de azoles, debido a su selectividad. En consecuencia, los imidazoles son más potentes sobre las células pero son más tóxicos. Por ejemplo, el ketoconazol inhibe la síntesis de testosterona en concentraciones 100 veces más bajas que el fluconazol; a su vez, hay menos actividad intrínseca de los triazoles ante *Candida albicans* y se necesitan concentraciones mínimas inhibitorias más altas; por eso, muchos de estos fármacos, como el clotrimazol, se utilizan en formulaciones tópicas y pueden tener un efecto fungicida en el sitio de infección. Los efectos adversos son náuseas, anomalías endocrinológicas (irregularidad menstrual, ginecomastia en hombres) y alteraciones de las pruebas hepáticas, que es uno de los efectos más frecuentes (Tapia, 2005).

## **2.9. Métodos para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos**

Existen pruebas para determinar si los aceites procedentes de plantas tienen actividad antimicrobiana, estas consisten en la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que se define como la mínima concentración del aceite esencial de la planta que inhibe el desarrollo de una bacteria, junto a la CMI es necesario evaluar el efecto bactericida del aceite sobre una bacteria que es la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Esta se define como la menor concentración del aceite que reduce al 99.9% el número de bacterias del

inóculo original. Esta prueba se realiza por el método de dilución en tubo, donde se observa crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de la sustancia a probar (aceite esencial). Otro, es en placa colocando en penicilindros, diferentes dosis de la sustancia a probar contra el microorganismo en cuestión para determinar el efecto antimicrobiano mediante halos de inhibición (Díaz, *et al*, 1999).

## **2.10. Interpretación de la susceptibilidad de los antibióticos**

La información sobre la dosis de antibióticos, la zona de infección, y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que se presentan en las colonias de bacterias y los resultados de estudios clínicos son usados para seleccionar la dosis eficaz contra determinado patógeno.

Los datos de los puntos de inhibición de las pruebas de la susceptibilidad antimicrobiana son publicados en los documentos del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) y se actualizan anualmente según sea necesario.

Actualmente hay 3 categorías de interpretación que se utilizan para la presentación de informes de resultados de las pruebas de la susceptibilidad de antibióticos de un microorganismo determinado:

1. Susceptibilidad: El microorganismo que produce una infección es muy probable que responda al tratamiento con una dosis estándar del antibiótico indicado.
2. Intermediario: estos resultados son generalmente considerados como el indicio de opciones terapéuticas no útil, similar a la categoría de resistencia con fines terapéuticos ó pueden responder al tratamiento.
3. Resistencia: El microorganismo no responde a la terapia aplicada.  
(Audrey, 2009).



## 2.11. Características generales de los microorganismos.

### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*.

Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de microbiota normal, pero cuando aumenta el número total de la bacteria puede causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, principalmente diarrea (Rodríguez, 2002).

*E. coli* presenta sensibilidad a diferentes tipos de antibióticos: cefotaxima, cefazolina, ácido nalidíxico, ácido pipemídico, norfloxacino y ciprofloxacino (Alos, *et al*, 1993); fosfomicina, cefalosporina (1ª generación) y aminoglicosidos. Sin embargo, ha adquirido resistencia a sulfonamida (Mendoza, 2002).

### *Salmonella Enteritidis*

El género *Salmonella* se ubica dentro del orden *Enterobacteriales* y la familia *Enterobacteriaceae*. Sus miembros son bacilos Gram negativos generalmente móviles por flagelos peritricos, anaerobios facultativos no encapsulados y no esporulados. Se desarrollan entre 8 y 45 °C y a un pH de 4 a 8; no sobreviven a temperaturas mayores de 70 °C.

Está ampliamente distribuida en la naturaleza, se encuentra como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, causando un amplio espectro de enfermedades, como la salmonelosis (Aguilar y Escolástica, 2004).

Los antibióticos que resultan eficaces contra *S. Enteritidis* son: ácido nalidíxico, cefalotina, ciprofloxacina, cloramfenicol, kanamicina, estreptomina, tetraciclina (Sánchez, *et al*, 2004) y fosfomicina (Mendoza, 2002), y resulta resistente ante el antibiótico sulfametoxazol (Alaniz, *et al*, 1996).

### **Staphylococcus aureus**

Las bacterias del género *Staphylococcus* son microorganismos ubicuos difíciles de eliminar que colonizan ambientes muy diversos formando parte de la microbiota habitual de la piel, la garganta y las fosas nasales de sus hospedadores vertebrados.

Estos cocos tienen un diámetro menor a  $1\mu$ , se tiñen como Gram positivos. Son aerobios, pero también se desarrollan en condiciones parcialmente anaerobias, produce fermentación láctica y son catalasa y coagulasa positivo. En frotis teñidos, de medios de cultivo sólidos se agrupan característicamente en racimos de forma irregular.

Posee numerosos factores de virulencia, en su mayoría componentes de la pared celular, y una variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats. Estas propiedades, hacen que los estafilococos sean la causa de numerosas infecciones en mamíferos, que van desde afecciones superficiales de la piel a patologías severas como neumonías, meningitis, intoxicaciones alimentarias, shock séptico y desórdenes autoinmunes (Fernández, 2008 y Burdon y Williams, 1980).

*S. aureus* es susceptible a los antibióticos amikacina, vancomicina, rifampicina, fosfomicina y aminoglucósidos. Pero es resistente a las quinolonas (Mamani, *et al*, 2006 y Mendoza, 2002).

### **Candida albicans**

*Candida albicans* pertenece a la familia Criptococaceae. Las levaduras son células redondas u ovals que se reproducen por gemación. Estos organismos se desarrollan en condiciones aerobias. Son capaces de producir pseudofilamentos y clamidosporas (tipo de espora asexual). Producen hifas, solo en el momento de la invasión a los tejidos; éstas se comienzan a formar a la temperatura de 37 °C.

En condiciones normales, es reconocida e inhibida por defensas normales del organismo (leucocitos, polimorfonucleares y monocitos), y también por miembros de la flora microbiana normal (bifidobacterias).

La *Candida* es un saprófito oportunista y en condiciones favorables, se convierte en patógeno, dependiendo del terreno del huésped, generando candidiasis (Pérez, 2005).

Para las enfermedades causadas por *C. albicans*, es eficaz el antibiótico nistatina, fluconazol (Pérez, 2005), ketoconazol y amfotericina B (Mendoza, 2002). Sin embargo, la *Candida albicans* presenta resistencia al itraconazol (Ceballos, *et al*, 1999).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido al uso indiscriminado de antibióticos en la actualidad, se ha generado una resistencia de los microorganismos patógenos a dichos agentes bactericidas. Esto ha despertado el interés y la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamientos de la medicina natural, que sean eficaces contra bacterias y hongos, que son los principales agentes que desencadenan infecciones en humanos.

