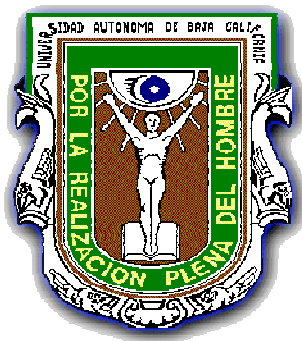


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



TESIS

CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO
***Lippia palmeri* WATS Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

MARÍA MAGDALENA ORTEGA NIEBLAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LUZ VÁZQUEZ MORENO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

MAYO DEL 2011.

“CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO *Lippia palmeri* WATS Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA”, tesis presentada por María Magdalena Ortega Nieblas, como requisito parcial para obtener el Grado de Doctora en Ciencias Agropecuarias. Esta tesis ha sido aprobada y aceptada por el comité particular:

**Dra. Luz Vázquez Moreno
P R E S I D E N T E**

**Dra. Adriana Morales Trejo
S E C R E T A R I A**

**Dr. Onécimo Grimaldo Juárez
S I N O D A L**

**Dra. Lourdes Cervantes Díaz
S I N O D A L**

**Dr. Edgardo Cortez Mondaca
S I N O D A L**

Mayo de 2011

Ejido Nuevo León, Mexicali, B.C.

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	vi
SUMMARY.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES.....	5
Características generales del Orégano <i>Lippia palmeri</i>	5
Distribución y hábitat de <i>L. palmeri</i> silvestre y sus cambios en la composición de los aceites esenciales.....	7
Propiedades de los aceites esenciales y comparación de técnicas de extracción.....	10
Características de los aceites esenciales del Orégano.....	14
Análisis de la composición de los aceites esenciales.....	15
Actividad antimicrobiana y usos en alimentos de los aceites.....	18
Actividad insecticida y modo de acción de los aceites esenciales.....	20
Modo de acción de los aceites esenciales sobre insectos.....	22
Insectos en granos almacenados.....	25
Importancia del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) y del <i>Zabrotes subfasciatus</i>	25
Biología y hábitos de <i>Z. subfasciatus</i>	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
ESQUEMA GENERAL DEL TRABAJO.....	31

CAPÍTULO 2.....	32
Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial del orégano (<i>Lippia palmeri</i> S. WATS)	
CAPÍTULO 3.....	55
Efecto tóxico y su persistencia del aceite esencial del orégano <i>L. palmeri</i> de dos localidades de Sonora contra <i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman en grano almacenado de frijol <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	
CAPÍTULO 4.....	80
Composición y efecto insecticida en fracciones del aceite esencial de orégano <i>Lippia palmeri</i> Wats <i>Z. subfasciatus</i> L.	
CONCLUSIÓN GENERAL.....	104
PERSPECTIVAS.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	107

RESUMEN

Lippia palmeri Wats (orégano) es una planta aromática que se desarrolla en climas áridos y semiáridos del estado de Sonora, México. En este estudio se caracterizó el aceite esencial de plantas de orégano *L. palmeri* recolectadas de dos localidades y se evaluó su efecto antimicrobiano e insecticida.

Los aceites esenciales (AEs) de *L. palmeri* Wats de las comunidades de Puerto del Orégano (AEPO) y Álamos (AEA) fueron extraídos por arrastre con vapor. AEPO y AEA presentaron 60 y 50 constituyentes, respectivamente. Los compuestos más abundantes de AEPO fueron principalmente el carvacrol (24.57%), timol (15.11%), p-cimeno (14.25%), y β -cariofileno (9.96%); y para el AEA p-cimeno (22.37%), timol (21.39%), isoaromandreno (16.7%), y carvacrol (8.76%). La actividad antimicrobiana fue distinta respecto la localidad de recolección de la planta y dilución de los AEs. Todas las bacterias analizadas fueron extremadamente sensibles a la dilución 1:1 de ambos AEs. A mayor dilución del AE fue menor la actividad antimicrobiana.

El efecto insecticida de los aceites sobre *Zabrotes subfasciatus*, a dosis de 0.135, 1.35, 4.0 y 8.0 $\mu\text{L/g}$ de grano de frijol *P. vulgaris* L almacenado, se observó en la mortalidad del insecto, oviposición a las 6, 24, 48 y 72 h, la emergencia de insectos y porcentaje de grano dañado evaluado a 30 días. La persistencia de su efecto tóxico se evaluó por bioensayos mensuales durante cuatro meses después de aplicar el tratamiento. La toxicidad de AEPO sobre zabrotes y su persistencia fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que el AEA en todas las dosis y bioensayos. Ambos AEs mostraron un efecto letal y ovicida que persistió dos meses a partir de la dosis de 1.35 $\mu\text{L/g}$ y tres meses a partir de las dosis de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$. No se observó emergencia ni grano dañado a estas dosis y tiempo

de almacenamiento. AEPO y AEA se fraccionaron mediante destilación a diferentes temperaturas, y se analizaron los componentes principales de cada fracción (F1, F2, F3). La F1 de AEPO presentó: cimeno, cariofileno, pineno y tujeno; F2 registró carvacrol, mirceno, eugenol y linalool; y F3: timol, pineno, metil eugenol e iso-cariofileno. La F1 de AEA presentó: cimeno, cariofileno, espatuleno y bisaboleno; F2: mirceno, carvacrol, aromandreno y longipineno epóxido; y F3: timol, mirceno, p-timol y terpineno-4ol. Cada fracción fue administrada en dosis de 4, 8, 15 y 30 $\mu\text{L/g}$ de frijol sobre *Z. subfasciatus*. La mortalidad de *Z. subfasciatus* fue similar a dosis de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$, así como a las de 15 y 30 $\mu\text{L/g}$. Con AEPO F1, a dosis de 4 $\mu\text{L/g}$, la mortalidad se incrementó con el tiempo de exposición desde 20, 50, 90 y 100% a las 6, 12, 24 y 48h respectivamente; mientras que con AEA F1, se registraron mortalidades de 40, 60 y 100% a las 6, 12 y 24h. Se observó presencia de huevecillos en los granos de frijol, pero no hubo emergencia ya que la larva no logró su desarrollo normal. El efecto insecticida de F2 y F3 de AEPO fue superior ($P<0.05$), que en F2 y F3 de AEA. A dosis de 15 $\mu\text{L/g}$, F1 de AEA registró mortalidad de 100% a las 6h; mientras que la F1 de AEPO F1 presentó 50, 50 y 100% a las 6, 12 y 24h, respectivamente. F2 de AEPO fue más tóxica ($P<0.05$), que F2 de AEA; las fracciones F3 de ambos aceites provocaron el 100% de mortalidad a las 6 h. Se considera que la mortalidad de *Z. subfasciatus* puede deberse a los componentes carvacrol y p-cimeno, abundantes en F1 y F2 de ambos aceites, así como a timol, abundante en la F3. En conclusión, el AE del orégano *L. palmeri* Wats extraído por arrastre de vapor, presenta una gran proporción de compuestos hidrocarbonados (monoterpenos) y oxigenados (carvacrol, timol, cimeno; entre otros); y presenta potencial antimicrobiano e insecticida. El AE de *L. palmeri* Wats puede emplearse contra *Z. subfasciatus* a concentraciones de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$ de frijol almacenado, con efecto insecticida hasta por 4 meses.

SUMMARY

Lippia palmeri Wats (oregano) is an aromatic plant that develops in arid and semiarid climates of the state of Sonora, México. In this study we characterized the essential oil of plants of oregano *L. palmeri* Wats collected from two locations and their antimicrobial and insecticide activity was evaluated.

Essential oils (EOs) of *L. palmeri* Wats from communities of Puerto del Oregano (AEPO) and Alamos (AEA) were extracted by steam distillation. AEPO and AEA showed 60 and 50 constituents, respectively. The main mostly abundant compounds for AEPO were carvacrol (24.57%), thymol (15.11%), p-cymene (14.25%), β -caryophyllene (9.96%); and for the AEA, p-cymene (22.37%), thymol (21.39%), isoaromandreno (16.7%), carvacrol (8.76%). The antimicrobial activity was different about the location of the plant collection and dilution of NAs. All bacteria tested were extremely sensitive to dilution 1:1 of both AEs. The antibacterial activity was lower between higher was the dilution.

The insecticidal effect of the oils on *Zabrotes subfasciatus* at doses of 0.135, 1.35, 4.0 and 8.0ul/g of grain stored *Phaseolus vulgaris* L, was observed in the insect mortality, in the oviposition at 6, 24, 48 and 72 h, in the emergence of insects and in the percentage of damaged grain evaluated at 30 days. The persistence of its toxic effect was evaluated by monthly bioassays for four months after the treatment. AEPO toxicity and persistence on *Zabrotes* was significantly higher ($P < 0.05$) than the AEA at all doses and bioassays. Both AEs showed a lethal and ovicidal effect that persisted two months after the dose of 1.35 ul/g and three months after dose of 4 and 8 ul/g. There was no emergency or damaged grain at these doses and storage time. AEPO and AEA were fractionated by distillation at different temperatures, and the main components of each fraction (F1, F2, F3) were

examined. The AEPO F1 presented: cymene, caryophyllene, pinene and thujene; F2 showed carvacrol, myrcene, eugenol and linalol, and F3: thymol, pinene, methyl eugenol and iso-caryophyllene. The AEA F1 presented: cymene, caryophyllene, and bisabolene espatulene; F2: myrcene, carvacrol, and longipinene aromandrene epoxy, and F3: thymol, myrcene, p-thymol and terpinene-4ol. Each fraction was administered at doses of 4, 8, 15 and 30 ul/g of beans on *Z. subfasciatus*. The mortality of *Z. subfasciatus* was equal with doses at 4 and 8 ul/g, as well as that of 15 and 30 ul/g. With AEPO F1, at doses of 4 ul/g, mortality was incremented with exposure time, from 20, 50, 90 and 100% at 6, 12, 24 and 48h respectively, while AEA F1, recorded 40, 60 and 100% mortality at 6, 12 and 24 h. It was noted presence of eggs in the beans, but there was no emergency since the larva did not achieve its normal development. The insecticidal effect of AEPO F2 and F3 was higher ($P < 0.05$) than for AEA.F2 and F3. At dose of 15 ul/g, AEA F1 recorded 100% mortality at 6 h, while the AEPO F1 obtained 50, 50 and 100% at 6, 12 and 24 h, respectively. AEPO F2 was more toxic ($P < 0.05$) than AEA F2. The F3 fractions of both oils caused 100% mortality at 6 h. It is considered that the mortality of *Z. subfasciatus* may be due to components carvacrol and p-cymene, abundant in F1 and F2 fractions of both oils, as well to thymol, abundant in the F3 fraction. In conclusion, the AE of oregano *L. palmeri* Wats extracted by steam, has a high proportion of hydrocarbon (monoterpenes) and oxygenated (carvacrol, thymol, cymene, among others) compounds, and with potential antimicrobial and insecticide activity. The AE of *L. palmeri* Wats can be used against *Z. subfasciatus* at concentrations of 4 and 8 ul/g of stored beans, with effective insecticidal activity for up to 4 months.

INTRODUCCIÓN

El orégano *Lippia palmeri* Wats es una planta perteneciente a la familia Verbenácea endémica en los estados de Sinaloa, Baja California Sur y del centro y occidente del estado de Sonora, encontrándose con mayor densidad de plantas la localidad de Puerto del Orégano y en Álamos, Sonora. Las hojas de esta especie silvestre son aprovechadas como condimento y en la medicina tradicional (Blanco *et al*; 2005).

Debido a su localización geográfica, las plantas de *L. palmeri* de la localidad Puerto del Orégano se encuentra, en hábitat y climas diferentes a la de Álamos. En Puerto del Orégano el clima es árido, con temperatura máxima de 48⁰C y precipitación pluvial de 180 mm (INEGI, 2009); Álamos cuenta con un clima templado o ambiente semi seco, a una altitud de 1 700 msm, con temperatura máxima de 30⁰C y mínima de 16⁰C, y la precipitación pluvial es de 347 mm (INEGI, 2009). Estas características que pueden inducir diferencias en la composición del aceite esencial de *L. palmeri* de las diversas regiones. Sarac y Hugor, 2008 al trabajar con varias especies de orégano y tomillo silvestres, encontraron que los aceites esenciales de las mismas especies, pero colectadas en diferentes localidades, mostraron variaciones en la actividad antimicrobiana debido a las diferentes concentraciones de algunos de sus componentes (ejemplo: carvacrol y timol). Por otro lado, la etapa de desarrollo de la planta, el tiempo de recolecta de las hojas y la extracción del aceite del orégano también pueden causar cambios en su composición (Toncer *et al*; 2009; Meza *et al*; 2007).

Los oréganos usados comercialmente pertenecen a los géneros *Origanum* y actualmente *Lippias*; la importancia económica de estas especies radica en el contenido y composición del aceite esencial, principalmente por su alta concentración de carvacrol y

timol. En México, los estados de Chihuahua, Durango, Coahuila, Jalisco y Zacatecas producen alrededor de 4000 t/año de hojas del orégano (*Lippia graveolens* y *Lippia berlandieri*), exportándose el 90% hacia Estados Unidos de Norte América y a Japón para cubrir la demanda de las industrias cosméticas, alimenticia y farmacéutica (González, 2001; Huerta, 1997; Osorno et al; 2009).

Entre las especies de orégano ya estudiadas (*Oreganum vulgare*, *Lippia multiflora*, *Lippia berlandieri*, *Lippia alba*, *Lippia graveolens* y *Lippia Julliana*), sus aceites esenciales han mostrado poseer alguna actividad biológica importante como antimicrobiana, antifúngica y antiparasitaria (Bassole et al; 2003; Pascual et al; 2001; Seenivasan et al; 2006).

Los aceites esenciales son ampliamente usados como conservadores en la industria de los alimentos, para prevenir la descomposición de alimentos por el crecimiento de microorganismos. Es ampliamente conocido que las especias o sus aceites esenciales pueden incrementar la vida útil de los alimentos debido a su actividad bactericida (Singh et al; 2008).

Concentraciones del orden de 0.5 a 8 g/l de aceite de romero *Rosmarinus officinalis* y *O. vulgare* presentaron un fuerte efecto bacteriostático en *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*, microorganismos comunes en procesos fermentativos de alimentos (Spotti, 2000). En el estudio de Rocha-Guzmán et al; 2007 se encontró que tanto el aceite esencial de orégano de México, como el agua residual de la extracción tienen buenas propiedades como antioxidantes en algunos alimentos.

Los aceites esenciales se han probado como insecticidas sobre plagas que atacan a semillas almacenadas, por ejemplo *Acanthoscelides obtectus* (gorgojo del frijol), *Rhyzopertha dominica* (gorgojo del trigo), *Tribolium castaneum* (gorgojo del garbanzo) y

Sitophilus oryzae (gorgojo del arroz) (Isman, 2000; Guigón *et al*; 2005; Papachristos *et al*; 2004).

El insecto *Zabrotes subfasciatus* Boheman, conocido como el gorgojo mexicano del frijol (*Phaseolus vulgaris* L), causa daños que varían según la región, estimándose pérdidas de 30-40% de la semilla almacenada de esta leguminosa y los deterioros causados a los cultivos se estiman en 5 a 10% de la producción (Credland y Dendy, 1992; Nensida *et al*; 2008). Para la protección de granos almacenados contra insectos es frecuente el uso de agroquímicos sintéticos como el bromuro de metilo, fosfina, diclorvos, fosfuro de aluminio, deltametrina, mercaption, malatión, paratión, entre otros que son de amplio espectro para el control *Z. subfasciatus* ya que son efectivos, en el momento de su aplicación. Sin embargo, debido al uso intenso de agroquímicos se han ocasionado serios problemas, que incluyen contaminación ambiental, impacto en la salud, desarrollo de resistencia, aparición de nuevas plagas, eliminación de entomofauna benéfica, incremento en los costos de postproducción y otros daños accidentales (Pascual-Villalobos, 1996; Clemente *et al*; 2003; Papachristos *et al*; 2004; Isman, 2000). Una alternativa de solución a estos problemas, es el uso de plantas naturales con propiedades insecticidas.

Los aceites esenciales, son mezclas complejas de varias sustancias, químicamente son derivados de terpenos y sus compuestos oxigenados producen un olor y sabor característico (Seenivasan *et al*; 2006). De entre los compuestos terpénicos, en los aceites esenciales destacan los monoterpenos y sesquiterpenos, que generalmente son tóxicos a insectos (Wagner, 2003; Papachristos, 2003).

Actualmente, los componentes en un aceite esencial son caracterizados por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM), que permite la separación e identificación de mezclas volátiles complejas. Es una técnica en fase gaseosa y se

necesita una pequeña cantidad de muestra, la cual es inyectada en el cromatógrafo de gases, acoplado a una columna cromatográfica que separa los compuestos eluyéndolos de forma sucesiva. Estos pasan inmediatamente al detector constituido por el espectrómetro de masas. Cada componente se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas cuya representación gráfica constituye el cromatograma TIC (por sus siglas en ingles: total ion current) (Gutierrez, 2002).

De los oréganos *L. graveolens* y *L. palmeri* especies existentes en México, la primera mencionada ha sido la más estudiada reportándose, que su aceite esencial contiene 45 componentes químicos los componentes mayoritarios son carvacrol, timol, eugenol, cimeno, pineno, linalol, entre otros (Vernin *et al*; 2001). Los constituyentes han mostrado propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas e insecticidas (Botelho *et al*; 2007; Oyedemi *et al*; 2009). Por el contrario el orégano *L. palmeri* no ha sido estudiado desconociéndose su composición y sus actividades biológicas, aunque se considera que puede presentar similitud en algunas de ellas con las otras especies de orégano antes descritas.

De acuerdo a lo anterior el presente trabajo tuvo como premisa el estudio de los aceites esenciales de *L. palmeri* de dos localidades silvestres del estado de Sonora, seguido de la caracterización de sus componentes y su uso potencial como agente antimicrobiano y como insecticida sobre *Z. subfasciatus*.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

Características generales del Orégano *Lippia palmeri* Wats.

El orégano *L. palmeri* habita en climas áridos y semiáridos del estado de Sonora, pertenece a la familia Verbenaceae. Es un arbusto, muy ramificado que mide de 0.70 a 1.20 m, de altura y de 0.30 a 0.80 m, de diámetro de cobertura foliar, dependiendo de las condiciones específicas de desarrollo y de la edad de la planta (Ortega *et al*; 2008). La producción de follaje de las poblaciones silvestres de *L. palmeri*, se forma dos semanas después de presentarse las primeras lluvias de temporal, concluyendo seis semanas después (Martínez, 1990). Durante la floración, que inicia a las siete semanas después de la formación del follaje, se produce una gran cantidad de flores, de las cuales solamente el 65% llega a la madurez. Las flores blancas que después se tornan de color violáceo, tienen la característica de presentar el fenómeno de auto polinización, produciéndose la fertilización (Ortega *et al*; 2008). Algunos elementos externos (agua, temperatura y luz) e internos (carbohidratos, niveles de nitrógeno, hormonas y genético) afectan la fenología de las plantas, su floración y expresión sexual (Evans *et al*; 2003).

El género *Lippia*, abarca diversas especies, pero la composición química del aceite esencial es similar a la del orégano europeo (Pascual *et al*; 2001). En nuestro país, se desarrollan dos especies comerciales semejantes a las del género *Origanum*: *L. palmeri*, distribuida principalmente en la península de Baja California, Sonora y norte de Sinaloa y *L. graveolens* en el resto de la República Mexicana (González, 2005). Las hojas de ambas especies son utilizadas para dar sabor y como conservador de alimentos

procesados y enlatados, de numerosos platillos nacionales e internacionales (Martínez, 1979; Huerta, 1997).

En la medicina tradicional, la infusión de las hojas de orégano *L. berlandieri*, *L. graveolens* y *L. palmeri* (frescas o secas) es usado como antiasmático; antiespasmódico (alivio de cólicos); antitusígeno (control de la tos y del asma); antihelmíntico (contra lombrices, en mezcla con hierbabuena y tomillo); anti-infeccioso (acción específicamente contra *Staphylococcus aureus*); emenagogo (regulador de la menstruación) y fungicida (acción contra *Candida albicans*) (Argueta *et al*; 1994; Huerta, 1997).

La producción nacional de orégano en México, es alrededor de 4,000 t, obtenida de poblaciones silvestres de los estados de Chihuahua, Coahuila, Guanajuato y Querétaro. Su ventas superaron los 8 millones de dólares, solo para cubrir la demanda de las industrias cosmética, alimenticia y farmacéutica de Estados Unidos de Norteamérica y de Japón, a donde se exporta más del 90% de la producción mexicana (Osro *et al*; 2009). Se observa de una demanda creciente de orégano mexicano que es considerado de excelente calidad en el mercado internacional por su alta concentración de timol y carvacrol. El litro de aceite esencial se cotizó en 170 dólares en 2002 y en 200 dólares en el 2006.

El orégano y todas las especies vegetales que se desarrollan en zonas áridas o semiáridas del país son de gran valor para la conservación de los ecosistemas, ofreciendo sombra y protección a pequeños mamíferos y aves, conservan la humedad y la acumulación de materia orgánica que mejora las características químicas del suelo (Silva, 2003). En Sonora, uno de los grandes problemas de este recurso es derivado de su

cosecha ya que en algunas comunidades rurales se realiza sin ningún plan de conservación del recurso, ni se considera el deterioro del ambiente. Esto a pesar de que existe un programa de promoción y vigilancia por parte de las instituciones encargadas de cuidar el ambiente (Silva, 2005). En cuanto a su manejo existen dos normas: la Norma Oficial Mexicana NOM-007-RECNAT-1997 que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de ramas, hojas o pencas, flores, frutos y semillas; y más recientemente la Norma Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, que establece la protección ambiental de especies nativas de México, de flora y fauna silvestre, así como el manejo y aplicación de métodos y técnicas para la conservación y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre y su hábitat.

Distribución y hábitat de *L. palmeri* silvestre y sus cambios en la composición de los aceites esenciales.

El orégano *L. palmeri* es un recurso forestal no maderable que habita en climas áridos y semiáridos, se encuentra sobre lomeríos rocosos, valles, arroyos, y matorrales desérticos (Villavicencio *et al.*, 2007). Esta especie es localizada en su hábitat natural: en Comondú, la Paz y Mulegé, Baja California Sur; en Hermosillo, Sonora; y en Tepetlán Veracruz. Mientras que la especie *L. graveolens*, se localiza en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Oaxaca y Sinaloa (Martínez, 1979).

El orégano *L. palmeri* en el estado de Sonora, se desarrolla de manera silvestre en (Puerto del Orégano y Álamos, Sonora). Donde se encuentra con mayor densidad de plantas. Puerto del Orégano localizado a 52 km de Hermosillo, Sonora con coordenadas geográficas de 29° 02' 52.5" latitud Norte y 110° 4 0' 15.8" longitud Oeste (Ortega *et al*;

2008) y una altitud de 380 msm; caracterizado como clima árido, con una temperatura máxima de 48°C y una mínima de 14°C, su precipitación pluvial es de 180 mm anual en promedio (INEGI, 2009); Álamos, Sonora, localizado a 450 km de Hermosillo, Sonora con coordenadas geográficas de latitud Norte de 27°01' 18" y longitud Oeste a 108°56' 34", y una altitud de 1 700 msm, temperatura máxima de 30°C y mínima de 16°C caracterizado como clima semiárido, y la precipitación pluvial de 347 mm (Ortega *et al*; 2008; INEGI, 2009). La planta ha sido registrada bajo número 01655 en el herbario de la Universidad de Sonora, donde su taxonomía fue confirmada. Ambas localidades se encuentran en ambiente diferente, presentando diferencias en su distribución geográfica, y en sus condiciones ecológicas de su ambiente natural.

En el estado de Sonora, el suelo de la región de Puerto del Orégano a profundidad de 35 cm presenta, una textura franco arenosa de 60 %, 30% limo, 20 % de arcilla, el pH de 6.5, y la conductividad eléctrica de 0.4 mmhos/cm. Mientras que en la localidad de Álamos, es de textura franco arcillo arenoso de 50%, 20% limo y 50% arcilla, pH 7.3, y conductividad 0.9 mmhos/cm. La mayoría de las plantas de orégano silvestres, son encontradas mayormente en altitudes desde 200 a 1800 msnm y con precipitaciones no mayores a los 300 mm de promedio anual en verano (Ortega *et al*; 2008; García, 1973).

La estructura, composición y grupos funcionales de los componentes del aceite esencial juegan un papel importante en la actividad antimicrobiana. Además se ha observado que la actividad de los aceites esenciales varía también dependiendo de la especie, subespecie o variedades de la planta (Yesil *et al*; 2007). En este sentido, la etapa de desarrollo de la planta y tiempo de recolecta de las hojas del orégano surgen cambios en la composición de los aceites esenciales; por ejemplo, las hojas del orégano *O. onites*, en hábitat semiárido fueron recolectadas en tres etapas de desarrollo (antes de la

floración, completa y después de la floración), obteniendo la composición del aceite esencial en seis momentos diferentes del día (6, 10, 12, 16, 20 y 24h). Los principales componentes del aceite fue el carvacrol, su contenido en el aceite esencial varió entre 24-52% y el más alto contenido de este componente se obtuvo a partir de las 10:00 h en las etapas de pre-floración, el contenido de timol cambió entre 2-23% y el más alto contenido se obtuvo a partir de las 24:00 h, también en las etapas de pre-floración, p-cimeno que varió (4-7%) y el más alto contenido fue a partir de las 12:00h en la etapa de floración completa (Toncer *et al*; 2009). Las plantas se vieron afectada por las condiciones genéticas y ambientales, que es determinado por la región, desarrollo y el tiempo de cosecha durante el ciclo vegetativo.

L. alba es una planta que se caracteriza por presentar cambios en la composición del aceite esencial dependiendo del estado de desarrollo de la planta, la parte empleada para su extracción, ubicación geográfica y clima. La variabilidad en la composición del aceite se ve reflejada en diversos estudios de esta especie, recolectada en diferentes regiones del mundo. El limoneno (44%) y la piperitona (31%) fueron componentes mayoritarios en aceite de *L. alba* originario de Guatemala (Senatore *et al*; 2001); el linalol (65%) fue el principal compuesto de esencia destilado de plantas de la India; y de Uruguay (55%) (Bahl *et al*; 2002; Lorenzo *et al*; 2001). El aceite esencial de *L. alba* Colombiano, es rico en limoneno (33%) y en carvona (51%), este último compuesto es utilizado en cosméticos (Stashenko *et al*; 2004).

El aceite esencial del orégano *O. majorana* mostró diferencias en algunos compuestos cuando se recuperaron por distintos métodos de extracción (hidrodestilación y arrastre con vapor), el método arrastre con vapor permitió obtener en el aceite una gran proporción de compuestos hidrocarbonados (monoterpenos) y oxigenados (carvacrol,

timol, cimeno, sabineno); además de ser un procedimiento sencillo, reproducible y económico (Meza *et al*; 2007). También se obtuvo diferencias en cuanto al origen de la planta *O. majorana*; el aceite esencial proveniente de Turquía contiene sabineno, mientras que el originario de Irán presentó carvacrol como el constituyente más abundante (Meza *et al*; 2007).

Como se puede observar la composición del aceite esencial en una misma especie de orégano, que es endémica de cada región, estado o país; difieren en su composición debido, a la cosecha de las hojas (antes de la floración, completa y después de floración), método de extracción, ubicación geográfica y medio ambiente de la planta.

Propiedades de los aceites esenciales y comparación de técnicas de extracción.

Los aceites esenciales se caracterizan por su olor pronunciado y penetrante, generalmente agradable, que siempre nos recuerda el olor del vegetal del que proviene, tienen sabor cáustico, acre e irritante y a veces aromático, dulce y delicado. Son sustancias de aspecto oleoso poco solubles o insolubles en el agua, a la que le comunican su aroma característico; solubles en alcohol absoluto, en el sulfuro de carbono, éter de petróleo, tetracloruro de carbono y demás solventes orgánicos, son volátiles y en su mayoría líquidos a la temperatura ambiente. Peso específico a 15°C oscila entre 0.8 y 1.2 g/ml, en los aceites etéreos el punto de ebullición varía entre 150 y 300°C. En lo que respecta a la volatilidad, los aceites esenciales (esencias) aromáticas, que son utilizadas en perfumes son menos volátiles y el conocimiento de su grado de volatilidad es un factor de importancia, estas esencias no se preparan aisladas, sino en combinación con otras

que deben tener las mismas características, tanto en la solubilidad como en la volatilidad (Parry, 1922).

Si los aceites esenciales se dejan en contacto con el aire, se oxidan perdiendo su olor característico. También se alteran fácilmente bajo la acción de la luz, volviéndose oscuros, modificando sus características. La acción del aire sobre estas sustancias, se debe a la transformación de los terpenos. Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que se usa para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico. También presentan un poder rotatorio característico, en razón de que poseen numerosos compuestos ópticamente activos (Parry, 1992).

Los procesos de extracción más utilizados en la obtención de aceites esenciales, son destilación con agua (hidrodestilación), destilación por arrastre de vapor, extracción con fluidos supercríticos y extracción con solventes. El principio de la destilación con agua consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua, se separa posteriormente. En la destilación por hidrodestilación, el material vegetal está en contacto con el agua que es generadora del vapor, aquí es mayor la acción del agua sobre el material, por ello se puede presentar hidrólisis y oxidación, los usos de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación básicamente están orientados a la perfumería, cosmética, industria farmacéutica y como aditivo e insumo para sintetizar compuestos (Regnault-Roger *et al.*, 2004; Moretti *et al.*; 2002; Isman *et al.*; 2000).

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal se coloca en un recipiente (tipo cleverger cerrado) y es sometida a una corriente de vapor de agua, así la esencia es arrastrada y posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción

acuosa. El fundamento de esta técnica, consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen del matraz extractor se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino (Parry, 2001; González *et al*; 2004). Esta técnica por su sencillez, bajo costo, reproducibilidad y rendimientos aceptables, es la más usada tanto a nivel laboratorio como en la industria de aceites esenciales. Varias farmacopeas la recomiendan como el método óptimo de obtención de esencias (Regnault-Roger *et al.*, 2004; González *et al.*, 2004).

Algunos autores han realizado en laboratorio la recuperación de aceite esencial de orégano utilizando la destilación con arrastre de vapor, como es el caso de *L. berlandieri* donde obtuvieron un rendimiento de 2.3 a 2.5 ml por 100g; de igual forma han recuperado el aceite esencial de *L. multiflora* donde su rendimiento fue de 1.6 ml, *L. alba* presentó 1.2 ml; *L. graveolens* 3.2 ml; *L. rugosa* 0.51 ml; *L. graveolens* (en hojas frescas) 1.15 ml; *O. onites* 2.4 ml y *O. vulgare* 6 ml (Salgueiro *et al*; 2003; Radudiene *et al*; 2005; Camilo *et al*; 2007; Bothelo *et al*; 2007, Hernández *et al*; 2009, Ngamo *et al*; 2007).

La extracción de aceites esenciales por fluidos supercríticos (EFS), supera a la técnica de arrastre por vapor, y su desarrollo es más reciente. El material vegetal se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (por ejemplo CO₂). Las esencias se solubilizan y arrastran, y el fluido, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente (Velasco *et al*; 2007). Finalmente se

obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Este procedimiento tiene varias ventajas: alto rendimiento, fácil eliminación del solvente (que además se puede reciclar), alta pureza del aceite y libre de residuos de disolvente. No se alteran las propiedades químicas de la esencia por las bajas temperaturas utilizadas para su extracción. Sin embargo el equipo requerido es costoso ya que se necesitan bombas y sistemas de extracción resistentes a las altas presiones utilizadas. Este método es utilizado para la obtención de antioxidantes naturales, extracción de alcaloides, obtención de esencias y especias en la industria agroalimentaria (Velasco *et al*; 2007).

La extracción de aceites esenciales con solventes volátiles. En este método, la muestra seca y molida se pone en contacto en forma continua con solventes tales como el etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; en un equipo tipo Soxhlet. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas, ceras, colorantes, gomas, mucílagos, proteínas, carbohidratos. 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 además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Parry, 2001).

Al comparar los cuatro métodos de extracción (hidrodestilación, arrastre con vapor de agua, el supercrítico SFE y extracción con solventes) en la obtención del aceite esencial de clavo, cuyo principal componente que es el eugenol, el método SFE fue más eficiente en cuanto al rendimiento del aceite y concentración de eugenol, seguido del método de arrastre con vapor (Guan *et al*; 2009).

Características de los aceites esenciales del orégano.

Los aceites esenciales son sintetizados en las tricoma glandulares (hojas), localizadas dentro de la estructura celular vegetal, formada por vellosidades glandulares, que son células modificadas del parénquima, canales lisígenos (espacios por disolución celular), cavidades esquizógenas (células separadas una de otras), canales resinosos y en los canales gomosos. La función de los aceites esenciales en las plantas, se asocia con la polinización, también como atrayente ó repelente de insectos dependiendo del olor de la planta, otra función es proteger a un tejido dañado en su proceso de cicatrización y como mecanismo de defensa contra otros vegetales (Gerothanassis, *et al*; 1998).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de varias sustancias, químicamente son derivados de terpenos y sus compuestos oxigenados producen el olor y sabor característico (Seenivasan *et al*; 2006). Los terpenos son compuestos orgánicos volátiles, emitidos por las plantas, en su síntesis dependen de la temperatura, estrés hídrico y de la cantidad de aceites y resinas; están presentes en las hojas y sirven a las plantas como mecanismo de defensa contra el ataque de animales y herbívoros (Guenther *et al*; 2000), y por lo tanto suelen ser tóxicos para los insectos, como por ejemplo las piretrinas, resinas de coníferas y aceites esenciales que poseen actividades antibacterianas y antifúngicas.