Los aceites naturales provenientes de plantas medicinales, ejercen una acción antimicrobiana, por lo que se han hecho investigaciones probando la efectividad por medio de métodos de concentración mínima inhibitoria y bactericida de los aceites de varias plantas que se encuentran en nuestro territorio mexicano, y han demostrado una actividad antimicrobiana, como es el caso del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandieri Schauer*) (Hernández, *et al*, 2007) y del clavo (*Syzygium aromaticum*) (García, *et al*, 2007), entre otras, que muestran una inhibición significativa del crecimiento de los microorganismos. Por lo que resultaría importante evaluar los aceites esenciales de las especies *Pinus douglasiana* y *Pinus pseudostrobus*, de la Sierra Occidental de Jalisco, ya que podrían presentar una capacidad antimicrobiana, eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

#### 4. HIPOTESIS

El uso de aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor de acículas de *Pinus douglasiana* Martínez y *Pinus pseudostrobus* Lind tienen actividad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

## 5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus douglasiana*, probados en bacterias: *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* y la levadura *C. albicans*.

## 6. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Obtener los aceites esenciales de dos especies del genero *Pinus* por arrastre de vapor.
- 2.- Evaluar la actividad antimicrobiana que ejercen los aceites esenciales de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus douglasiana*, a diferentes concentraciones, en *S. aureus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* y *C. albicans*.
- 3.- Comparar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus douglasiana* con los diferentes microorganismos.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Selección de especies de pinos

Se eligieron dos especies (*P. pseudostrobus* Lind y *P. douglasiana* Martínez), por ser de las que más se aprovechan para madera en la Región Sierra Occidental, el muestreo se realizó a la corta de los árboles y se tomaron las muestras de la copa de los árboles derribados.

Los aceites esenciales se obtuvieron de muestras de follaje de dos pinos de la Sierra Occidental de Jalisco: *Pinus pseudostrobus* Lind y *Pinus douglasiana* Martínez. El *P. douglasiana* Martínez, el cual fue identificado por el Dr. Jorge Alberto Pérez de la Rosa y los ejemplares se encuentran en el herbario del Instituto Botánico de la Universidad de Guadalajara (IBUdG) ubicado en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; el *P. pseudostrobus* fue identificado por el personal del despacho de consultoría de Mascota, Jalisco y las muestras se encuentran en el herbario de dicha empresa, "Consultaría Ambiental Mascota, S. C".

### 7.2. Obtención de los aceites esenciales de pinos

Se colectó el follaje en los predios del Municipio de San Sebastian del Oeste y se trasladó al Laboratorio de Productos Forestales No Maderables del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, para la obtención del aceite. Los aceites se obtuvieron del follaje de *P. pseudostrobus* Lind y *P. douglasiana* Martínez mediante el proceso de arrastre de vapor.

El follaje se desfibró en un molino cuyas partículas tienen un tamaño menor a 1 cm, el follaje desfibrado se colocó en un recipiente de cristal con una placa de cerámica perforada en cuyo fondo contenía agua destilada. Se tapó el recipiente y se enroscó un conducto llamado trompa de elefante, donde pasó el

vapor a través de un refrigerante y después de 2 a 5 horas el destilado se recolectó en un contenedor para su posterior separación del extracto aceitoso del agua, por diferencia de densidad de estas dos fases (Figura 4).



Figura 4. Extractor de aceites esenciales por el método de arrastre de vapor.

### 7.3. Cepas utilizadas

Las cepas microbiológicas probadas fueron *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076, marca Microbiologics), *Escherichia coli* (ATCC HB101, marca Biorad), y *Candida albicans* (ATCC 10231, marca Microbiologics). La cepa de *Staphylococcus aureus* la proporcionó el Laboratorio de Bacteriología del Hospital General Regional No. 46 / Instituto Mexicano del Seguro Social de Guadalajara, Jalisco.

Se realizaron las pruebas de sensibilidad en cada una de las cepas con diferentes concentraciones de los dos aceites esenciales (*Pinus pseudostrobus* Lind y *Pinus douglasiana* Martínez) por el método de dilución en tubo, se evaluó la actividad antimicrobiana y se determinó la concentración mínimas inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).



#### 7.4. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de la dilución en tubo

Por cada extracto, se prepararon 4 series de 15 tubos de cada microorganismo y con cada uno de los aceites de los diferentes pinos. Las diluciones se realizaron por duplicado.

Se enumeraron los tubos, del 1 al 12 para evaluar las diferentes concentraciones del aceite y el tubo 13 para el grupo control, al cual no se le adicionó ningún tipo de aceite. Además se realizaron como referencia antibióticos comerciales como control positivo el tubo 14 con gentamicina y 15 con ampicilina (cuadro 1).

Cuadro I. Concentraciones de los dos aceites esenciales.

No. de tubo	Concentraciones de aceites esenciales de <i>P. pseudostrobus</i> o <i>P. douglasiana</i>
1	50 %
2	25 %
3	12.5 %
4	6.25 %
5	3.12 %
6	1.56 %
7	0.78 %
8	0.39 %
9	0.19 %
10	0.09 %
11	0.04 %
12	0.02 %
13	0% (control)
14	Gentamicina (10 µg)
15	Ampicilina (10 µg)

A todos los tubos se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Caldo Soya Trypticaseína (CST). Al primer tubo se le añadió 500  $\mu\text{L}$  del aceite de pino concentrado quedando una concentración al 50 % y se homogenizo, y de este tubo se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y se adicionaron al tubo 2 resultando una concentración de 25 % (1:2), así sucesivamente se hicieron diluciones seriadas hasta el tubo 12 donde se evaluó la concentración desde el 50% hasta 0.02% de cada aceite esencial.

Enseguida a todos los tubos se le adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de suspensión del microorganismo a probar, ajustado previamente a la escala de MacFarland, que corresponde a  $1 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colonias/mililitro (UFC/mL), con un volumen final en cada tubo de 1mL. La escala de MacFarland, es una precipitación química de cloruro de bario y ácido sulfúrico.

Todos los tubos se incubaron a 37° C por 24 horas (Figura 5).

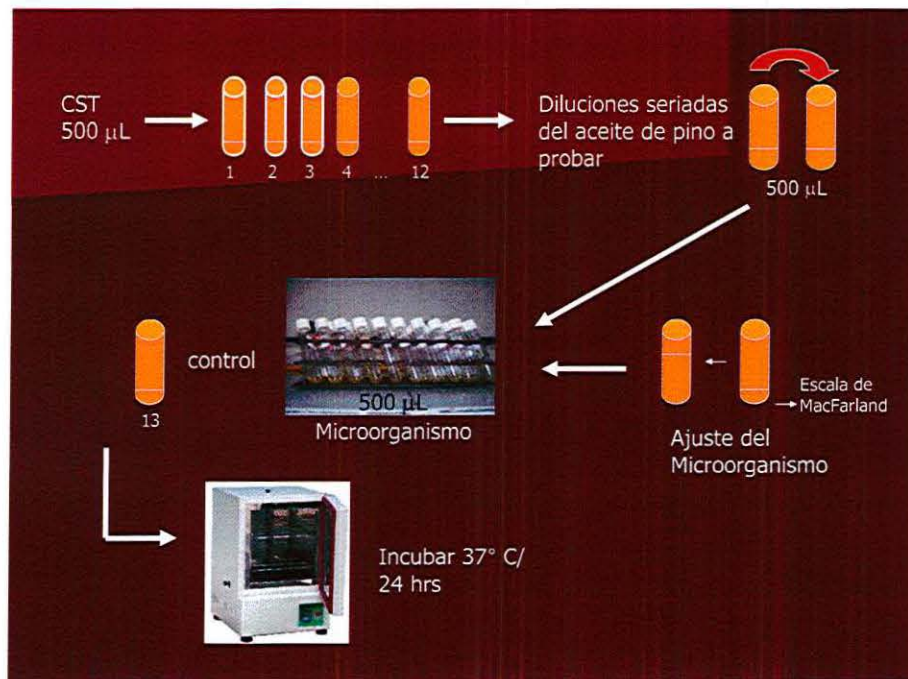


Figura 5. Método de dilución en tubo para determinar la CMI de los aceites esenciales de pinos, donde se observa turbidez.

Transcurrido el tiempo se observó la turbidez que presentaron y se leyeron en espectrofotómetro a 620 nm de absorbancia (Spectro UV-Vis RS Espectrophotometer UV-2500, Labomed inc.), para determinar el crecimiento desarrollado (UFC/mL) (Figura 6).



Figura 6. Cuantificación de UFC/mL

Se evaluó el efecto inhibidor en porcentaje de cada aceite contra los diferentes microorganismos, tomando al control (tubo 13) solo con microorganismos como el crecimiento al 100% y se hizo la correlación de las lecturas obtenidas para determinar la sensibilidad de los microorganismos a las diferentes concentraciones de los extractos.

Se comparó la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las dos especies de pinos con los diferentes microorganismos.

## 8. RESULTADOS

Se obtuvo rendimiento de los aceites esenciales, de 0.84% para *P. douglasiana* y 0.72% para *P. pseudostrobus*.

Los resultados muestran que el aceite obtenido de *P. pseudostrobus*, desarrolla la mayor inhibición de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis (61.97%) a la concentración de 25% del aceite, en el resto de concentraciones se redujo la inhibición en forma directa hasta la concentración de 1.56%; En concentraciones menores al 1% (0.78, 0.39, 0.09 y 0.04) se registran inhibiciones menores al 40% (Figura 7). A mayor (50%) y menor (0.02%) concentración no presentó ninguna inhibición por lo que se considera que la CMI sea a la de 0.04%.

El efecto del aceite del *P. pseudostrobus* en *S. aureus* fue menor, ya que a las mayores concentraciones (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%) y 0.09% no mostró inhibición. El mayor porcentaje de inhibición de crecimiento fue a la concentración de 0.04% seguido de 1.56% con un 30.05% y 26.88% respectivamente. En el resto de las concentraciones (0.78%, 0.39%, 0.19% y 0.02%) se registran inhibiciones menores al 21.23% (Figura 8). La CMI se registra a la concentración de 0.02%.

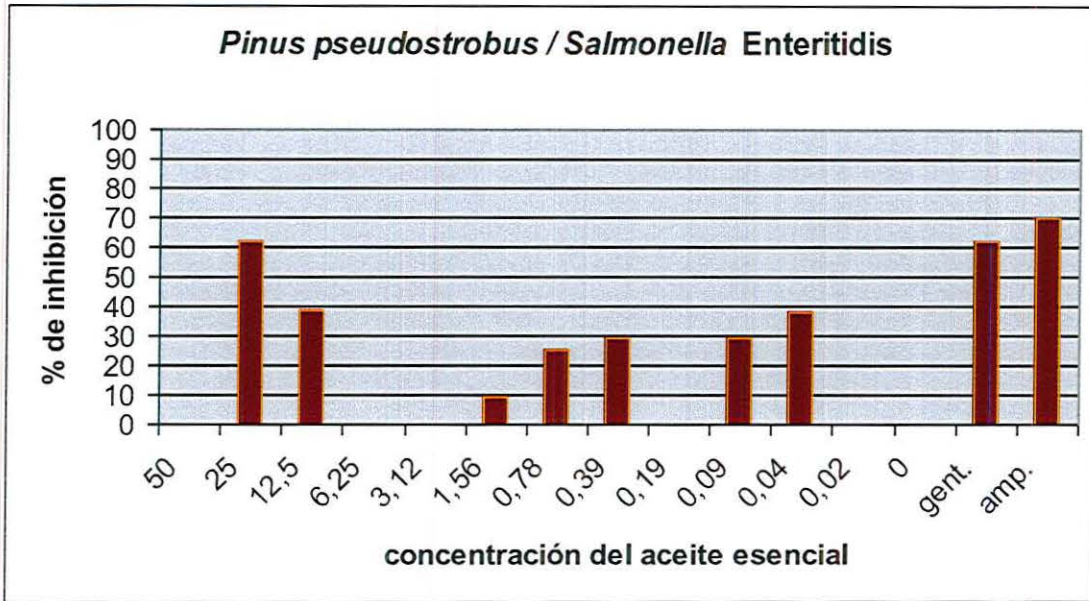


Figura 7. Inhibición de *Salmonella* Enteritidis a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. pseudostrobus*.