Los compuestos terpénicos (mayoritarios en los aceites esenciales) son los monoterpenos que contienen dos unidades de isoprénicas (10C), y los sesquiterpenos, contienen tres unidades de isopreno (15C), éstos pueden ser cíclicos o lineales, y se sintetizan a partir de acetil-CoA, vía ácido mevalónico (Rodríguez *et al*; 2002). Además, los compuestos terpénicos pueden ser acíclicos, por ejemplo cimeno, mirceno, linalol y geraniol; y en los monoterpenos monocíclicos, se tiene γ -terpineno, d-limoneno, felandreno y 1,8-cineol (Ikan, 1991).

Análisis de la composición de los aceites esenciales

La cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (CG-EM). Es uno de los métodos más eficientes para obtener la composición de los aceites esenciales que son mezclas homogéneas, volátiles y de bajo peso molecular. El aceite esencial en solución orgánica se inyecta directamente en el cromatógrafo. En la columna asociada al cromatógrafo, los componentes individuales se separan, pasando al espectrómetro de masas donde son ionizados y fragmentados, lo que permite registrar el espectro de masas correspondiente de cada una de las sustancias separadas. Los constituyentes del aceite esencial se identifican de acuerdo a los diferentes patrones de fragmentación que se observan en sus espectros de masas (Barry *et al*; 2006).

En el espectrómetro de masas, la identificación de los componentes de los aceites esenciales, se realiza con base en sus espectros de masas (EM), obtenidos por impacto electrónico y/o por ionización química. Varios analizadores básicos (magnético, cuadrupolar, de trampa iónica) se utilizan en espectrómetros de masas. En los últimos años los detectores de trampa de iones se emplean cada vez con más frecuencia en los estudios de mezclas complejas, incluyendo los aceites esenciales, sobre todo cuando se requiere alta sensibilidad en los análisis. En un espectro de masas se observa, en abscisas, la relación masa/carga (m/z) del ión molecular y los iones formados al fragmentarse la molécula y en las ordenadas, la intensidad (abundancia) de cada uno de los iones. Dado que en impacto de electrones generalmente las moléculas adquieren una carga +1, el m/z corresponde a la masa del ión molecular y sus fragmentos. La masa del ión molecular de los terpenos, son bastante parecidas, sin embargo, difieren en su patrón de fragmentación lo cual permite su identificación (Barry *et al*; 2006).

Por medio de CG-EM se ha reportado que los componentes principales de los aceites esenciales de orégano (*Origanum* y *Lippia*) son timol, carvacrol, p-cimeno y terpenos (Craveiro *et al*; 1981; Kokkini *et al*; 1997; Huerta, 1997). La mayoría de los estudios sobre la composición del aceite de orégano se relaciona con el del *Origanum vulgare* aunque se ha demostrado que el rendimiento y composición de los mismos depende de las condiciones del crecimiento de la planta, su hábitat y de su proceso de extracción (Avila-Sosa *et al*; 2010).

El orégano Mexicano *L. palmeri* W. presentó la misma concentración de aceite esencial que del orégano europeo *Origanum vulgare* (6%), y fue mayor que de otras Lippias (*L. graveolens*, *L. berlandieri*, *L. rugosa*, *L. alba*, *L. multiflora* entre otras). Estos aceites esenciales difieren en olor, ya que las concentraciones en sus componentes son diferentes y por lo tanto presentan diferente actividad biológica (Arcila-Lozano *et al*; 2004). Por ejemplo, el aceite esencial de *L. graveolens* (Tabla 1) presenta mayor concentración de carvacrol, timol, eugenol, cimeno, pineno, linalol, de los cuales el carvacrol y timol son considerados con propiedades insecticida y antibacterial (Vernin *et al*; 2001); en el aceite de *L. julliana*, el carvacrol, linalol, timol y p-cimeno, presentaron mayor abundancia, de los cuales carvacrol, timol y p-cimeno poseen propiedades insecticidas y medicinales (Juliani, 2000); el aceite esencial de *L. alba*, tiene alta concentración de limoneno, mirceno, dureno y p-cimeno, con propiedades medicinales e insecticida (Pascual *et al*; 2001); en el aceite esencial del *O. vulgare*, sus componentes mayoritarios y atribuidos a efectos insecticidas son timol, carvacrol, α -pineno, α -terpineno y p-cimeno (Magalis *et al*; 2008).

También se ha reportado que en el aceite esencial *O. mejorana* sus componentes mayoritarios son 1, 8 cineol; linalol; α y β pineno; tujeno; α -terpineol y terpineno-4-ol, con propiedades insecticidas (Young *et al*; 2009); los componentes mayoritarios de *O. onites*

son carvacrol, linalol, borneol, terpineno 4-ol, timol, p-cimeno y terpineno; y en el aceite esencial del *O. multiflora* son, carvacrol, timol, cimeno y linalol constituyentes con propiedades insecticidas (Huseyin y Atila, 2006). También el aceite esencial del *O. onites* tiene cantidades altas de sabineno monoterpeno, que se usa en fragancia y sabor (Toncer *et al*; 2009).

Tabla 1. Comparación de la composición del aceite esencial del género de *Lippias* y *Origanum*.

Componente	<i>Lippia</i> ^a <i>julliana</i> (%)	<i>Lippia</i> ^d <i>alba</i> (%)	<i>Lippia</i> ^c <i>graveolens</i> (%)	<i>Origanum</i> ^b <i>vulgare</i> (%)	<i>Origanum</i> ^e <i>mejorana</i> (%)	<i>Origanum</i> ^f <i>onites</i> (%)
α -Tujeno	0.18	0.18	0.6	0.9	2.5	0.4
α -Pino	0.23	1.14	1.2	4.3	3.6	2.5
α -Mirreno	0.9	5.40	0.86	3.1	2.4	1.4
α -Felandreno	0.89	0.43	0.12	1.5	1.0	2.3
p-Cimeno	2.52	8.4	2.52	6.1	4.1	7.4
Limoneno	0.3	3.5	1.0	0.13	0.23	0.17
α -Terpinoleno	0.69	-	0.2	2.4	4.8	2.7
o-Cimeno	0.15	0.32	0.9	12.5	2.3	1.0
Linalol	4.61	2.13	0.9	3.5	5.8	12
Cariofileno	0.87	2.36	0.9	24.5	12.6	6.3
Timol	2.5	6.98	7.4	42	34	24
Carvacrol	8.6	3.1	44.8	12	41	52
Eugenol	0.9	0.23	0.86	0.56	0.6	0.2

^aSalgueiro, 2003; ^bRadudiene, 2005; ^cCamilo y col. 2007; ^dBotelo y col. 2007; ^eYoung y col; 2009; ^fHuseyin y Atila, 2006.

Actividad antimicrobiana y usos en alimentos de los aceites esenciales

Se ha reportado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y a las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Elgayyar et al; 2001). Además tienen capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa* (Aligiannis et al; 2001). La actividad antimicrobiana de los componentes aislados del aceite esencial del *O. vulgare* se atribuye al contenido carvacrol y timol, siendo el timol más activo. Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el aceite esencial de *O. vulgare* se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos (Arcila- Lozano, 2004).

Los aceites esenciales de *L. multiflora* y *L. chevalieri* presentaron valores más bajos de CMI, para inhibir los microorganismos Gram negativo (*S. entérica*, *E.coli*, *S. disentería*, *P. mirabilis* y *E. faecalis*) que para los Gram positivos (*S. camorum*, *S. aureus*, *L. innocua* y *B. cereus*). *L. multiflora* presenta alta actividad antimicrobiana atribuida al alto contenido de timol. *L. chevalieri* tiene un alto porcentaje de p-cimeno, el cual ejerce un efecto antagónico con el carvacrol y timol, lo que explica su baja actividad antimicrobiana (Bassole et al; 2003).

También se encontró que el aceite esencial del *O. vulgaris* inhibió *Listeria monocytogenes* en productos de carne (Saeberg et al; 2003) y fue muy valioso en la inhibición de *E. coli* O157:H7 (Sagdic et al; 2002).

El crecimiento de otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus*, se ha logrado inhibir con extractos etanólicos del orégano (Hammer *et al* 1999). Todos estos estudios tienen importantes implicaciones en la industria alimentaria, ya que al contaminarse los alimentos con alguna de estas bacterias se pueden producir intoxicaciones al ser ingeridas en los alimentos.

Los aceites esenciales son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos, pues en muchas ocasiones el uso de sustancias antimicrobianas es indispensable en su conservación y para incrementar la vida útil de los mismos (Singh *et al*: 2008). Los aceites esenciales como agentes antimicrobianos, presentan dos características principales: la primera es su origen natural y la segunda, su bajo riesgo de desarrollo a la resistencia microbiana, debido a la mezcla de componentes que se encuentran en ellos.

El desarrollo de tecnologías no tradicionales de preservación de alimentos, donde se busca la conservación del alimento manteniendo sus características originales, dio paso a la aplicación de películas comestibles enriquecidas con sustancias con propiedades antimicrobianas. Las películas comestibles disminuyen la pérdida de humedad, de aromas y bajan la permeabilidad al O₂, reduciendo el deterioro. El enriquecimiento con aceites esenciales del orégano *O. vulgare* de las películas comestibles permite la lenta liberación del agente antimicrobiano prolongando su acción (Ponce *et al*; 2008).

La naturaleza de las bacterias sensibles al aceite de orégano justifica su uso popular en la preparación y conservación de los alimentos. Así Portillo *et al*; 2006. Sugiere el uso de aceite esencial de orégano *L. berlandieri* para controlar la descomposición

microbiológica en productos de panificación. También la calidad de la carne fresca para hamburguesas, está influenciada por el crecimiento microbiano que produce alteraciones en el olor, sabor y color. Con el uso del aceite esencial de *O. vulgare* y de tomillo que presentaron un efecto antimicrobiano (de moderado a fuerte) sobre bacterias gram positivas y negativas y de diferentes hongos en alimentos cárnicos (Love y Person, 2007; Helander, 2001). Concentraciones del orden de 0, 5 a 8 g/l de aceites de romero y orégano presentaron un fuerte efecto bacteriostático en los géneros *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici* que son comunes en procesos fermentativos de alimentos (Spotti, 2000).

En estudios realizado por Chouliara *et al*; 2007 se comprobó que la adición de aceite esencial de orégano incrementa la vida de anaquel de las pechugas de pollo almacenadas a 4°C en atmósfera modificadas. Las numerosas propiedades naturales de los aceites esenciales hacen de ellos unos agentes buenos en conservadores de alimentos.

Actividad insecticida y modo de acción de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales del orégano han presentado diversas actividades biológicas (Tabla 2). La más importante para el presente estudio son las actividades antimicrobiana e insecticida. Los aceites esenciales tienen efectos tan variados que van desde la repelencia por el insecto, actividad larvicida, inhibición de la alimentación y la toxicidad aguda e interferencia con el crecimiento y desarrollo de un insecto (Isman, 2001; Ngamo *et al*; 2007; Pascual y Ballesta, 2004; Huseyin y Atila, 2006 y Gleiser y Zygodlo, 2007).

Los aceites esenciales de *O. basilicum* y del *O. gratissimum* presentaron efecto insecticida sobre el gorgojo del garbanzo *Callosobruchus maculatus*, en granos almacenados (Sékou, *et al*; 2001). La mortalidad fue atribuida al carvacrol y timol componentes más abundantes en los dos aceites.

El aceite esencial del *O. vulgare* aplicado sobre dos plagas *Sitophilus zeamais* y *Acanthoscelides obtectus*; presentaron efecto insecticida para ambas plagas, atribuido al alto contenido de carvacrol y eugenol (Bittner *et al*; 2008). También posiblemente debido al alto contenido de timol y cimeno, en los aceites esenciales de *L. turbinata* y *L. polystachya* se observó el efecto larvicida sobre el mosquito *Culex vinquefasciatus* (Gleiser y Zygadlo, 2007). Por otro lado, los compuestos oxigenados del aceite esencial de *L. rugosa* presentaron efecto insecticida sobre las plagas de maíz, garbanzo y del arroz (Ngamo *et al*; 2007). Los aceites esenciales de *O. onites* y del *O. multiflorum*, son tóxicos para el mosquito *Culex pipiens*, toxicidad atribuida al carvacrol constituyente mayor en ambos aceites (Huseyin y Atila, 2006).

Por otro lado, Isman (2001) evaluó la actividad insecticida del aceite esencial *O. hortensis* sobre el gusano *Spodoptera litura* F, encontrando que los monoterpenos fenólicos presentes en este aceite podrían ser los responsables de la acción insecticida.

Tabla 2. Actividad biológica de aceites esenciales en especies de orégano

Especies de Orégano	Actividad biológica	Insecto: Bacteria: Hongo
<i>O. vulgare</i>	Insecticida	<i>Tribolium castaneum</i> ^a
<i>L. berlandieri</i>	Insecticida	<i>Acanthosceledis obtectus</i> ^b
<i>L. graveolens</i>	Insecticida	<i>Acanthosceledis obtectus</i> ^c
<i>L. alba</i>	Insecticida	<i>Acanthosceledis obtectus</i> ^c
<i>L. alba</i>	Antifúngico	<i>Alternaria solani</i> y <i>Colletotrichum occodes</i> ^c
<i>L. alba</i>	Antifúngico	<i>Cándida spp</i> y <i>Microsporum canis</i> ^d
<i>O. microphyllum</i>	Antifúngico	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>T. labrata</i> ^e
<i>L. alba</i>	Antifúngico	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> y <i>T. labrata</i> ^e
<i>O. vulgare</i>	Antibacterial	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> ^f
<i>L. graveolens</i>	Antibacterial	<i>Erwinia carotovora</i> ^g
<i>L. sidoides</i>	Antibacterial	<i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> y <i>M. smegmatis</i> ^h

^aTunc *et al*; 2002; ^bParedes-Aguilar, 2007; ^cMartines-Rocha, 2008 y Silva, 2002; ^dFontelle, 2007; ^eAligiannis *et al*; 2001; ^fArcila-Lozano *et al*; 2004; ^gObledo *et al*; 2002 y ^hPascual *et al*; 2001.
(L: *Lippia* O:*Origanum*)

Modo de acción de los aceites esenciales sobre insectos

El sistema nervioso completo de los insectos comprende tres entidades estructurales: el sistema nervioso central, sistema nervioso visceral y el sistema nervioso periférico. En los insectos, el sistema nervioso central comprende el cerebro y los ganglios extra cerebrales que incluyen aquellos en la cadena ventral. El sistema nervioso visceral, denominado también sistema simpático que regula las funciones de la vida

vegetativa y que normalmente suele ir asociado con el tracto digestivo y el sistema nervioso periférico está formado por todos los nervios que irradian sobre los centros ganglionares del sistema nervioso central y simpático (Hickman *et al*; 1990).

Los aceites esenciales del orégano, y en especial sus componentes puros como los monoterpenos y terpenos oxigenados, causan signos correspondientes a un modo de acción neurotóxico, incluyendo hiperactividad, convulsiones y temblores seguido por parálisis y muerte, los cuales son muy similares a los producidos por insecticidas como los organofosforados y carbamatos (Rocha y Garcia, 2008).

El mecanismo de acción descrito para estos aceites esenciales se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (ACE), interrumpiendo la transmisión sináptica normal del sistema nervioso central (SNC). La estructura sináptica está formada por la membrana presináptica, la hendidura sináptica y la membrana postsináptica, durante un impulso nervioso, como se aprecia en la (Figura 1). Donde ocurre una descarga químico-eléctrica en la membrana presináptica, y una vez que este impulso nervioso alcanza el otro extremo del axón, la propia neurona segrega un neurotransmisor (NT), que se deposita en un espacio sináptico (intermedio), entre la neurona transmisora y la neurona receptora ó postsináptica, este NT es el que excita o inhibe a otras neuronas. La ACE está presente en la terminación postsináptica que hidroliza rápidamente a la acetilcolina (AC), lo que con lleva a una repolarización de la membrana y las prepara para la llegada de un nuevo impulso; así la función normal de la AC, depende de su rápida hidrólisis por la ACE (Chatonnet *et al*; 2003).

El ácido acético liberado pasa a sangre y la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas NT. Por ende, la Inhibición de la ACE, provoca acumulación de AC, en la unión sináptica interrumpiendo la transmisión normal de los impulsos nervioso en el SNC, y provoca un desequilibrio en la actividad motora que causa asfixia y fallo respiratorio en el insecto (Bisset, 2002; Rocha y García. 2008).

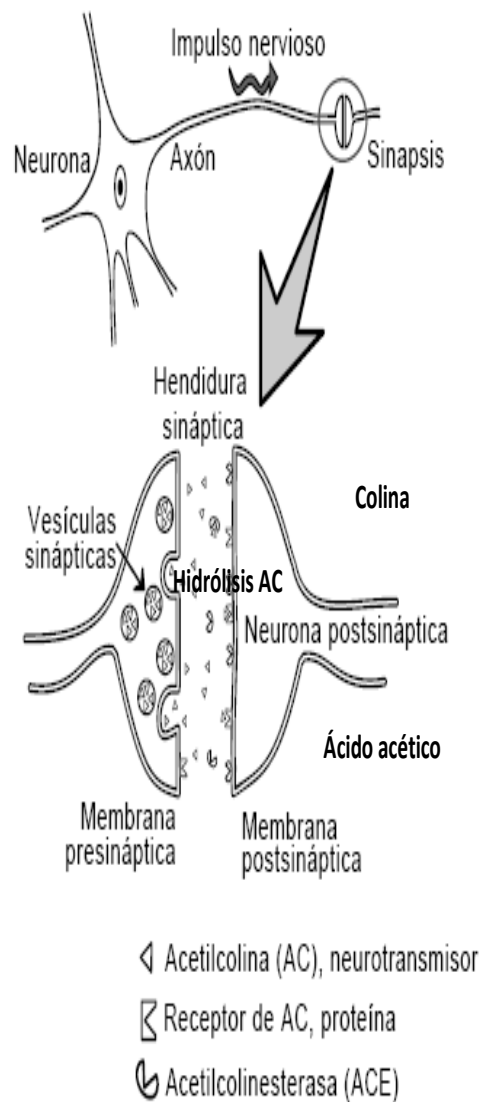


Figura 1. Sinapsis neuronal mostrando lo que sucede en un impulso nervioso (Sánchez-Hernández, 1999)

Insectos en granos almacenados

Se estima que en México las plagas de insectos que atacan al frijol y a otros granos almacenados provocan pérdidas del 30 al 40% de su valor (Credland y Dendy. 1992). Dentro de estas plagas, la familia Bruchidae y orden Coleóptero tiene gran importancia, ya que existen alrededor de 600 especies asociadas a productos almacenados, de los cuales sobresale el gorgojo del frijol *Zabrotes subfasciatus* (Boheman), considerado en América Latina, como una de las plagas de mayor incidencia.

El *Z. subfasciatus* puede iniciar su infestación desde el campo, cuando las vainas del frijol se abren o son destruidas por otros insectos (Schoonhoven, 1976). El daño que ocasiona, particularmente la larva, se manifiesta por la destrucción del endospermo del grano, pérdida de peso del mismo, cambios nutricionales en el grano, y contaminación del frijol con sus excrementos y otros restos orgánicos, confiriéndole olores extraños, calentamiento, migración de humedad y diseminación de patógenos (Vidales, 1991).

Importancia del frijol (*Phaseolus vulgaris*) y del gorgojo *Zabrotes subfasciatus*.

El frijol es un alimento básico para más del 60% de la población mundial. Proporciona carbohidratos, proteínas, vitaminas, fibra y minerales (Hoseney *et al*; 1991). Entre la gran variedad de granos consumidos en nuestro país, se encuentran en el segundo lugar en importancia después del maíz (FAO, 2000). Alrededor del 50 al 60% de la producción del frijol permanece en manos de pequeños productores, ya sea para autoconsumo o para la posterior comercialización, lo que hace necesario almacenar grandes cantidades de grano para su distribución o procesamiento, y en este período es

donde pueden presentarse daños por factores físicos como temperatura y humedad, así como factores biológicos como bacterias, aves, roedores, hongos e insectos, éstos últimos son los de mayor importancia ya que ocasionan grandes pérdidas, tanto económicas como en la calidad del grano destinado al consumo humano (SAGARPA, 2003).

El papel que juega el frijol en diversas regiones del país es fundamental para su consumo, se considera que el número de productores que se dedica al cultivo de esta leguminosa asciende a cerca de 570 mil, lo que convierte a la producción de frijol en la segunda actividad agrícola más importante en México (CEFP, 2004). En el Estado de Sonora se reporta un rendimiento de alrededor de 5.0 t/Ha (SAGARPA, 2005).

Una vez que ha sido cosechado, el almacenamiento del frijol, presenta algunas complicaciones, ya que la mayoría de los almacenes, no cuentan con una buena infraestructura, ni medidas que garanticen mantener la calidad e integridad del producto llegando a presentar problemas de infestación por insectos. Por esta razón, se fumiga cada mes para evitar la presencia de insectos como *Z. subfasciatus*, generalmente utilizando productos químicos como: bromuro de metilo, fosfina, diclorvos, fosfuro de aluminio, deltametrina o piretros, mercaptotión, malatión, paratión, organofosforados, carbamatos, entre otros. Esta es una práctica eficiente y rápida para solucionar el problema (Isman *et al*; 2000), sin embargo, los insectos pueden presentar resistencia a estos plaguicidas y provocar la contaminación del ambiente (Ramírez, 1981).

Son dos las plagas más importantes del frijol, el gorgojo pinto ó mexicano (*Zabrotes subfasciatus* (Boheman) y el gorgojo común o pardo *Acanthocelides obtectus* (Say). Ambas especies pertenecen al orden Coleoptera, familia *Bruchidae* y se encuentran ampliamente distribuidas por toda América, en los países tropicales y subtropicales de

África, Asia Occidental y Europa en donde sobreviven al invierno dentro de los granos almacenados (Dobie, *et al.* 1984).

Biología y hábitos de *Zabrotes subfasciatus*.

Z. subfasciatus es originario de las regiones tropicales y subtropicales de América Latina. Para su alimentación prefiere los granos de frijol, aunque también puede alimentarse de granos de otras leguminosas como haba, chícharos, lentejas y soya (Singh, 1979). El macho adulto es un insecto de color gris sombreado en algunas zonas, cuerpo robusto, más pequeño que la hembra (2 a 3 mm). La hembra es un poco más ovalada que el macho: de color negro, presenta dos manchas claras o blancas transversales sobre sus élitros, un macho puede aparearse hasta con 21 hembras aunque, las hembras se aparean dos veces como máximo (Singh, 1979). La oviposición dura de 1 a 7 días en condiciones favorables y la hembra puede empezar a ovipositar el primer día después de haber emergido. Las hembras ovipositan sus huevecillos adhiriéndolos fuertemente a la testa del grano y produciendo un promedio de 36 a 56, los cuales son de forma elipsoidal. Los huevecillos recién ovipositados son transparentes y después se tornan a un color crema. Al eclosionar del huevecillo, la larva penetra al interior del grano, donde comienza a alimentarse. La larva es robusta, encorvada, de color blanco marfil, mide aproximadamente 2 mm de longitud (Dobie *et al.*, 1984). Al alimentarse va cavando una galería dirigida hacia el centro del grano, el orificio se desvía hacia la testa y deja un círculo bajo la cascarilla, mismo que romperá cuando llegue su momento de emerger. La duración del ciclo biológico del insecto depende de varios factores como la humedad

relativa, temperatura, variedad de frijol y edad de la progenitora al momento de la oviposición (Rodríguez *et al*, 2000).

El periodo larvario tiene una duración de 13 a 18 días, la larva muda 5 veces antes de pupar. Durante el último estadio larval, las celdas larvales y de alimentación son visibles en forma de ventanas circulares por donde logra emerger. El ciclo completo del gorgojo mexicano del frijol se realiza dentro y fuera de los granos, el estado de larva y de pupa ocurre en el interior del grano. El adulto tiene una longevidad promedio de 21 a 30 días, pudiendo presentarse de 8 a 11 generaciones por año. En cuanto a las condiciones óptimas para su desarrollo, se ha encontrado que la temperatura ideal es 25-27°C y de 67 a 70% de humedad relativa (Ramírez, 1981).

Como podemos observar, se ha reportado, la actividad biológica como insecticida de los aceites esenciales de algunas especies de *Lippias* y *Origanum* sin embargo no se conoce el efecto y actividad del aceite esencial de *L. palmeri*. Por lo que en el presente estudio se evaluó el efecto insecticida del aceite esencial de *L. palmeri* sobre *Z. subfasciatus* plaga del frijol.

HIPOTESIS

El aceite esencial del orégano *Lippia palmeri* Wats extraído de plantas silvestres de dos localidades del estado de Sonora, presentan diferencias en su composición química y en sus actividades biológicas (antimicrobiana e insecticida).

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el aceite esencial del orégano *L. palmeri* Wats de plantas de dos localidades y evaluar su efecto antimicrobiano e insecticida.

OBJETIVO ESPECIFICOS

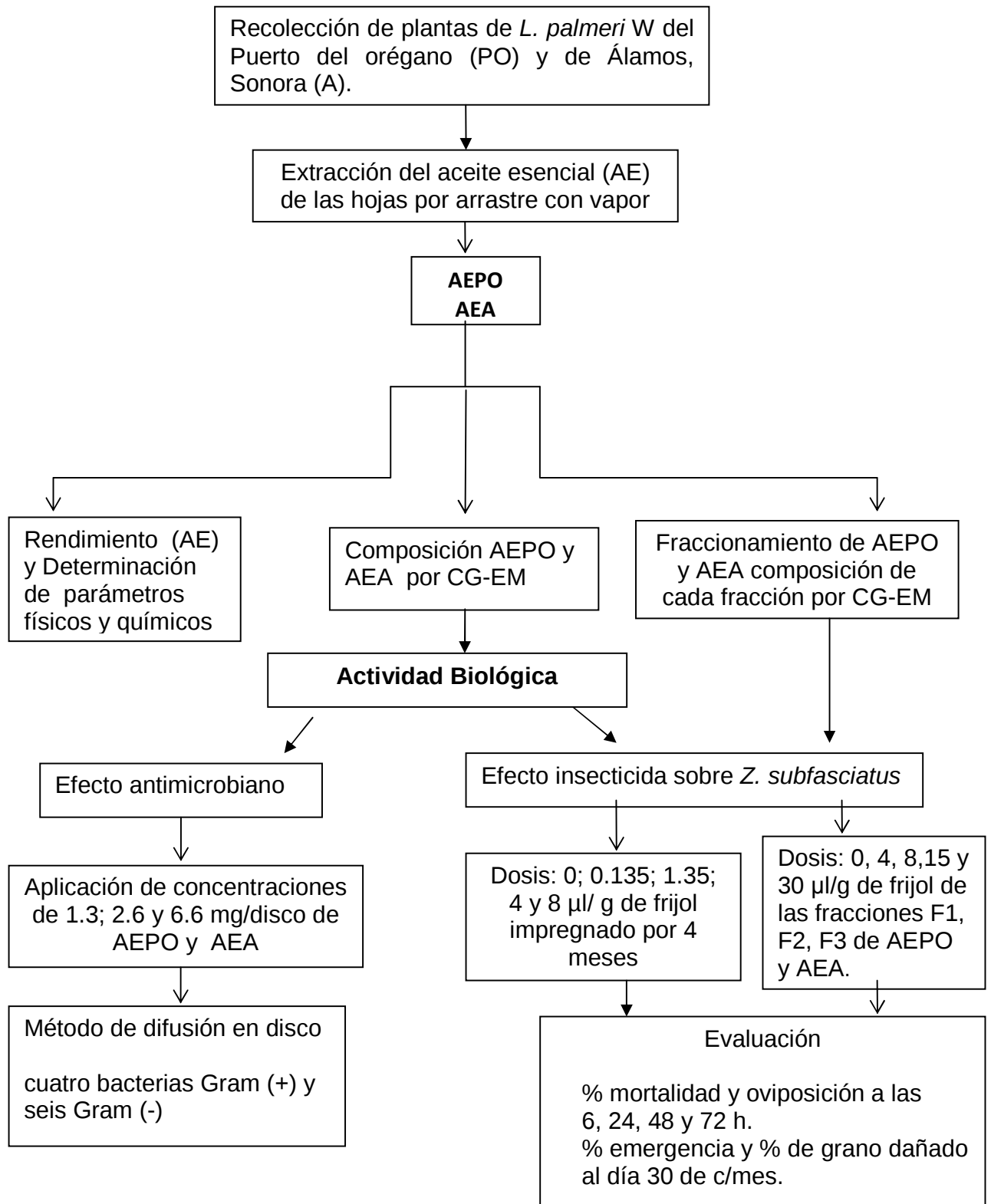
Caracterizar la composición química del aceite esencial de orégano silvestre (*L. palmeri* Wats) colectado en dos localidades distintas en el estado de Sonora, México.

Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *L. palmeri*.

Evaluar el efecto insecticida y residual del aceite esencial del orégano silvestre (*L. palmeri* Wats) sobre *Z. subfasciatus* en grano de frijol almacenado.

Fraccionar el aceite esencial del orégano *L. palmeri* Wats, obtener su composición química y evaluar el efecto insecticida de las fracciones sobre *Z. subfasciatus*.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



CAPITULO 2

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia palmeri* S. WATS)

M. Magdalena Ortega-Nieblas¹, María del Refugio Robles-Burgueño², Evelia Acedo-Felix², Alberto Gonzalez-Leon², Adriana Morales-Trejo³ y Luz Vázquez-Moreno^{2*}

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Rosales y Blvd. Luis Encinas s/n, Edificio 7G, C.P. 1819, Hermosillo, Sonora, México.

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Km 0.6 Carretera a La Victoria Hermosillo, Sonora, México. Apdo. Postal 1735, 833304 Tel. 01 (662) 289-2400 Ext. 219 Fax: 01(662) 2800058.

³Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, Carretera a Delta s/n 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

* Autor para correspondencia (lvazquez@ciad.mx)

RESUMEN

La composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia palmeri* S. Wats, colectada en dos localidades del Estado de Sonora, México fue estudiada. Los aceites esenciales (AEs) fueron extraídos de las hojas del orégano por hidrodestilación, analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y su actividad antimicrobiana fue investigada por difusión en disco. El aceite esencial de Álamos (AEA) y el del Puerto del Orégano (AEPO) presentó cincuenta y sesenta constituyentes, respectivamente. Los componentes fueron clasificados como monoterpenos, sesquiterpenos y fenólicos. Los componentes más abundantes en AEA (>2%) incluyeron p-cimeno, timol, isoaromandreno, carvacrol, γ -terpineno, p-timol, longipineno-epóxido y eudesmol; mientras que para AEPO fueron carvacrol, timol, p-cimeno, cariofileno, acetato de timol, α -bisaboleno, γ -terpineno, mirceno y α -cariofileno. Estos resultados implican que los quimiotipos involucrados fueron p-cimeno/timol en AEA y carvacrol en AEPO. En general, la actividad antimicrobiana de los AEs contra cuatro bacterias Gram-positivas y seis bacterias Gram-negativas varió con respecto al origen de la planta. Sin embargo, ambos AEs mostraron mayor actividad contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*. Este es el primer reporte de la caracterización del aceite esencial de *L. palmeri* y estos resultados indican que además de saborizar, pueden ser utilizados para preservar alimentos,.

Palabras claves

Lippia palmeri, composición aceite esencial, actividad antimicrobiana, orégano Verbenaceae.

SUMMARY

The chemical composition and antimicrobial activity of *Lippia palmeri* S. Wats essential oil extracted from plants collected from two localities (Alamos and Puerto del Oregano) in the State of Sonora, Mexico was examined. Essential oils (EOs) were obtained from oregano leaves by steam distillation, analyzed by gas chromatography coupled with a mass spectrometer, and their antimicrobial activity against human pathogens investigated by disc diffusion. Alamos and Puerto of Oregano essential oils (AEO and POEO) presented fifty and sixty constituents, respectively. The components were classified as monoterpenes, sesquiterpenes and phenolics. AEO most abundant components (>2%) included p-cymene, thymol, isoaromandrene, carvacrol, γ -terpinene, p-thymol, longipinene-epoxide and eudesmol; while for POEO were carvacrol, thymol, p-cymene, caryophyllene, thymol acetate, α -bisabolene, γ -terpinene, myrcene and α -caryophyllene. These results implicate that chemotypes involved were a p-cymene/thymol in AEO and carvacrol in POEO. In general, EOs antimicrobial activity against four Gram-positive and six Gram-negative bacteria varied according to the plant origin. However, both POEO and AEO showed the strongest activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. This is the first report of *L. palmeri* essential oil characterization and our results support the notion that these oils could be useful in food flavoring and preservation.