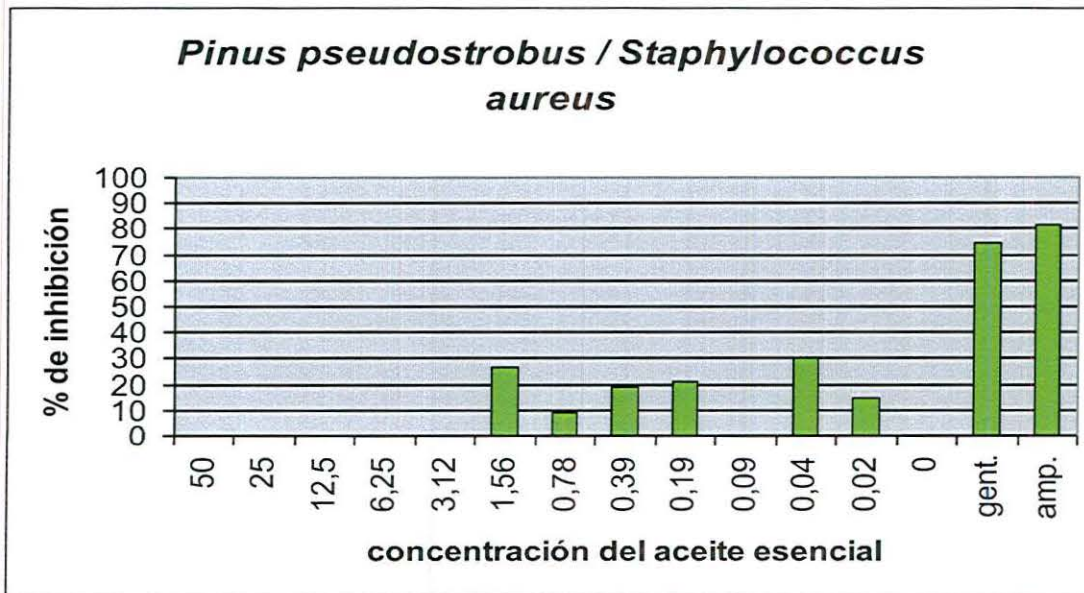
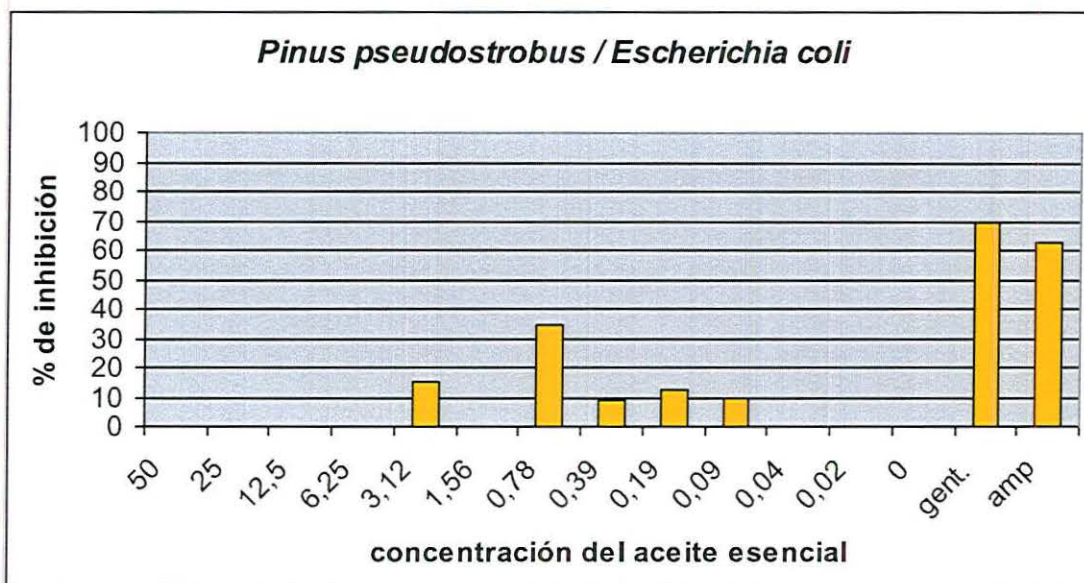


Figura 8. Inhibición de *S. aureus* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. pseudostrobus*.

En la figura 9 se muestra el efecto antimicrobiano que presentó el aceite de *P. pseudostrobus* contra *E. coli*, donde la mayor inhibición de crecimiento (34.77%) fue a la concentración de 0.78% del aceite, y a 3.12% inhibió 15.31%, en las concentraciones de 0.39%, 0.19% y 0.09% se inhibe en un promedio del 10%. En el resto de las concentraciones empleadas (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 1.56%, 0.04% y 0.02%) no fue eficaz el aceite, por lo que se considera que la CMI sea a la concentración de 0.09%.

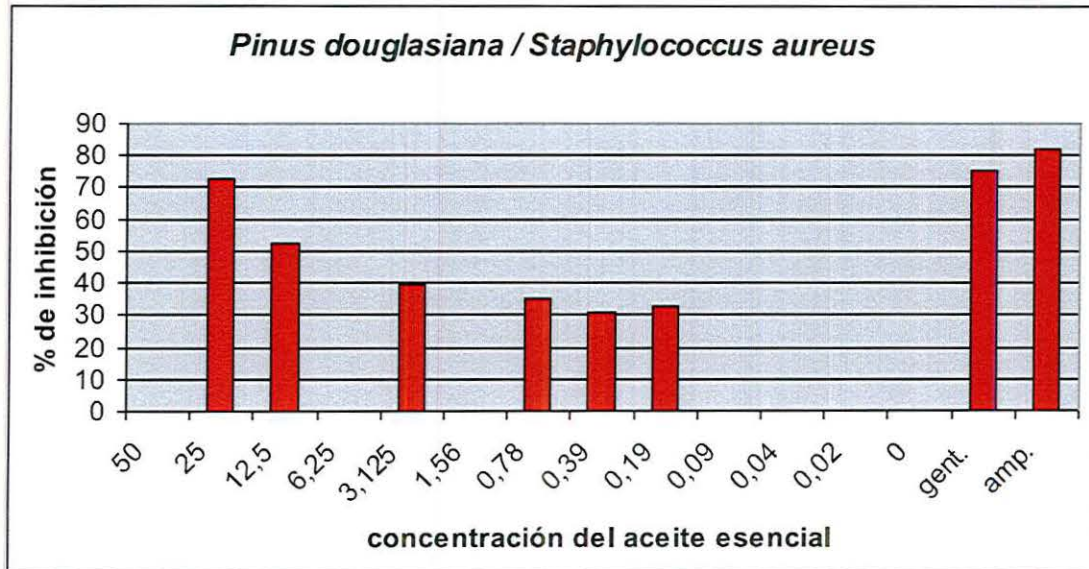
Por su parte, la levadura de *Candida albicans* presentó resistencia en todas las concentraciones probadas con este aceite esencial.



**Figura 9.** Inhibición de *E. coli* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. pseudostrobus*.

Por otra parte, el aceite esencial de *P. douglasiana* muestran la mayor inhibición de crecimiento en *S. aureus* (72.8%) a la concentración de 25%, seguida del 12.5% con 52%, en 3.12%, 0.78% y 0.39% se presenta una reducción de forma directa, sin embargo a la concentración de 0.19% hay un disminución del crecimiento bacteriano y el porcentaje de inhibición se presenta

con 32.76%. El resto de las concentraciones (50%, 6.25%, 1.56%, 0.09% y 0.04%) no presentaron inhibición bacteriana (Figura 10), y a partir 0.09% no presento ninguna inhibición por lo que se considera que la CMI sea a la concentración de 0.19%.