Index words

Lippia palmeri, essential oil composition, antimicrobial activity, Orégano Verbenaceae.

INTRODUCCIÓN

Lippia palmeri S. Wats (orégano) pertenece a la familia verbenaceae. La planta de orégano es un arbusto con muchas ramas, nativa de las zonas semi áridas de Sonora, Baja California y Sinaloa, México (Sherve y Wiggan, 1964). Los aceites esenciales (AEs) de algunas especies de *Lippias* tienen características comparables al orégano Europeo, *Origanum vulgare* (Gonzalez-Guereca *et al.*, 2007), el cual es usado como un saborizante fuerte para productos alimenticios y bebidas alcohólicas (Aligiannis *et al.*, 2001; Silva-Vázquez y Dunford, 2005), y que también tiene propiedades medicinales (Pascual *et al.*, 2001). El aceite esencial de *L. graveolens* contiene 45 compuestos químicos y los principales componentes son carvacrol, timol, eugenol, cimeno, pineno y linalool, entre otros (Vernin *et al.*, 2001). Algunos de estos componentes poseen propiedades antibacteriana, antiviral, antifúngica e insecticida (Carson y Riley, 1995; Bothelo *et al.*, 2007; Oyedemi *et al.*, 2009). *L. alba* Mill y otras *Lippias* tienen propiedades medicinales atribuidas al alto contenido de terpenos, que incluyen limoneno, mirceno, dureno y p-cimeno (Pascual *et al.*, 2001).

Los aceites esenciales de muchas especias aromáticas (orégano, tomillo, salvia, perejil, clavo, cilantro, ajo y cebolla muestran actividad antimicrobiana que varia dependiendo de la especie, subespecies y variedad de la planta (Friedman *et al.*, 2002; Burt, 2004., Benkelia, 2004; Celikel y Kavas, 2008; Martino *et al.*, 2009).

La variabilidad en cantidad y composición del aceite esencial en algunas plantas, particularmente en *Origanum vulgare* y *Lippias* dependen de su estado de desarrollo, factores climáticos, altitud, estación de la cosecha y manejo de la planta (Kokkini *et al.*, 1997; Dunford y Silva, 2005). Varios reportes muestran que las más altas concentraciones

ocurren cuando son cosechadas durante la floración de la planta. En México la mayoría del manejo de la población silvestre del orégano es de acuerdo a la Norma oficial mexicana (Carabias, 1997).

Se ha reportado la composición química y algunas actividades biológicas de los aceites esenciales de varias especies de *Lippias* y de *Origanum*; sin embargo, esto no se conoce para la especie mexicana *Lippia palmeri*. El objetivo de este trabajo fue caracterizar y determinar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *L. palmeri* S Wats cosechada de dos localidades diferentes (una zona árida y una templada) del estado de Sonora México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material de la planta

Las hojas de orégano *Lippia palmeri* S Wats fueron colectadas en el Puerto del orégano, un sitio árido, localizado a 52 km al Oeste de Hermosillo, Sonora. Puerto del Orégano localizado a 52 Km. de Hermosillo Sonora, con coordenadas geográficas de 29° 02' 52.5" de latitud Norte y 110° 40' 15.8" de longitud Este, a una altitud de 280 msnm (sitio árido), con una temperatura máxima de 48°C y una mínima de 14°C, su precipitación pluvial fue de 180 mm. La segunda localidad, Álamos Sonora, que es un sitio templado, con una precipitación promedio de 347 mm, altitud de 1700 msnm, 27° 01' 18" LN y 108° 56' 34" LW, Con una temperatura máxima de 30°C y como mínima de 16°C respectivamente (INEGI, 2009). La colección de la planta se llevó a cabo en octubre del 2008 antes de la floración. Las muestras fueron identificadas con el ejemplar de muestra No. 01655 del Herbario de la Universidad de Sonora, donde la taxonomía fue confirmada.

Extracción y Aislamiento

Las hojas de orégano fueron secadas a temperatura ambiente y a la sombra, separadas de los tallos y almacenadas en bolsas de papel. El contenido de humedad fue determinado por diferencia de peso y el de cenizas de acuerdo al método AOAC (2002).

El aceite esencial de Álamos y de Puerto del orégano (AEA y AEPO, respectivamente), fue obtenido de 100 g de hojas por destilación en un aparato tipo cleverger (Winzer®), con arrastre de vapor, durante 4 h con 1.5 L de agua destilada. El aceite esencial fue separado de la fase acuosa usando un embudo de separación, fue secado sobre sulfato de sodio anhidro y almacenado a 4°C hasta el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM). El contenido de AEs fue expresado en mL 100 g⁻¹ de hoja seca. La densidad ó gravedad específica fue determinada por el método descrito en el AOAC (2002), usando un picnómetro. El índice de refracción se determinó utilizando un refractómetro Abbé Bausch & Lomb modelo 31. El color del aceite fue determinado usando un colorímetro Chromameter CR200® Minolta, y el contenido de ácidos grasos libres fue determinado por titulación alcalina de acuerdo al método AOCS (2009). Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

Análisis del aceite esencial de *Lippia palmeri* por CG-EM

La composición de AEA y de AEPO fueron analizada por CG-EM usando un cromatógrafo de gases varian 3900® acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Varían Saturn 2100T®, una columna DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25mm). Las condiciones de operación fueron las siguientes: el gas acarreador usado fue helio grado 5.0 ultra puro a un flujo de 1ml min⁻¹; la temperatura de la columna fue mantenida constante a 50°C por 10 min, luego calentada a 290°C y mantenida constante a 290°C por

10 min; la temperatura del inyector fue de 300⁰C; el volumen inyectado 1µl de AE en metanol (1:10); con modo de inyección Split con relación de 1:100. Los parámetros de operación de EM fueron los siguientes: potencial de ionización 70eV; la temperatura de la fuente de ionización 300⁰C; el seguimiento de los iones totales fue dado en un rango de exploración de masas de 40-400 m/z (D'antuono *et al.*, 2000). La identificación de los picos de la CG correspondiendo a los componentes de los AEs se basó en la comparación directa de los tiempos de retención y los datos de los espectros de masas con los compuestos estándares y con los de la librería NIST 2000, y por comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas reportados en la literatura (Pino *et al.*, 1997; Derruís *et al.*, 2010). Los porcentajes relativos de los compuestos separados fueron calculados de las áreas de los picos del cromatograma de iones totales.

Actividad antimicrobiana

Los microorganismos probados fueron obtenidos de la colección del laboratorio acreditado de microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (Hermosillo, Sonora. México). Se determinó la actividad antimicrobiana de los AEs contra bacterias Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*) y bacterias Gram-negativas (*Salmonella Senftenberg*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* K88, *Escherichia coli* O157:H7 y *Escherichia coli* ATCC25922, usando una técnica modificada (método de difusión en disco de papel) descrito por Prabuseenivasan *et al.*, 2006. Brevemente, Las bacterias fueron desarrolladas en un cultivo de caldo Mueller-Hinton por 18 h a 37°C, y se ajustaron a 10⁵ UFC/ml con solución salina estéril y se sembró de forma masiva en placas de agar, utilizando un hisopo de algodón estéril para conseguir un crecimiento microbiano

uniforme. Los aceites esenciales fueron diluidos con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, conteniendo 0.5% Tween 80 (v/v), y fueron esterilizada por filtración a través de un filtro de membrana de 0.45 μm . Las diluciones de los aceites probadas fueron 1:1 (6.6 mg/disco), 1:5 (2.6 mg/disco) y 1:10 (1.3 mg/disco). 15 microlitos de cada dilución del aceite esencial fueron cargados en el disco de papel filtro estéril (5 mm de diámetro, Whatman® No.1) se dejó secar en una caja petri estéril y aplicadas sobre la placa de agar. Las placas fueron mantenidas por 30 minutos a temperatura ambiente y luego incubadas a 37°C por 18-24 h. Después de la incubación, los halos de inhibición de crecimiento fueron registrados, los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado y la media fue calculada. Los controles incluyeron discos impregnados con 15 μL de DMSO (como control del disolvente) y estreptomicina (25 μg /disco).

La sensibilidad a cada uno de los aceites fue clasificada de acuerdo al diámetro de inhibición de crecimiento y a especificaciones descritas por Celikel y Kavas (2008): no sensible si el diámetro total fue menor de 8 mm; sensible para 9-14 mm; altamente sensible para 15-19 mm; y extremadamente sensible para diámetro de inhibición mayores que 20 mm.

Análisis estadístico

Para establecer las posibles diferencias en las características de los aceites esencial de *Lippia palmeri*, un análisis de varianza fue llevado a cabo con un nivel de significancia $\alpha=0.05$, y la comparación de medias fue por la prueba de Tukey's, usando un paquete JMP versión 5.0.1 (SAS Institute, 2002).

Para la actividad antimicrobiana el diseño de experimentos fue un completamente al azar con un arreglo factorial de 2 x 3, donde el factor A fue aceite esencial con dos niveles

(AEA y AEPO), y el factor B fue diluciones con tres niveles (1:1, 1:5 y 1:10). Los datos fueron analizados por ANOVA/GLM a $p < 0.05$. La comparación de medias se hizo por la prueba de comparaciones múltiples de Tukey's-Kramer usando el paquete NCSS (2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento y algunas características fisicoquímicas de los AEs de orégano de ambas localidades se muestran en la **Tabla 1**. Las plantas del Puerto del orégano tuvieron un rendimiento de 6% del aceite esencial, mientras que las plantas de Álamos su rendimiento fue del 5%. El aceite esencial de *Origanum vulgare*, *Lippia sidoides* y *Lippia julliana* tienen similares rendimientos (Julini *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2005; Wogiatzi *et al.*, 2009). Estos porcentajes fueron más altos para *L. multiflora* (0.16%), *L. alba* (0.6%); *L. graveolens* (3.5%) y *L. laxibracteata* (3%) (Julliani *et al.*, 2000; Salgueiro *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2007; Owolabi *et al.*, 2009). El contenido de humedad de AEPO fue significativamente menor debido al hecho que AEPO proviene de un hábitat más árido. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el índice de refracción (RI) de los AEs, densidad o peso específico, acidez libre y color el RI para AEPO y AEA fueron 1.4813 y 1.4770, respectivamente, los cuales son ligeramente menores que los reportados (1.4817-1.4918) para *L. alba* (Ricciardi y Ricciardi, 2000) y para *L. graveolens* (Analiz *et al.*, 2000) y *O. vulgare* (Albado *et al.*, 2001). Los AEs estudiados exhibieron ligeramente menor densidad que los de *Origanum* y otras especies de *Lippias* reportadas (Ricciardi y Ricciardi, 2000; Analiz *et al.*, 2000; Albado *et al.*, 2001).

Tabla 1. Características del aceite esencial de *Lippia palmeri* de dos localidades del estado de Sonora México.

Características	AEA	AEPO
Rendimiento de AEs %	5.00 _a	6.00 _b
Humedad %	7.12 _b	3.15 _a
Cenizas %	7.58 _b	8.43 _a
Indice refracción 25 °C	1.47 _a	1.48 _a
Densidad específica g/mL	0.88 _a	0.87 _a
Índice de acidez libre %	2.80 _a	2.30 _a
Color	2.4R 50A _a	2.4R 50A _a
	Amarillo	Amarillo

Medias con letras iguales indican que no hay diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$). Los datos presentados son la media de tres repeticiones. AEA: Aceite esencial de Álamos. AEPO: Aceite esencial de Puerto del Orégano.

El análisis de los AEs por CG-EM llevó a la identificación y cuantificación de un total de 50 compuestos en AEA mientras que para AEPO presentó 60 compuestos, contabilizando para el 99.9 y 99.6% del total de los componentes (**Tabla 2**). La identificación fue dada por la comparación directa de los tiempos de retención y los espectros de masas de los compuestos con su respectivo compuesto de referencia, con los de la biblioteca y por comparación de los patrones de fragmentación de los espectros de masas con los reportados en la literatura. La identificación de los compuestos fue concluyente, ya que se llevó a cabo mediante el registro del conteo total de iones, y no por

el ion seleccionado (m/z), con los cromatogramas reportados por la librería NITS. En AEA, 11 componentes fueron los mas abundantes (de 1.0 a 22.3%) y constituyeron el 90.4 % de aceite. Estos componentes fueron el p-cimeno (22.3%), seguido por timol (21.3%), iso-aromandreno (17.7%), carvacrol (8.8%), γ -terpineno (6.7%), p-timol (5.9%), epóxido de longipineno (2.6%), α -eudesmol 2.5%, α -epóxido bisabolenol 1.3%, limoneno-6 ol 1.2%.

En AEPO, 12 compuestos fueron los mas abundantes (1.1-24.5%), representando el 88.1% del total de aceite, los cuales incluyeron carvacrol 24.5%, timol 15.1%, p-cimeno 14.2%, cariofileno 9.9%, timol acetato 5.5%, α -bisabolenol 4.8%, γ -terpineno 4.2%, mirceno 3.8%, α -cariofileno 2.2%, linalool 1.2% y terpineno-4-ol 1.2%.

Los aceites esenciales de ambas localidades fueron diferentes y permitieron identificar dos quimiotipos: AEA como un quimiotipo p-cimeno/timol y AEPO como quimiotipo carvacrol. Similar polimorfismo químico ha sido reportado para *O. vulagris* L. spp *hirthum* (Martino *et al.*, 2009; Kokkini *et al.*, 1997) *O. Syriacum* L (Lucas *et al.* 2009) y *Lippia junelliana* (Julliani *et al.*, 2002).

Tabla 2. Constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Lippia palmeri* de dos localidades del estado de Sonora México analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

[†] rt (min)	Compuestos	(%)		Molecular ion, m/z	^{††††} Principales iones fragmentados (m/z)
		AEA ^{††}	AEPO ^{†††}		
3.69	2-Ethyl-furano	0.02	0.02	96	55,67,42,89
4.37	Prenal	0.17	0.03	84	83,55,67,42
5.59	Borneol	0.07	0.34	154	67,95,81,55,110,93
7.60	2-Methoxy diethylanine	ND	0.12	103	99,67,41,115,69,55
10.60	α-Pineno	0.12	0.22	136	93,79,41,105,68
11.06	α-Thujeno	0.07	0.31	136	91,93,79,77,41,51
11.46	α -Pineno	0.32	0.23	136	93,91,77,92,79,
12.16	Origaneno	0.22	0.13	152	94,92,77,91,55,103
12.43	α-Terpinoleno	0.24	0.18	136	93,122,105,121,79.77
13.70	o-Cimeno	0.23	0.22	134	77,119,115,41
13.81	3-Careno	0.34	0.01	136	91,79,113,77,122,80
14.01	β-Felandreno	0.01	0.08	136	93,91,77,41,50,135
14.46	1-Nonen 3-ol	0.33	0.24	142	57,43,41,55,88,105
14.61	2-Ethyl-oxole	ND	0.03	128	57,43,41,108,67,55
14.82	Mirceno	0.16	3.82	136	93,41,69,91,67,79
15.30	3-Octanol	0.08	0.02	130	119,116,99,43
15.52	α -Felandrno	0.14	0.03	136	91,93,77,92,51
15.60	α-Terpineno	0.30	0.13	136	93,91,77,40,79,103
16.03	Terpinoleno	0.06	0.18	136	93,121,136,77,39,79
16.19	Cimeno	0.03	0.05	134	119,134,91,94,65,121
16.50	p-Cimeno	22.37	14.25	134	91,119,67,65,41
16.63	Limoneno	ND	0.74	136	68,119,93,91,67,79
16.72	oxido Cariofileno	0.81	ND	220	41,79,43,69,94,81
17.88	t-Terpineno	ND	0.13	136	93,91,77,136,121,92
18.44	Cis-b-Terpineol	ND	0.10	154	43,93,121,71,79,81
19.21	Dehydro-p-Cimeno	ND	0.07	132	118,115,91,65,131
19.29	Durenol	0.27	0.16	150	117,132,115,91,50,82
19.68	Linalool	0.44	1.20	136	93,71,55,41,69,77
19.91	α-Bisaboleno epóxido	1.31	0.11	220	71,43,93,121,69
20.43	3-Allyl cyclohexeno	ND	0.02	122	81,78,77,53,41
20.96	Felandreno	ND	0.05	136	77,91,136,79,94,80