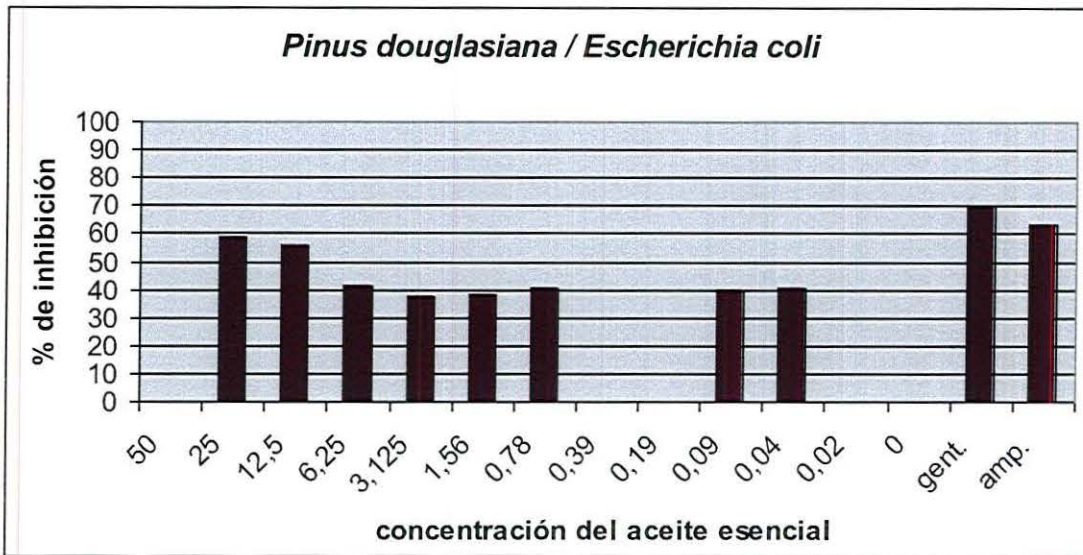


**Figura 10.** Inhibición de *S. aureus* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. douglasiana*.

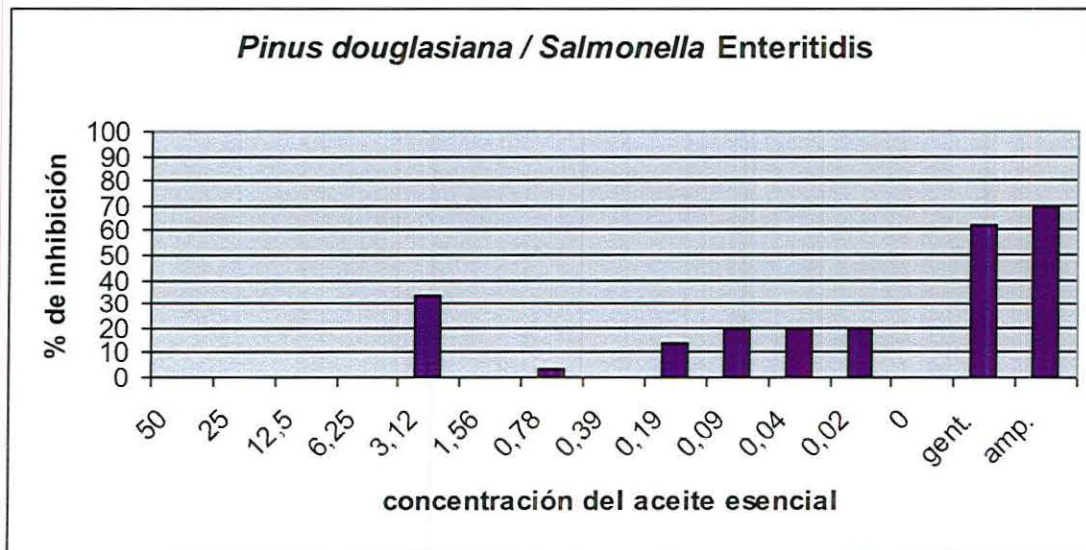
El aceite de *P. douglasiana* no inhibió el crecimiento de *E. coli* a concentraciones de 50%, 0.39%, 0.19% y 0.02%, sin embargo la mayor inhibición de crecimiento (58.49%) fue a la concentración del 25%, con un comportamiento inhibitorio directo de las concentraciones del 12.5% hasta 0.39%. A la concentración de 0.09% y 0.04% se mantienen en un promedio del 40% de inhibición (Figura 11), y a 0.02% no presento ninguna inhibición por lo que se considera que la CMI sea a la concentración de 0.04%.

En la figura 12 se muestra el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *P. douglasiana* en *S. Enteritidis*. En donde se observa que a concentraciones mayores (50%, 25%, 12.5%, 6.25%) no hubo inhibición, hasta la concentración de 3.12% fue la mayor inhibición (33.68%), y la concentración de 0.78% y 0.19% muestran poca inhibición (3.34%, 13.75% respectivamente). El resto de

las concentraciones (0.09%, 0.04% y 0.02%) mantuvieron una inhibición uniforme del 20%. La CMI fue a 0.02%.



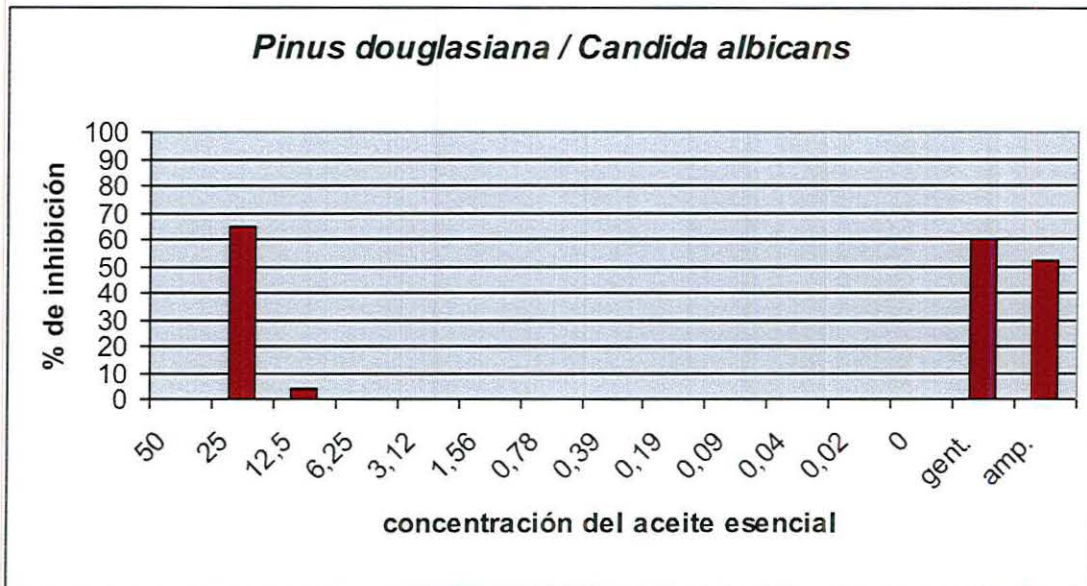
**Figura 11.** Inhibición de *E. coli* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. douglasiana*.



**Figura 12.** Inhibición de *S. Enteritidis* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. douglasiana*.



La cepa de *C. albicans*, se mostró más resistente en casi todas las concentraciones, excepto en la concentración del 25% (64.87%), seguida por la concentración de 12.5% inhibiendo un 3.7%, por lo que se considera que la CMI sea a la concentración de 12.5%. En 0% se representa el grupo control (Figura 13).



**Figura 13.** Inhibición de *C. albicans* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *P. douglasiana*.

Como se puede observar en los cuadros 2 y 3 se compara la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus douglasiana* con los diferentes microorganismos, observándose un mayor efecto del aceite esencial de *P. pseudostrobus* a concentraciones bajas para bacterias Gram positivas y Gram negativas. La levaduras de *C. albicans* solo fue sensible al aceite esencial de *P. douglasiana*.

Cuadro 2. Acción del aceite esencial de *Pinus pseudostrabus* Lind

<b>Microorganismo</b>	<b>Dilución (%)</b>	<b>Inhibición de crecimiento (%)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.04	30.0
<i>Escherichia coli</i>	0.78	34.77
<i>Salmonella</i> Enteritidis	25.0	61.97
<i>Candida albicans</i>	Todas	Resistente

Cuadro 3. Acción del Aceite esencial de *Pinus douglasiana* Martínez.

<b>Microorganismo</b>	<b>Dilución (%)</b>	<b>Inhibición de crecimiento (%)</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.0	72.8
<i>Escherichia coli</i>	25.0	58.49
<i>Salmonella</i> Enteritidis	3.12	33.68
<i>Candida albicans</i>	25.0	64.87

## 9. DISCUSION

Los aceites esenciales están contenidos en glándulas o vesículas secretoras inmersas en los tejidos de las hojas, flores, corteza (pericarpio) y semillas de los frutos de muchas especies. Las plantas pueden producir aceite esencial para muchos y diversos fines; por un lado protegen a la planta de plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas, para atraer insectos y aves (polinizantes). Estas cualidades de protección y atracción, se ven reflejadas en propiedades: antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, afrodisíacas y otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites. El hombre desde la antigüedad ha usado sustancias naturales extraídas de las plantas, como los aceites esenciales, para combatir enfermedades. Hoy en día, estas sustancias han perdido su uso debido a la aparición de sustancias químicas, no obstante, tienen la ventaja de que no representan un peligro para la vida y salud del hombre (Toribio, *et al*, 2005).

El surgimiento de cepas resistentes y la capacidad de provocar enfermedad están relacionados con el amplio uso de los antibióticos, además de su enorme potencial para desarrollar resistencia (García, *et al*, 2007). Por lo tanto, ha surgido la necesidad de hacer frente este problema, ha llevado a investigadores y a la industria farmacéutica a buscar nuevas sustancias con actividad antimicrobiana. Las plantas superiores han constituido durante siglos la principal fuente de agentes medicinales, y muchas de ellas son utilizadas como quimioterapéutico (Toribio, *et al*, 2005).

Los aceites esenciales del pino (*Pinus pinaster* Sol y *Pinus sylvestris* L), por varios estudios farmacológicos y bioquímicos han demostrado que están indicados para afecciones de las vías respiratorias como tos, bronquitis agudas y crónicas, además en caso de reumatismo y neuralgias (Schrickel y Bittner, 2001). Por otra parte, Macchioni, *et al*, (2002) evaluaron la actividad acaricida del aceite esencial de cuatro especies de *Pinus* sobre una plaga (*Tyrophagus putrescentiae*). En el 2005, Leyva y colaboradores evaluaron el efecto larvicida de 2 pináceas endémicas como una alternativa en el control de insectos

vectores de enfermedades (*Aedes aegypti*) y disminuir la aplicación de insecticidas sintéticos.

El aceite esencial de *Pinus sylvestris* es el más estudiado y conocido por sus efectos biológicos hacia la salud, tiene propiedad de desinfectante, expectorante y antiséptico, utilizado para el sistema respiratorio y en el sistema genitourinario (Frescué, *et al*, 1996). Sin embargo, no existen trabajos de referencia sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de los pinos que constituyen una tendencia actual como alternativa.

Para la obtención del aceite esencial de *Pinus pseudostrobus* Lind y *Pinus douglasiana* Martínez, se llevo a cabo por el método de destilación por arrastre de vapor que por efecto de la temperatura del vapor (100 °C) en un cierto tiempo, el tejido vegetal se rompe liberando el aceite esencial (Sánchez, 2006). Se coloca agua en la parte inferior del tanque extractor, posteriormente una parrilla que soporta el material vegetal, que debe ser fresco y cortado en pequeños trozos (Barindelli, 2010). La salida de vapores, que puede ser lateral al tanque o ubicarse en la tapa del mismo, pasa a un serpentín ó espiral enfriado por agua y posteriormente, el vapor condensado y el aceite esencial se recolectan en un separador de fases, el cual debe de tener la suficiente altura y diámetro para evitar la pérdida de aceite y además permita la recolección del mismo. (Sánchez, 2006).

Luego de obtener los aceites esenciales de *Pinus pseudostrobus* Lind y *Pinus douglasiana* Martínez, se probó la actividad antimicrobiana de los mismos, frente a diferentes cepas bacterianas de interés hospitalario (*Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis y *Candida albicans*). Estos fueron comparados ante sustancias de referencia de actividad antimicrobiana conocida, que fueron ampicilina y gentamicina.

Los datos del presente trabajo mostraron que el aceite esencial de *Pinus pseudostrobus* Lind, dentro de las concentraciones que se evaluaron del 50% al 0.02%, es mayor su efecto inhibitorio a concentraciones bajas, excepto en *Salmonella* Enteritidis, donde su actividad antimicrobiana fue en una de las

concentraciones más altas del 25%; y en *Candida albicans* se observó una resistencia en todas las concentraciones realizadas.