21.95	2-Pineno 4-on	0.1	0.04	159	93,41,79,57,137
22.08	3-Thujen0 2-on	0.09	0.24	150	95,67,41,55,77,91
22.51	Terpineno 4-ol	0.37	1.15	154	71,93,43,68,55,88
22.79	p-Cimene 8-ol	0.08	0.04	150	135,119,91,65,55
23.01	α -Terpineol	0.12	0.19	154	59,43,121,93,91,136
24.03	Timol methylether	0.27	0.12	164	150,91,43,71,41
24.40	α -Pineneo epóxido	ND	0.50	152	41,93,69,93,121
24.64	Linalool acetato	0.12	ND	136	93,43,41,91,121,79
24.91	Geraniol	0.45	0.52	154	81,41,68,43,44,70
25.81	Carvacrol	8.76	24.57	150	135,107,91,51,43
26.15	Timol acetato	ND	5.5	192	135,150,107,91,63
26.34	Timol	21.39	15.11	150	135,107,151,43,91
26.43	p-Timol	5.94	ND	150	135,107,91,43,151
27.71	Eugenol	ND	1.34	164	149,103,77,55,121
28.00	o-Cimeno 5-ol	0.19	ND	150	119,150,91,107,134
28.34	Geraniol acetato	ND	0.49	196	69,41,43,67,93,121
28.98	Methyl eugenol	ND	0.80	178	164,149,91,103,55
29.50	b-Cariofileno	0.08	9.96	204	93,69,134,91,41,105
29.79	b-Farneseno	0.24	0.06	204	41,69,93,42,77,133
29.98	Aromandreno	0.21	0.41	204	161,91,105,119,107,41
30.43	α -Cariofileno	ND	2.24	204	93,151,91,105,79,77
31.13	α -Terpineno	6.69	4.23	136	93,121,78,105,91,43
31.34	Longifoleno	ND	0.07	204	165,104,107,151,91,93
31.71	b-Bisaboleno	1.04	0.44	204	93,121,165,105,91,43
33.49	(-) Spathulenol	0.83	0.85	204	43,159,105,131,93,187
33.62	α -Bisaboleno	0.39	4.77	204	95,107,121,109,105,43
34.25	iso-Cariofileno	ND	0.52	222	67,93,107,79,91,205
34.58	b-Eudesmol	0.13	0.15	222	149,93,108,67,79,81
34.90	aromandreno	0.41	0.41	220	136,91,41,67,77,93
35.36	α -Eudesmol	2.49	0.91	222	67,41,93,77,81,91
35.70	iso-Aromandreno	16.7	0.62	222	91,93,107,41,105,77
39.38	Longipineno epóxido	2.58	ND	252	43,95,109,58,77,81
40.27	4-Careno	0.16	0.07	136	113,91,121,81,77,135
42.86	m-Cimeno	0.81	ND	134	135,91,121,79,150,119
43.01	Limoneno 6-ol	1.22	0.08	236	93,67,109,68,177,50

Total identificados **99.94** **99.63**

[†]rt: Tiempo retención. ND: No detectado ^{††}AEA: Aceite esencial de Alamos. ^{†††}AEPO: Aceite esencial de Puerto del Orégano.. ^{††††} iones molecular y fragmentación de iones (m/z) fueron determinados por espectrometría de masas.

Cuando los componentes de ambos aceites fueron agrupados por su funcionalidad química, el grupo mas abundante fue monoterpenos fenólicos, seguidos por monoterpenos hidrocarburos y sesquiterpenos hidrocarburos (**Tabla 3**). El total de monoterpenos en AEA fue de 72.3% y 75.6% para AEPO, mientras que el total de sesquiterpenos fue de 27.2 y 21.5%, respectivamente. Los monoterpenos y sesquiterpenos representaron 99.4 y 97.1% del total de los componentes para los AEs estudiados de ambas localidades. Estos resultados hacen evidente la dependencia de la composición del aceite esencial con el origen geográfico del género *Lippia* (Prabuseenivasan *et al.*, 2006; Owolabi *et al.*, 2009).

Tabla 3: Componentes agrupados en base a funcionalidad química

Componentes	Porcentaje de aceite esencial de <i>L. palmeri</i>	
	AEA	AEPO
Monoterpenos hidrocarburos	32.26	25.06
Monoterpenos oxigenados	3.64	5.23
monoterpenos fenólicos	36.36	45.29
Sesquiterpenos hidrocarburos	19.06	19.50
Sesquiterpenos oxigenados	8.16	2.03
Fenolicos	0.26	2.30
Otros	0.19	0.22
Total identificados	99.94	99.63

AEA: aceite esencial de Álamos. AEPO: aceite esencial de Puerto del Orégano.

En estudios *In Vitro*, algunas especies han demostrado actividad antibacterial y los aceites esenciales de *Lippias* contra algunas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Salgueiro *et al.*, 2003; Burt, 2004; Botelho *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007; Paredes *et al.*, 2007; Owolabi *et al.*, 2009). Un número de aceites esenciales de especies de *Lippias* son comúnmente usados en medicina tradicional, como remedios gastrointestinales y respiratorios, y para tratamientos de heridas en la piel. Sus propiedades biológicas han sido atribuidas al contenido de carvacrol, timol y p-cimeno (Burt, 2004).

La actividad antimicrobiana de los AEs de *L. palmeri* fueron probados contra patógenos humanos Gram-negativos y Gram-positivos (excepto para *S. epidermidis*), todos ellos causan enfermedades transmitidas por alimentos causando intoxicaciones alimenticias. De acuerdo a la inhibición de crecimiento, las bacterias fueron clasificadas de no sensibles a extremadamente sensibles (**Tabla 4**). Los resultados revelaron que la inhibición de crecimiento por AEPO fue mayor que el de AEA. Todas las bacterias probadas fueron extremadamente sensibles a los AEs a las mas altas concentraciones estudiadas; a otras concentraciones el efecto antimicrobiano varió (*Listeria monocytogenes* no fue sensible con AEPO a la dilución 1:10).

La diferencias fueron significativas solo para *S. aureus*, *S. epidermidis*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *E. coli* K88. La interacción AEs y diluciones fue significativa para todas las bacterias excepto para *S. epidermidis*, *S. senftenberg*, y *S. choleraesius* y *E. coli* ATCC 25922 (**Tabla 4**). Estos resultados mostraron que la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* K88 y *E. coli* O157: H7 disminuyó con la concentración de AEs. La respuesta reducida observada de *L. monocytogenes* también ha sido reportada para AEs de tomillo, salvia, mirto, naranja y laurel (Celikel y Kavas. 2008).

Es importante enfatizar que *Echerichia coli* O157: H7 y *Staphylococcus aureus* son dos de los patógenos de mayor importancia de los productos cárnicos, en los cuales los AEs de *L. palmeri* podrían ser usados como conservadores naturales.

En este estudio, la variabilidad de la actividad antimicrobiana pudiera ser atribuida a las diferencias en composición de los aceites de orégano y en los sitios blancos de las bacterias. La fuerte actividad antimicrobiana de AEPO (comparada AEA) podría ser relacionada a su mayor contenido de monoterpenos fenólicos, y a la concentración de timol acetato, eugenol y metil eugenol. Otros reportes han atribuido la efectividad antimicrobiana del aceites esenciales del orégano a timol, eugenol y carvacrol (Analiz *et al.*, 2000; Aligiannis *et al.*, 2001; Salgueiro *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2007). El mecanismo de acción de estos compuestos fue relacionado a la hidrofobicidad de los componentes de los AEs que permite romper los lípidos de las membranas celulares de las bacterias, lo que incrementa la permeabilidad de los iones y la fuga de lípidos y proteínas lo cual podría causar la lisis celular (Aligiannis *et al.*, 2001; Oyodemi *et al.*, 2009).

Tabla 4. Halos de inhibición del crecimiento bacterial por el aceite esencial de *Lippia palmeri*.

Bacterias	Diluciones (mg/disco)					
	1:1	1:5	1:10	1:1	1:5	1:10
	(6.6)	(2.6)	(1.3)	(2.6)	(2.6)	(1.3)
	AEA			AEPO		
	Inhibición zonas					
	(mm)					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ^{†,††,†††}	30.0 ^b	19.5 ^c	20.5 ^c	37.0 ^a	28.0 ^b	21.0 ^c
	±2.1	±0.7	±0.7	±0.0	±1.4	±1.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 2228 ^{†,†††}	30.0 ^b	23.5 ^c	14.0 ^d	38.0 ^a	29.0 ^b	21.0 ^c
	±0.0	±2.1	±0.7	±0.0	±1.4	±1.4
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119 ^{†,††,†††}	21.5 ^a	13.0 ^b	10.5 ^b	26.0 ^a	21.0 ^a	10.5 ^b
	±2.1	±0.7	±0.7	±1.4	±1.4	±1.4
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 ^{†,††,†††}	24.0 ^a	9.5 ^c	9.0 ^c	20.0 ^b	10.0 ^c	0.0 ^d
	±1.4	±0.7	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
<i>Salmonella Senftenberg</i> ATCC 8400 ^{†††}	22.0 ^{ab}	20.0 ^{ab}	10.0 ^{cd}	25.3 ^a	16.5 ^{bcd}	12.0 ^{cd}
	±1.4	±0.0	±0.0	±3.5	±0.7	±1.4
<i>Salmonella Choleraesuis</i> ATCC 14029 ^{†††}	20.5 ^a	11.5 ^{ab}	11.0 ^b	22.5 ^a	12.5 ^{ab}	11.0 ^b
	±2.1	±0.7	±0.0	±2.8	±0.7	±0.0
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATC14028 ^{†,††,†††}	22.5 ^a	20.5 ^a	12.5 ^b	23.0 ^a	14.0 ^b	12.5 ^b
	±0.7	±0.7	±0.7	±0.0	±1.4	±1.4
<i>Escherichia coli</i> K88 ^{†,††,†††}	26.0 ^a	11.5 ^c	13.0 ^c	29.0 ^a	18.5 ^b	11.0 ^c
	±0.0	±0.7	±1.4	±0.3	±1.4	±0.0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ^{††,†††}	25.0 ^{ab}	23.5 ^b	19.0 ^{bc}	30.0 ^a	21.0 ^b	14.0 ^c
	±1.1	±0.7	±1.4	±0.0	±2.8	±2.1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ^{†††}	25.0 ^a	19.0 ^b	12.5 ^c	25.0 ^a	20.0 ^b	12.0 ^c
	±0.0	±2.1	±0.7	±0.0	±3.2	±0.0

Los números son medias y desviación standard del diámetro de halos en mm (duplicados). AEA: Aceite esencial de Álamos. AEPO: Aceite esencial de Puerto del Orégano. [†]Diferencias significativas entre AEs, ^{††} Interacciones significativas. ^{†††}Diferencias significativas entre diluciones (Tukey, P<0.05). Medias con letras iguales significativo que no hay diferencias significativas (Tukey,P< 0.05). La Sensibilidad de las bacterias fue clasificada por Celike and Kavas (2008). No sensibles: halo de inhibición < 8.0 mm; sensible: 9-14 mm; altamente sensibles: 15-19 mm y extremadamente sensibles > 20 mm.

CONCLUSIONES

La composición de los aceites esenciales de *L. palmeri* S Wats, varió con la región de colección. El AEA proveniente de zona templada fue un quimiotipo p-cimeno/timol, mientras que AEPO de una región mas árida fue quimiotipo carvacrol. Los monoterpenos fenólicos fue el grupo de terpenos más abundantes en ambos aceites. Con diferente potencia los aceites estudiados tienen la habilidad de inhibir el crecimiento de patógenos, haciendo a los AEs de *L. palmeri* útiles para la industria alimentaría como agentes saborizantes y conservador natural.

RECONOCIMIENTO

A los autores les gustaria reconocer a Rosalba Pérez-Morales por su apoyo técnico en el Laboratorio de microbiología del CIAD.

REFERENCIAS

- Analiz G L, F R Castro, L F Gómez (2000) Contribución al estudio de la calidad del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*). Revista Chapingo Vol 1, Serie Zonas Áridas 1:324-332.
- Albado P E, F Saez, G Ataucusi (2001) Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (Orégano). Revista Medica Herediana 12:16-19.
- Aligiannis N, E Kalpoutzakis, S Mitaku, IB Chinou (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:4168-4170.
- AOCS American Oils Chemists Society (2009) Official methods and recommended practices of American Oils Chemists Society. Vol 1, 6th edition, Champaign, Illinois, USA, AOCS Press. P: 1278.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists (2002) Official Methods of Analysis, 17th Edition. Washington, USA. pp:13-26.
- Benkeblia N (2004) Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie 37:263-268.
- Botelho MA, N A P Nogueira, G M Bastos, S G C Fonseca, T L G Lemos, F J A Matos, D Montenegro, J Heukelbach, V S Rao, G A C Brito (2007) Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40:349-356.
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potentials applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology 94:223–253.

- Carabias J (1997) Norma Oficial Mexicana NOM-007-RECNAT-1997.
- Carson C F, T V Riley (1995) Antimicrobial activity of the mayor component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Journal Applied Bacteriology 78:264-289.
- Celikel N, G Kavas (2008) Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech Journal of Food Sciences 26:174–181.
- D'antuono L F, G C Galleti, P Bocchini (2000) Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). Annals of Botany 86:471-478.
- Derwich E, Z Benziane and A Boukir (2010) Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoeniceae* and evaluation of its antibacterial activity. International Journal of Agriculture & Biology 12:199-214.
- Dunford N T, V R Silva (2005) Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentration in Mexican oregano grown under controlled conditions. Journal of applied Horticulture 7:20-22.
- Gómez G A, G D C Durán, J R Martínez, E E Stashenko, V J Olivero (2007) Comparación de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill). Scientia et Technica 33:227-229.
- González-Güereca M C, M Soto-Hernández, G Kite, M Martínez-Vázquez (2007) Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). Revista Fitotecnia Mexicana 30:43-49.
- INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2009) Anuario Estadístico de Sonora 2009. 1: 12-13.

- Juliani H R Jr, F Biurrun, A R Koroch, H R Juliani, J A Zygadlo (2000) Chemical constituents of essential oil of *Lippia laxibracteata* (Verbenaceae). *Planta Medica* 66:567-568.
- Juliani H R Jr, A R Koroch, H R Juliani, V S Trippi, J A Zygadlo (2002) Intraespecific variation in leaf oils of *Lippia junelliana* (Mold) Tronc. *Biochemical Systematics and Ecology* 30:163-170.
- Kokkini S, R Karousou, A Dardiotti, N Krigas, T Lanaras (1997) Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochemistry* 44:883-886.
- Lukas B, C Schmiderer, C Franz, J Novak (2009) Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:1362-1365.
- NCSS. (2001). Number cruncher Statistical system. Version 6.0.2. USA.
- Nunes R S, A M Lira, E Ximenes, J A Silva, D P Santana (2005) Characterization of the *Lippia sidoides* in vegetable raw material for pharmaceutical products. *Scientia Plena* 1:182-184.
- Martino L, V Feo, C Formisano, E Mignola, F Senatore (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from three chemotypes of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Letswaart growing wild in Campania (Southern Italy). *Molecules* 14:2735-2746.
- Oyedemi S O, A I Okoh, LV Mabinya, G Pirochenva, A J Afolayan (2009) The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, γ -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology* 8:1280-1286.

- Owolabi M S, A Ogundajo, L Lajide, M O Oladimeji, W N Setzer, M C Palazzo (2009) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Nigeria. Records of Natural Products 3:170-177.
- Paredes A M C, F M G Gastélum, V R Silva (2007) Efecto antimicrobiano de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *vibrio*. Revista Fitotecnia Mexicana 30:261-267.
- Pascual M E, K Slowing, E Carretero, D Sánchez Mata, A Villar (2001) Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology 76:201-214.
- Pino J A, A G Ortega, A R Perez, M Rodríguez, R Baduja (1997) Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill) n.e. Brown. Revista Cubana de Farmacología 30:1 p.0-0. ISSN 0034-7515.
- Prabuseenivasan S, M Jayakumar, S Ignacimuthu (2006) In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine 30:6(1)39 doi: 10.1186/1472-6882-6-39.
- Ricciardi G A, A Ricciardi (2000) Effect of stational variation and composition chemistry oil essential plant *Lippia alba* (Mill). Journal of Food Sciences 66:174–181.
- Salgueiro L, M Cavaleiro, A Goncalves, C Proenca (2003) Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. Planta Medica 69:80-83.
- Shreve F, I L Wiggin (1964) Vegetation and flora of the Sonoran Desert, Vol. 2. Stanford University Press 1255.
- Silva-Vázquez R, N T Dunford (2005) Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant maturity. Journal of Essential Oil Research 17:668-671.

- Vernin G, C Lageot, E M Gaydou, C Parkanyi (2001) Analysis of essential oil of *Lippia graveolens* HBK fom El Salvador. Flavour and Fragance Journal 16:219-226.
- Wogiatzi E, N Gougoulas, A Papachatzis, I Vagelas, N Chouliaras (2009) Chemical composition and antimicrobial effects of Greek origanum species essential oil. Biotechnology & Biotechnological Equipment 23:1322-1324.