Por otra parte, para el aceite esencial de *Pinus douglasiana* Martínez a las mismas concentraciones se observó que a mayor concentración del aceite es mayor su efecto antimicrobiano, solo en *Salmonella* Enteritidis se presentó una inhibición significativa a la concentración de 3.12% con un 33.68% de inhibición, siendo este el porcentaje más bajo. *Staphylococcus aureus* fue el más sensible de los cuatro microorganismos que se manejaron, ya que presentó el 72.8% de inhibición en la concentración del 25%. A la concentración del 25%, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, presentaron el 58.49% y 64.87% de inhibición respectivamente estas se mostraron menos sensibles, en comparación con *Staphylococcus aureus* la misma dosis.

Datos similares son reportados por Toribio (2005) en su evaluación de la actividad antimicrobiana con *Verbesina encelioides*, en la que utilizó concentraciones crecientes del extracto vegetal donde observó la actividad antimicrobiana más notoria sobre microorganismos Gram positivos (*S. aureus*), y *Candida albicans*, que contra bacterias Gram negativas (*E. coli*, *S. Enteritidis*). Esta diferencia entre las respuestas de las bacterias a los tratamientos, podría deberse a la composición de la pared celular, que presentan Gram positivas y Gram negativas (Vera, *et al*, 2007).

Por otra parte, han realizado diversas investigaciones para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales y muchos de sus componentes, especialmente mono y sesquiterpenos. El efecto inhibitorio de varios terpenoides sobre el consumo de oxígeno de los microorganismos y la fosforilación oxidativa ha sido demostrada. En particular alcoholes fenólicos y no fenólicos (de origen terpenoide) exhibieron fuertes efectos inhibitorios seguidos por aldehídos y cetonas (Vera, *et al*, 2007 y Maguna, *et al*, 2006).

En los pinos, los terpenoides, son el principal compuesto del aceite, y pueden constituir hasta un 85% de la composición química total, mientras que el resto de los componentes se presentan como trazas (Zekaría, 2007). Esta actividad

biológica puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida. Sin embargo el mecanismo de acción específico de estos compuestos aún no ha sido claramente caracterizado. Aunque actualmente se propone como posible sitio de acción la membrana celular donde los terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían arribar a la muerte bacteriana. Es de mencionar también que en la actualidad la resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes tiende a incrementarse, razón por la cual se mantiene el ímpetu en la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para combatir las infecciones y superar los problemas de resistencia bacteriana y los efectos secundarios de algunos agentes disponibles actualmente (Maguna, *et al*, 2006).

Los datos de los antimicrobianos de referencia probados en comparación con los aceites esenciales de pinos, mostraron una acción similar a los controles de gentamicina y ampicilina. Los efectos biológicos que presentan los aceites esenciales de los pinos en organismos vivos, depende ciertamente de la dosis que se administre. Las dosis relativamente reducida (100 a 200 ppm) parecen tener mayor efecto antibacteriano, mientras que las dosis superiores no producen necesariamente un mejor efecto (Zekaria, 2007).

La actividad sobre las cepas analizadas en este estudio de estafilococos, bacterias gram negativas y *Candida albicans* depende de la concentración a utilizar. Los resultados indican que los aceites esenciales de pinos pueden ser una alternativa a los productos farmacéuticos y así evitar el surgimiento de cepas resistentes y la capacidad de producir enfermedad están fuertemente relacionados con el amplio uso de los antibióticos, además de su enorme potencial para desarrollar resistencia y multirresistencia (García, *et al*, 2007).

Todo lo anterior nos lleva a la necesidad de conocer más acerca de las plantas medicinales y sus beneficios a la salud, esto ha contribuido a la realización de estudios que evalúen la actividad farmacológica contra lo que actúan en un organismo vivo y desde luego la dosis efectiva para combatir un padecimiento dado.

El presente trabajo dará pauta a seguir investigando sobre los aceites que se analizaron de *Pinus pseudostrobus* Lind y *Pinus douglasiana* Martínez, en su aplicación en organismos vivos para definir así, dosis adecuadas hacia los microorganismos patógenos. Los resultados sugieren un potencial terapéutico de los aceites esenciales de estas especies de *Pinus* debido a su actividad frente a los diferentes microorganismos, lo que se deberían realizar estudios de las condiciones agronómicas, de rendimiento y calidad del aceite esencial.

TESIS/CUCBA

## 10. CONCLUSIONES

- Se logro obtener el aceite esencial de *Pinus douglasiana* Martínez y *Pinus pseudostrobus* Lind, por el método de arrastre de vapor con un rendimiento de 0.84% para *P. douglasiana* y 0.72% para *P. pseudostrobus*.
- El aceite esencial de *Pinus pseudostrobus* Lind a bajas concentraciones tiene el mejor efecto de inhibición en *Salmonella* Enteritidis y se observa resistencia de *Cándida albicans* al mismo.
- El aceite esencial de *Pinus douglasiana* Martínez presenta mayor inhibición a concentraciones altas de 25% en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*; y a 3.12% en *Salmonella* Enteritidis.
- De los dos aceites esenciales que se pusieron a prueba, *Pinus douglasiana* Martínez fue el que mostró mayor actividad antimicrobiana ante los microorganismos de prueba.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar F., y Escolástica L. 2004. "Caracterización fenotípica y genotípica de estirpes de *Salmonella choleraesuis*, aislada de ambientes marinos". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Alaniz R., Ríos M., Rosas B., Juan A. 1996. "Resistencia a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de fuentes animales". Departamento de salud pública. División de ciencias veterinarias. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. Pags., 215-220.
- Alos J., Gómez J., García I., García J., González R. y Padilla B. 1993. "Prevalencia de susceptibilidad de *Escherichia coli* a quinolonas y otros antibióticos en bacteriurias extrahospitalarias de Madrid". Servicio de microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid. Vol., 101 No. 3. Pag., 87-90.
- Audrey W., 2009. "Antibiotic susceptibility testing", capítulo 12, in Practical Handbook of Microbiology, second edition, Ed. CRC Press; USA. Pag, 149-158.
- Barindelli S. 2010. "¿Que son los aceites esenciales?". Facultad de química. Universidad de la República del Uruguay. Uruguay. Pag.,1-3.
- Bermejo B., y Pontones J. 1994 "Los pinos mexicanos y su utilización como especies introducidas de alto potencial en varios países del mundo". Política y mercadeo de semillas forestales. Centro de Genética Forestal A.C., Chapingo. México. Pag., 249-253.
- Burdon K., y Williams R. 1980. "Microbiología". Publicaciones culturales. Quinta Edición. México. Pag., 515-516.