CAPÍTULO 3

EFFECTO TÓXICO Y PERSISTENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO *Lippia palmeri* W DE DOS LOCALIDADES DE SONORA CONTRA *Zabrotes subfasciatus* BOHEMAN EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L ALMACENADO.

Ortega-Nieblas, M. M¹., Cortez-Mondaca, E²., Robles-Burgueño, M. R³., Gonzalez-Rios, H³., Serna-Félix, M¹., Morales-Trejo, A⁵ y Vázquez-Moreno, L^{3*}.

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. Rosales y Blvd. Luis Encinas s/n, Edificio 7G, C.P. 1819, Hermosillo, Sonora, México.

²INIFAP-Campo Experimental Valle del Fuerte. Carretera Internacional México-Nogales, Km 1609. Juan José Ríos, Sinaloa, México. C.P. 81110.

³Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, México. Km 0.6 Carretera a La Victoria Hermosillo, Sonora, México. Apdo. Postal 1735, 833304 Tel. 01 (662) 289-2400 Ext. 219 Fax: 01(662) 2800058.

⁴ Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Norte, México. Carretera a Delta s/n 21705, Ejido Nuevo León, Baja California, México.

(*Autor para correspondencia lvazquez@ciad.mx)

RESUMEN

EFFECTO TÓXICO Y PERSISTENCIA DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO *Lippia palmeri* W DE DOS LOCALIDADES DE SONORA CONTRA *Zabrotes subfasciatus* BOHEMAN EN FRIJOL *Phaseolus vulgaris* L ALMACENADO.

Se evaluó el efecto tóxico y persistencia del aceite esencial (AE) del orégano mexicano (*Lippia palmeri* Wats) contra el gorgojo mexicano *Zabrotes subfasciatus* Boheman mediante bioensayos por cuadruplicado, en un diseño experimental factorial. La planta fue recolectada en dos localidades silvestres (Puerto del Orégano y Álamos, Sonora) y los aceites esenciales (AEPO y AEA) fueron obtenidos por hidro-distilación en un equipo tipo Clevenger. Ambos AEs se usaron en dosis de 0.135, 1.35, 4.0 y 8.0 µl/g de frijol *Phaseolus vulgaris* L. La mortalidad y el efecto sobre la oviposición fueron evaluadas a las 6, 24, 48 y 72 h de almacenamiento; la emergencia de insectos y grano dañado a los 30 días. Para la persistencia del efecto tóxico se realizaron bioensayos cada mes, por un periodo de 4 meses después de haber sido aplicado el tratamiento. Los resultados mostraron que el efecto tóxico del AEPO contra el *Zabrotes*, así como su persistencia fue significativamente mayor que el de AEA en todas las dosis y meses evaluados. Ambos AEs mostraron un efecto letal y ovicida que persistió por 2 meses a partir de la dosis de 1.35 µl/g y tres meses a las dosis de 4 y 8 µl/g. No se observó emergencia ni grano dañado a estas dosis y meses de almacenamiento.

PALABRAS-CLAVE: Orégano, *Lippia palmeri*, Aceite esencial, efecto tóxico, *Zabrotes subfasciatus*.

SUMMARY

TOXIC EFFECT AND PERSISTENCE OF ESSENTIAL OIL ORIGANUM *Lippia palmeri* W FROM TWO LOCATIES OF SONORAN AGAINST *Zabrotes subfasciatus* BOHEMAN IN STORED *Phaseolus vulgaris* L BEANS.

The toxic effect and persistence of essential oil (EO) of Mexican oregano (*Lippia palmeri* W.) against weevil *Zabrotes subfasciatus* Boheman were evaluated by bioassays in quadruplicate, in a factorial experimental design. The plant was collected in two wild localities (Puerto del Oregano and Alamos, Sonora), essential oils (EOPO and EOA) were obtained by Clevenger-type water distillation. Both EOs were used in doses of 0,135; 1.35; 4.0 and 8.0 $\mu\text{L/g}$ of *Phaseolus vulgaris* L bean. Mortality and oviposition were evaluated at 6, 24, 48 and 72 h, of storage; emergency and grain damaged at 30 days. For persistence of toxic effect, bioassays were carried out each month for four months after the doses were applied. The result showed that the toxic effect and persistence of the essential EOPO againts *Zabrotes* were significantly greater than those of EOA at all doses tested and months. Both EOs at 1.35 $\mu\text{L/g}$ showed lethal and ovicidal effects that persisted for 2 months and for three months at doses of 4 and 8 $\mu\text{L/g}$. There was no insect emergency or grain damage at these doses and months of storage.

Keywords: Oregano essential oil, *Lippia palmeri*, toxic effect, *Zabrotes subfasciatus*.

INTRODUCCIÓN

El gorgojo del frijol, *Zabrotes subfaciatus* B es una de las plagas más importantes que afectan al frijol (*Phaseolus vulgaris* L) almacenado. Las hembras de este brúquido depositan alrededor de 35 a 50 huevecillos, en promedio por grano y las pérdidas ocasionadas por este insecto pueden variar entre 35-40% de acuerdo a la región geográfica (Credland y Dendy, 1992). El control de esta plaga se ha basado principalmente en el uso de insecticidas sintéticos de amplio espectro. Cuyo uso intensivo ha provocado resistencia en insectos, además de dejar residuos sobre los granos, aparición de nuevas plagas, eliminación de entomofauna benéfica, contaminación ambiental y daños a la salud humana (Rajendran y Sriranjini, 2008; Pascual-Villalobos, 1996; Clemente *et al.*, 2003).

Por estas razones, se han intensificado las investigaciones para el desarrollo de alternativas seguras que tengan el potencial para remplazar a los insecticidas tóxicos. En familias de plantas como las *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae* y *Piperaceae* cuyos AEs presentan compuestos con propiedades insecticidas contra plagas de importancia económica, como los insectos del orden Coleoptera (Saroukolai *et al.*, 2010; Ayvaz *et al.*, 2010; Aboua *et al.*, 2010). Por ejemplo, los aceites esenciales del *Origanum basilicum* L y del *Origanum gratissimum* L (Lamiaceae) provocaron una elevada mortalidad en el gorgojo *Callosobruchus maculatus* F en granos almacenados (Sékou *et al.*, 2001), la cual fue atribuida al contenido de carvacrol y timol; ambas abundantes en esos aceites. El aceite esencial del *Origanum vulgare* L aplicado sobre dos plagas *Sitophilus zeamais* Motsch. y *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera) presentó efecto insecticida atribuido al alto contenido de eugenol (Bittner *et al.*, 2008). Los aceites esenciales de *Origanum onites* L y del *Origanum minutiflorum* presentaron toxicidad contra

el mosquito *Culex pipiens* L atribuida al carvacrol, el mayor constituyente en ambos aceites de orégano (Huseyin y Atila, 2006). Además, el AE del *Origanum onites* también presentó efecto acaricida al evaluarse sobre *Rhipicephalus turanicus* P debido al carvacrol (Coskum *et al.*, 2008). Por otro lado, Isman en el 2001 reportó la actividad insecticida del aceite esencial *Origanum hortensis* (Moench) sobre *Spodoptera litura* F, encontrando que los monoterpenos fenólicos presentes en este aceite podrían ser los responsables de la acción insecticida.

En México existen 40 especies de orégano que pertenecen a cuatro familias botánicas, Lamiaceae, Verbenaceae, Asteraceae y Fabaceae (Huerta, 1997). Las especies del género *Lippia* (Verbenaceae) como *L. alba*, *L. graveolens*, *L. sidoides*, *L. multiflora*, *L. berlandieri*, *L. julliana*, *L. rugosa* y *L. palmeri* son tradicionalmente utilizados en medicina para tratamientos dermatológicos, gastrointestinales, respiratorios, actividades citotóxicas y las hojas son consumidas como sazónador en alimentos preparados (Pascual *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2009). Los AEs de algunas de estas especies tienen propiedades biológicas bioinsecticidas (Pascual *et al.*, 2001). Por ejemplo, el AE de *L. alba* mostró efecto insecticida contra *Acanthoscelides obtectus* Say. El AE de *L. sidoides* Cham tuvo un efecto larvicida contra *Aedes aegyti* Linn, el cual fue atribuido a su principal componente el timol. El efecto insecticida del AE de *L. rugosa* L. contra *Sitophilus zeamais* Motsch, *Callosobruchus maculatus* Fab y *Sitophilus oryzae* L fue atribuido al alto contenido de compuestos oxigenados presentes en el aceite (Ngamo *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la composición de los AEs varía con la estación de la cosecha, estado de desarrollo y manejo de la planta, así como de la altitud y de factores climáticos.

El orégano *L. palmeri* es una población silvestre, recurso forestal no maderable que en las últimas décadas ha adquirido gran importancia socioeconómica. La American Spice

Trade Association (ASTA) describe al orégano mexicano *L. palmeri* como uno de sabor más fuerte, de hojas más largas y con mayor contenido de aceite esencial, en comparación con la especie de *O. vulgare* (Lineo). Se localiza en los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California Sur, principalmente en climas áridos y semiáridos (Huerta, 1997), por lo que probablemente las condiciones ambientales influyen en la cantidad y composición del aceite esencial. Esta especie ha sido muy poco estudiada, solo se ha publicado la actividad biológica del extracto alcohólico y recientemente, el contenido y composición química del aceite esencial y su actividad antimicrobiana (Ortega *et al.*, 2011; Borboa *et al.*, 2010).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la actividad y persistencia insecticida del aceite esencial del orégano silvestre *Lippia palmeri* Wats, proveniente de dos localidades (del estado de Sonora) con diferentes condiciones ambientales, contra el gorgojo *Zabrotes subfasciatus* en grano de frijol almacenado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del Orégano *L. palmeri*.

Las plantas de orégano fueron cosechadas antes de la floración en octubre del 2008, en dos localidades del estado de Sonora, México. 1) Puerto del Orégano, localizado a 52 Km al este del municipio de Hermosillo, con coordenadas geográficas de 29° 02' 52.5" latitud norte y 110° 40' 15.8" longitud oeste y a 380 msnm; en una región caracterizada por su clima árido, con temperatura máxima de 48°C y mínima de 14°C, así como precipitación pluvial de 180 mm anual en promedio (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011;

INEGI, 2009). 2) El municipio de Álamos está localizado a 450 Km al sureste de Hermosillo, Sonora, con coordenadas geográficas de 27° 01' 18" latitud norte y 108° 56' 34" longitud oeste; y a 1 700 msnm, con temperatura máxima de 30°C y mínima de 16 °C, clima semi-seco cálido, con una precipitación pluvial de 347 mm (Ortega Nieblas *et al.*, 2011; INEGI, 2009).

Extracción y aislamiento de aceite esencial (AE).

Las hojas se separaron del tallo y se secaron a temperatura ambiente (aproximadamente a 27°C a la sombra) por dos días. Posteriormente fueron guardadas en bolsas de papel. El AE fue extraído de 100 g de las hojas por arrastre con vapor durante cuatro horas, usando un equipo de vidrio tipo Clevenger (Winzer®). El AE se separó de la fase acuosa por decantación, se pasó por sulfato de sodio anhidro y posteriormente se guardó en viales ámbar a 4°C para su conservación y uso posterior (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011). Al AE de Puerto del Orégano se le denominó AEPO y al de Álamos AEA.

Material biológico.

Con la finalidad de obtener la cantidad de insectos necesarios para los bioensayos y de usar especímenes de edad homogénea se realizó la cría del *Z. subfasciatus*, siguiendo la técnica descrita en USDA (1969). Se adquirió grano de frijol *P. vulgaris*, variedad mayocoba en el mercado local, como sustrato de cría y alimento del insecto. Se limpió y se confinó a 4°C por dos días para inhibir la posible contaminación del grano, posteriormente se depositaron 2, 200 g de frijol en recipientes de vidrio de 4 L (40 cm de longitud y 25 cm de diámetro) y se les introdujeron 150 insectos (75 hembras y 75 machos) obtenidos de grano de frijol contaminado. Los insectos fueron previamente identificados por el entomólogo Dr. Francisco Wong Ramírez del Departamento de

Entomología de la Universidad de Sonora. El grano y los insectos se mantuvieron en una incubadora Shell lab® modelo R128, a temperatura de 27°C, 70% HR y fotoperiodo de 12:12 h luz y oscuridad.

Evaluación del efecto tóxico y persistencia de AEPO y AEA sobre *Z. subfasciatus*.

Para evaluar el efecto insecticida del AEPO y AEA, así como su persistencia, el frijol impregnados con los AEs fue almacenado por cuatro meses, durante los cuales se realizó un bioensayo por mes (debido a que el ciclo biológico del *Z. subfasciatus* es de 30-35 días). Los bioensayos fueron realizados de la siguiente manera: el primer día de aplicación de la dosis respectiva, al día 30 para el bioensayo 1 (mes 1), bioensayo 2 (mes 2), el bioensayo 3 (mes 3) y bioensayo 4 (mes 4). En el bioensayo 1 se determinó el efecto insecticida y del bioensayo 2 al bioensayo 4 se determinó la persistencia del efecto insecticida del aceite esencial residual. Las dosis de AE ensayadas incluyeron 0 (control); 0.135; 1.35; 4.0 y 8.0 µl de AE/g de frijol (**Figura 1**). Estas dosis fueron elegidas de acuerdo a un bioensayo preliminar realizado para definir la ventana de respuesta biológica para el mismo insecto. Para el almacenamiento del frijol impregnado con cada AE se requirieron de cinco recipientes de vidrio de 1.0 L, a los cuales se introdujeron 480 g de frijol colocando en cada recipiente un papel filtro de 24 mm de diámetro impregnado con las dosis de AE antes citadas. Después, a los recipientes se les colocaron las tapas y se sellaron herméticamente. Los recipientes se agitaron suavemente para homogenizar la distribución del aceite en los granos y se dejaron en reposo por 24 h para enseguida iniciar los bioensayos durante los cuatro meses de almacenamiento.

Bioensayos. Para cada bioensayo, se retiraron cuatro submuestras (cuadruplicado) de 25 g de frijol del frasco con frijol impregnado con la dosis de AE correspondiente, y se pasaron a recipientes de vidrio de 250 ml. En cada uno de ellos se confinaron 10 insectos

de *Z. subfasciatus*, cinco hembras y cinco machos, de cinco días de emergidos y que previamente habían copulado. Enseguida, a los recipientes se les colocaron tapas horadadas y cubiertas con tela para asegurar el paso de aire. Posterior al confinamiento de los insectos, se realizaron cuentas de mortalidad y de huevecillos a las 6, 24, 48 y 72 h. Además, al final de cada bioensayo se registró el número de adultos emergidos y se calculó el porcentaje de grano dañado (**Figura 1**). La metodología de los bioensayos fue la misma y se realizó de acuerdo a la técnica modificada de Papachristos y Stamopoulos (2004).

Análisis CG-EM de los aceites esenciales residuales.

Al final del bioensayo 2 (mes 2) con la dosis de 0.135 µl/g de frijol, ambos AEs residuales fueron recuperados sometiendo los frijoles a extracción por arrastre con vapor y se analizaron por CG/EM. Esto para conocer los componentes que continuaban persistiendo durante el almacenamiento. El equipo utilizado fue un CG-EM Varian 3900 Saturno acoplado a un detector de masas Varian Saturno 2100T. El equipo tenía una columna capilar: DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm), la temperatura del inyector fue 250°C, con modo de inyección con split relación 1: 50; el volumen de inyección fue 1 µl de muestra diluida 1:10 en metanol; con helio ultra puro grado 5.0 como gas acarreador a flujo de 1ml/min, usando un programa de temperatura de 50°C por 10 min, 50°C a 290°C (5°C/min) y mantenida a 290°C por 10min. Con una fuente de ionización electrónica (EI) a 70 eV a temperatura de transferencia de 250°C. El monitoreo de ión total fue a intervalo de masas de 40-400 m/z (D'antuono *et al.*, 2001). La identificación de los componentes se realizó por los tiempos de retención y mediante la comparación de espectros de masas de la biblioteca de NIST.

Diseño experimental.

Para medir el efecto del aceite esencial de orégano *L. palmeri* sobre la mortalidad y oviposición de *Z. subfasciatus*, así como la persistencia de este efecto, se llevó a cabo un diseño experimental factorial 2 X 5 X 4 X 4. Estos 4 factores fueron: **Procedencia del aceite** con dos niveles (AEPO: Aceite esencial de orégano colectado en el Puerto del Orégano y AEA: Aceite esencial de orégano colectado en Álamos, Sonora); **Dosis** con cinco niveles (0 (control sin AEs) 0.135; 1.35; 4 y 8 µl/g de frijol); **Mes** con cuatro niveles (mes 1, 2, 3, y 4); y **Tiempo de lectura** con cuatro niveles (6, 24, 48 y 72 h). Se hicieron 4 repeticiones del experimento. Las variables de respuesta fueron: La mortalidad expresada en porcentaje, y número de huevecillos (oviposición).