- Ceballos S., Gaitán C., Orihuela C., Olea B., Ceballos G., Quindos G. 1999. "Resistencia In Vitro a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidiasis oral". Revista Iberoamericana. Micología. Universidad de Granada. España. 16(4). Pags., 194-197.
- Díaz R., Gamazo C., y López I. 1999. "Manual práctico de Microbiología". 2ª edición. Editorial Masson. Barcelona. Pag., 141-142.
- Farjon A., Pérez de la Rosa J. A., y Styles B. T. 1997. "Guía de Campo de los Pinos de México y América Central". The Royal Botanic Gardens, Kew. Instituto Forestal de Oxford. Universidad de Oxford. Unión Europea.
- Fernández B. 2008. "Enterotoxinas y *Staphylococcus aureus*". Servicio de Inmunología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. España.
- Frescuet F., Blanquer R., Galindo D., Gallego E., García de la Cuadra A., López B., Ángel S. 1996. "Inventario de las plantas de uso popular en la ciudad de Valencia". Departamento de historia de la ciencia y documentación. Universidad de Valencia. Valencia, España. Pag., 62-63.
- García C., Alonso S., Rodríguez R., Martínez A., Ramírez P., Torres J., Castro B. 2007. "Actividad antimicrobiana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple". División de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. México.
- García D., Silva S., Rivas C. y Oranday A. 2006. "Evaluación antimicrobiana de los extractos metanólicos de *Ficus carica* y hexánicos de *Jatropha dioica* sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*,

*Bacillus subtilis* y *Candida albicans*". Academia Químico Biológicas. PROVERICYT.

- Hernández M., Silva R., Catonga A., Morales G. 2007. "Aplicación de aceite esencial de orégano (*Limpia berlandieri Schauer*) en carne de cerdo para su conservación". Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Departamento de Nutrición y Alimentos. México. Edición Especial No.1.
- Jenke-Kodama H., Muller R., y Ditt-Mann E. 2008. "Evolutionary Mechanisms Underlying Secondary Metabolite Diversity". Universidad de Berlin. Departamento de Ecología Molecular. Berlin. Vol., 65. Pag.,119-122.
- Koukos P., Papadopoulou K., Patiaka D., y Papagiannopoulos D. 2000. "Chemical composition of Essentials oils from Needles and twings of Balkan Pine (*Pinus peuce* Grisebach) grown in northern Greece". Journal of Agricultural and Food Chemistry . Vol. 48. No. 4. Pag., 1266- 1268.
- Leyva M., Tacoronte J., Marquetti M., Scull R., Tiomno O., Mesa A. y Montada D. 2009. "Utilización de aceites esenciales de pináceas endémicas como una alternativa en el control de *Aedes aegypti*". Revista Biomédica. Vol. 20. No. 1. Pag., 5-13.
- Lista Roja Catálogo, NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002).
- Macchioni F., Cioni P., Flamini G., Morelli I., Perrucci S., Franceschi A., Macchioni G., y Ceccarini L. 2002. "Acaricidal Activity of Pine Essential Oils and Their Main Components Against *Tyrophagus putrescentiae*, a Stores Food Mite". Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 50, No. 16, Pag. 4586-4588.
- Maguna F., Romero A., Garro O., y Okulik N. 2006. "Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides". Comunicaciones

Científicas y Tecnológicas. Universidad del Nordeste. Facultad de Agroindustrias. Argentina.

- Mamani E., Luján D. y Pajuelo G. 2006. "Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*. Experiencia en el hospital nacional Hipólito Unanue". Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Peru. Vol. 67, No. 2. Pag. 120-124.
- Martínez G., Nieves H., Ayala R., Tena M., Toledo G. 2006. "Estudio Etnobotánico de las plantas medicinales del mercado libertad (San Juan de Dios)". Primera Edición. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Jalisco, México.
- Martínez M. 1982. "Los Pinos Mexicanos". 3ª Edición. Ediciones Botas. México. Pag., 180-191.
- Mendoza R. 2002. "Antimicrobianos". Instituto Politécnico Nacional. México. Pag., 57-95.
- Noa M. 2004. "La resistencia de los microorganismos patógenos a los antimicrobianos: perspectiva y papel de la medicina veterinaria". Departamento de prevención de enfermedades. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Agraria de la Habana. Rev. Salud Animal. Cuba. Vol. 26, No. 1, Pag. 7-11.
- Olaya J. y Méndez J. 2003. "Guía de Plantas y Productos Medicinales". Convenio Andrés Bello. Colombia.
- Oliveira M., Velázquez D., Bermúdez A. 2005. "La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales". Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América. Universidad de la Rioja. España. Vol. 30, No. 8, Pag. 453-459.

- Pérez E. 2005. "Candidiasis". Asociación Española de Nutricionistas y Terapeutas Ortomoleculares Cualificados. España.
- Pérez D. 1998. "Resistencia bacteriana a antimicrobianos: Su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria". Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud. Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro. Madrid. Vol. 22, No. 3, Pag. 57-67.
- PRODEFO, 2003. "Programa de Desarrollo Forestal de Jalisco, Sistema de la clasificación de las Coberturas de Suelo para el Estado de Jalisco". (Documento Técnico 36, Guadalajara, Jalisco), México, p. 10.
- Rodríguez G. 2002. "Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*". Salud pública de México. Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológicos. Mexico. No. 44. Pag., 464-475.
- Sánchez M., Caraballo A., Cardona N., Bernal C., Tulia C. y Durango H. 2004. "Determinación del perfil de sensibilidad y resistencia a antibióticos seleccionados en cepas de *Salmonella spp.* aislada en Antioquia durante los años 2002 y 2003". Instituto colombiano de medicina tropical. Revista CES. Colombia. Vol. 18., No. 1. Pag., 35-42.
- Sánchez F. 2006. "extracción de aceites esenciales". Departamento de ingeniería química. Universidad nacional de Colombia. Colombia. pag. 8.
- Schrickel S., y Bittner M. 2001. "La salud en nuestras manos". Plantas medicinales en Chile, riqueza natural y científica. Editorial Lamas. 1ª edición. Chile.
- Tapia C. 2005. "Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos". Universidad de Chile. Facultad de medicina. Chile.

- Toribio M., Oriani D., Fernández J. y Skliar M. 2005. "Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*". Facultad de ciencias veterinarias. Departamento de biología, bioquímica y farmacia. Argentina. Vol. 7., No. 1. Pag., 41-45.
- Vera J., Pastrana P., Fernández K. y Viña A. 2007. "Actividad antimicrobiana in Vitro de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectorales* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima". Universidad del Tolima. Colombia. No. 33. Pag., 345-348.
- Vidal J. 1962. "El Pino". Primera edición. Editorial UTEHA. México.
- Zekaria D. 2007. "Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos".  
[http://www.wpsaaeca.com/wpsa.php?el\\_boletin=1&numero\\_boletin=128](http://www.wpsaaeca.com/wpsa.php?el_boletin=1&numero_boletin=128)  
 Consultado el 10 de Septiembre del 2008.