Para evaluar el efecto sobre la emergencia de insectos y daño en grano se llevó a cabo un diseño experimental factorial 2 X 5 X 4. Estos 3 factores fueron: Factor A: **Procedencia del aceite** con dos niveles (AEPO y AEA); Factor B: **Dosis** con cinco niveles (0, 0.135, 1.35, 4 y 8 µl/g de frijol) y Factor C: **Mes** con 4 niveles (mes 1, 2, 3 y 4). Las variables de respuestas fueron emergencia expresada como número de insectos emergidos y el daño en grano expresado como porcentaje (%) de grano dañado.

Análisis Estadístico.

El análisis de varianza (GLM ANOVA) se realizó utilizando datos de mortalidad transformados ($\arcsen \sqrt{x}$), número de huevecillos, número de insectos emergidos y porcentaje de grano dañado transformados $\sqrt{x}$. El nivel de significancia fue de $\alpha=0.05$ y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey's usando el paquete computacional NCSS 2001.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo 6 ml de AEPO y 5 ml del AEA (Ortega-Nieblas *et al.*, 2011) los cuales fueron suficientes para todo los análisis del presente estudio.

Evaluación del efecto de AEPO y AEA sobre la mortalidad de *Z. subfasciatus*

El análisis estadístico en un diseño factorial de los datos generados de los bioensayos mostraron que la mortalidad del *Z. subfasciatus* fue afectada significativamente ($P < 0.05$) por todas las interacciones y los efectos principales, por lo que se analizaron los efectos simples para cada interacción. Todos los resultados se presentan con los datos sin transformar. En la interacción procedencia del AE y dosis se observó que el efecto del AEPO sobre la mortalidad de *Z. subfasciatus*, fue significativamente mayor ($P < 0.05$), que el efecto del AEA, con todas las dosis evaluadas excepto con la de 4 $\mu\text{L/g}$, en la que no se observó diferencias significativas entre ambos AEs (**Figura 2A**). A mayor dosis aplicada, mayor fue el porcentaje de mortalidad de *Z. subfasciatus*. Con las dosis de 0 $\mu\text{L/g}$ (controles), la mortalidad natural promedio entre las 0-72 h fue muy baja ($< 2\%$), mientras que la registrada con la dosis de 0.135 $\mu\text{L/g}$ de AEPO y AEA fueron 76 y 65% respectivamente. A diferencia, altos porcentajes de mortalidad (90-100%) fueron observados a partir de la dosis de 1.35 $\mu\text{L/g}$ (**Figura 2A**).

Por otra parte, a mayor concentración de las dosis, menor fue el tiempo requerido de exposición del *Z. subfasciatus* a los AEs para alcanzar el 100% de mortalidad. Con las dosis de 0.135 y 1.35 $\mu\text{L/g}$ se alcanzó el 100% de mortalidad a las 72 h y con las de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$ a las 48h. Es importante señalar que mortalidades mayores de 90% se observaron a las 6h con 4 y 8 $\mu\text{L/g}$ y con 0.135 y 1.35 $\mu\text{L/g}$ a las 48h (**Figura 2B**).

Generalmente los estudios de persistencia de los AEs se hacen en periodos cortos, en este estudio, se decidió analizar la persistencia por 4 meses. La interacción procedencia-

mes mostró la persistencia o residualidad del efecto insecticida de ambos AEs. No hubo diferencias significativas en la mortalidad promedio de *Z. subfasciatus* causada por AEPO y AEA al primer y segundo mes de tratado el grano, persistiendo el 100% del efecto insecticida independientemente de la dosis aplicada. La mortalidad promedio disminuyó al tercer y cuarto mes, siendo los valores significativamente mayores con AEPO (79 y 65%) lo que significa una persistencia del 92 y 76% respectivamente, mientras que con AEA, la mortalidad disminuyó a 72 y 47 %, lo que corresponde a una persistencia del 85 y 56% respectivamente.

Además, al incrementar la dosis aplicada aumentó la persistencia del efecto tóxico. Con la dosis de 1.35 $\mu\text{L/g}$ se alcanzó un 100% de mortalidad que persistió por 2 meses, y al mes 3 y 4 disminuyó significativamente a 81 y 62% respectivamente. Con las dosis de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$, el 100% de mortalidad persistió por tres meses y disminuyó significativamente a 79.2 y 92 % respectivamente en el mes 4 (**Figura 2C**).

Evaluación del efecto de AEPO y AEA sobre la oviposición y emergencia del *Z. subfasciatus*, y porcentaje de grano de frijol dañado.

Al igual que en mortalidad, en la evaluación de la oviposición y emergencia todos los efectos principales y las interacciones fueron significativos. La interacción procedencia-dosis mostró que al incrementar la dosis, el número de huevecillos ovipositados, emergencia de los insectos y grano de frijol dañado disminuyó con ambos AEs (**Figura 3**), siendo los valores significativamente menores en el grano impregnado con AEPO que con AEA en todas las dosis probadas. Con la dosis de 0 $\mu\text{L/g}$ (controles) se observó un promedio de 66.5 y 68.4 huevecillos. Este número se redujo significativamente a 16.8 y 20.4 al aplicar la dosis de 0.135 $\mu\text{L/g}$ de AEPO y AEA, lo que indica una inhibición de la oviposición en un 74.7 y 70.1% respectivamente. Con las dosis de 1.35, 4 y 8 $\mu\text{L/g}$ de

AEPO, la inhibición de la oviposición fue de un 94, 99 y 100%, mientras que con el AEA fue de 92, 99 y 98%. Esta reducción en la oviposición puede ser debida a la muerte temprana de los adultos. **(Figura 3A)**. La emergencia promedio fue 42 y 48 insectos en los controles. Con la dosis de 0.135 $\mu\text{L/g}$ disminuyó significativamente a un promedio 12.8 y 21.54 insectos que representa una inhibición de la emergencia del 69.9 y 55.7 % por AEPO y AEA respectivamente. Con las dosis de 1.35, 4 y 8 $\mu\text{L/g}$ de AEPO, la inhibición de la emergencia fue de un 98.0, 100 y 100%, mientras que con el AEA fue de 96.2, 99.7 y 99.1 % respectivamente **(Figura 3B)**. Por otra parte, el porcentaje de grano dañado disminuyó en la misma proporción observada en emergencia, alcanzando valores de 0% con la dosis de 4 $\mu\text{L/g}$ de AEPO, en la que a pesar de que se observó oviposición, las larvas no lograron desarrollarse solo alcanzaron el primer instar. De acuerdo a estos resultados, con esta dosis de AEPO se logró la eliminación del *Z. subfasciatus* en el frijol almacenado **(Figura 3C)**. Al transcurrir de los meses de aplicado los AEs se incrementó el promedio de número de huevecillos, emergencia y porcentaje de grano dañado, siendo los valores mayores con AEA que con AEPO.

La persistencia del efecto tóxico sobre la oviposición, emergencia y daño en el grano se observa en la **Figura 4**. La oviposición natural (controles) promedio fue de 68 huevecillos, el cual disminuyó a un promedio de 17 con la dosis de 0.135 $\mu\text{L/g}$, permaneciendo este promedio en el mes 2 para luego mostrar un ligero pero significativo incremento al mes 3 y 4. Con la dosis 1.35 $\mu\text{L/g}$ se observó un 100% de inhibición de la oviposición que persistió hasta el mes 2, no hubo emergencia ni daño en el grano de frijol **(Figura 4 A, B y C)**. Este mismo efecto persistió hasta el mes 3 con las dosis de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$. Al mes 4 hubo inhibición de la oviposición, la cual fue mayor entre mayor fue la dosis, alcanzando a disminuir el número de huevecillos a un promedio de 4 con la dosis de

8 µL/g. Solo a esta concentración no hubo emergencia y se observó menos del 2% de grano dañado (**Figura 4 B y C**).

De acuerdo a estos resultados, sería más económico aplicar la dosis 0.135 µL/g cada tres meses, ya que con 0.135 µL/g se logró el 100% de mortalidad a las 72 h, y el 100 % de inhibición de oviposición, y de emergencia de adultos de *Z. subfasciatus*, inhibiendo daño en el grano, con residualidad de dos meses, mientras que con la dosis más altas, 4 y 8 µL/g se obtuvieron resultados similares y la residualidad solo incremento un mes mas, es decir, el incremento de la residualidad no fue proporcional al incremento de la dosis.

Componentes residuales del mes 2 en ambos AEs con la dosis de 0.135 µl/g.

La **Tabla 1** muestra los componentes identificados y cuantificados por GC-MS en ambos AE recuperados al terminar el bioensayo del mes 2 con la dosis 0.135 µl/g. La identificación se llevó a cabo por comparación directa de los tiempos de retención y los espectros de masas de los compuestos con su respectivo estándar, con los espectros de la librería NITS y por comparación de los patrones de fragmentación del espectro de masas de los compuestos con los reportados en la literatura.

En AEPO se encontraron 11 compuestos que persistieron por dos meses, de los 60 compuestos reportados para este AE por Ortega-Nieblas *et al*; 2011, y 10 en AEA de los cincuenta reportados por los mismos autores. En ambos AEs se encontraron los mismos cinco componentes más abundantes: carvacrol, timol, p-cimeno, cariofileno y α-bisaboleno, sin embargo, las proporciones fueron distintas. En AEPO, el compuesto en mayor abundancia fue el carvacrol y en AEA fue p-cimeno. La mayor efectividad del AEPO puede deberse a que el contenido de los componentes fenólicos (carvacrol y timol) fue mayor en AEPO (61.9%), que en AEA (44.6%). A estos compuestos se les ha atribuido el

efecto insecticida de AEs contra plagas de granos almacenados; además, limoneno que ha reportado ser tóxico para coleópteros se encontró en AEPO y no en AEA (Sékou *et al.*, 2001; Isman *et al.*, 2001; Coskum *et al.*, 2008; Ayvaz *et al.*, 2010; Saroukolai *et al.*, 2010). Regnault y Hamraoui, 1995, señalan que la susceptibilidad de insectos (como los gorgojos plaga del frijol) *A. obtectus* y de *Z. subfasciatus* es por los monoterpenos presentes en los AEs los cuales son inhibidores competitivos de la acetilcolinesterasa e interrumpen la transmisión sináptica normal del sistema nervioso del insecto provocando convulsiones, parálisis y la muerte (Pedigo, 1992; Isman, 2000).

CONCLUSIÓN

El AEPO fue más efectivo contra *Zabrotes subfasciatus* que el AEA, lo cual puede ser debido a su mayor contenido de componentes fenólicos y a la presencia de algunos compuestos minoritarios como limoneno. Todas las dosis de ambos aceites fueron efectivas como insecticidas. Sin embargo, los mejores resultados fueron observados a partir de la dosis de 1.35 $\mu\text{L/g}$ de frijol en la que se logró el 100% de mortalidad de *Zabrotes* a las 72 h de aplicado el tratamiento, inhibió el 100% de la oviposición, y por lo tanto no hubo emergencias de insectos, ni grano dañado y este efecto tóxico persiste por dos meses. Mientras que con las dosis de 4 y 8 $\mu\text{L/g}$, este efecto tóxico persiste por 4 meses. Los resultados de este estudio mostraron que el aceite esencial de *Lippia palmeri* tiene un efecto tóxico agudo sobre *Zabrotes subfasciatus*, lo que indica que puede ser usado como protector de frijol almacenados.

REFERENCIAS

- Abouta L R N, Seri-Kouassi B Ph, Koua H K. 2010. Insecticidal Activity of Essential Oils from Three Aromatic Plants on *Callosobruchus Maculatus* F. in Côte D'ivoire. European Journal of Scientific Research Vol.39 No.2, pp. 243-250.
- Ayvaz A, Sagdic O, Karaborklu S, Ozturk I. 2010. Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects.. *Journal of Insect Science* 10:21 pp 1-13.
- Bittner M, Casanueva M, Arbert C, Aguilera M, Hernández V, Becerra J. 2008. Effects of essential oil from five plant species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53:1455-1459.
- Botelho MA, N A P Nogueira, G M Bastos, S G C Fonseca, T L G Lemos, F J A Matos, D Montenegro, J Heukelbach, V S Rao, Brito, G A C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40:349-356
- Borboa-Flores, J. Rueda-Puente, E. O, Acedo-Félix, E, Ponce, J. F. Cruz-Villegas, M., García-Hernández, J. L. y Ortega-Nieblas, M. M. 2010. Evaluación de la actividad antimicrobiana *IN VITRO* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12 (2010): 539 – 547.
- Camilo, D. D., Luz A. M., Jairo, R. M. and Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *lippia alba* provenientes de diferentes regiones de colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. *Scientia et Técnica*, (3): 435-438.

- Credland P, Dendy J. 1992. Comparison of seed consumption and the practical use of insect weight in determining effects of host seed on the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boheman). J. stored Prod. Res. 28:225-234.
- Coskum S, Oya G, Mine K, Malyer H, Onur A, Nese K, Kemal H. 2008. Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus tirinacus*. Parasitol Res. **103**:259-261.
- Clemente S, Mareggiani G, Broussalis A, Martino V, Ferraro G. 2003. Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products. Bol. San.Veg. Plagas. 29:421-426.
- Croteau R, Kutchan T, Lewis N. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. US, American Society of Plant Physiologists. P 1250-1319.
- D'antuono L F, G C Galleti, P Bocchini. 2001. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). Annals of Botany 86:471-478
- Fontenelle A, Maciel V, Arago A, Lacerda M, Braga M, Fontenele E. 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia Sidoides* Cham. Against *Aedes aegypti* Linn. Mem Inst. Rio Janeiro. 98:569-571.
- Hernández T, Canales M, Ávila J, García A, Meraz S, Caballero J, Lira, R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* (Verbenaceae). BLACPMAN. 8:295-300.
- Huseyin C, Atila Y. 2006. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. Journal of Vector Ecology. **31**:118-122.

- Huerta C. 1997. Orégano Mexicano: Oro vegetal. Revista Ciencia y desarrollo. 33:30-37.
- INEGI. 2009. Instituto Nacional de Estadística. Geografía e Informática. Anuario Estadístico de Sonora. 1: 12-13.
- INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática 2009). Anuario Estadístico de Sonora 2009. 1: 12-13
- Isman MB, Wan AJ, Passreiter C M. 2001. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm *Spodoptera litura*. Fitoterapia. 72:65-68.
- Isman MB. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. Crop. protection. 9:603-608.
- Ngamo TSL, Ngatanko I, Ngassoum MB, Mapongmestsem PM, Hance T. 2007. Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. African Journal of Agricultural Research. 2:173-177.
- Nensida P, Orlando Ch, González E, García NH. 2008. Post harvest losses of *common bean* seed in a traditional storage system. Bol. San. Veg. Plagas. 30:91-100.
- NCSS. 2001. Number Cruncher Statistical System. Guiders Lines. Version 6.0.2. USA.
- Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgueño MR, Vázquez-Moreno L, Acedo-Félix E, González-León A, Morales-Trejo A. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Oregano *Lippia palmeri* Wats from Two Localities in the State of Sonora. Aceptado en Revista Fitotecnia Mexicana, vol 34, 2011.
- Papachristos DC, Stamopoulus E. 2004. Fumigant toxicity of tree essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera:Bruchidae). J. Stored Product Research 40:517-525

- Pascual-Villalobos MJ. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Monografía INIA N0. 92. Madrid. España. p 35.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez D, Villar A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology. A review Journal of Ethno pharmacology. 76: 201-214.
- Pedigo LP. 1992. Entomology and Pest Management. New York. Collier Mc. Millan Pub. London.
- Rajendran S, Sriranjini V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. J Stored Prod Res 44:126-135.
- Radudiene J, Judpintiene A, Peiulyte D. and Janulis V. 2005. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. BIOLOGIJA. Nr. 4: 53-58
- Regnault RC, Hamraoui M. 1995. Fumigant toxic activity and reproductive inhibition induced by monoterpenes on *Acanthosceledis obtectus*, a bruchid of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). J. Stored Prod. Res. 31:291-299
- Salgueiro L R, C Cavaleiro, M J Gonçalves, A P da Cunha .2003 Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. Planta Medica 69:80-83
- Sékou-Moussa K, Jean-Pierre S, John-Thor A, Bélanger A. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab). (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research. 37:339–349.

- Saroukolai A T, Moharramipour S, Meshkatalasadat M H. 2010. Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. J Pest Sci (2010) 83:3–8
- U.S.D.A. 1969. Rearing manual of stored product insects research and development laboratory, Sanannah, GA. U.S.A.

FIGURA 1. ESTABLECIMIENTO DEL EFECTO TÓXICO Y PERSISTENTE DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO *Lippia palmeri* WATS SOBRE *Zabrotes subfasciatus* B.

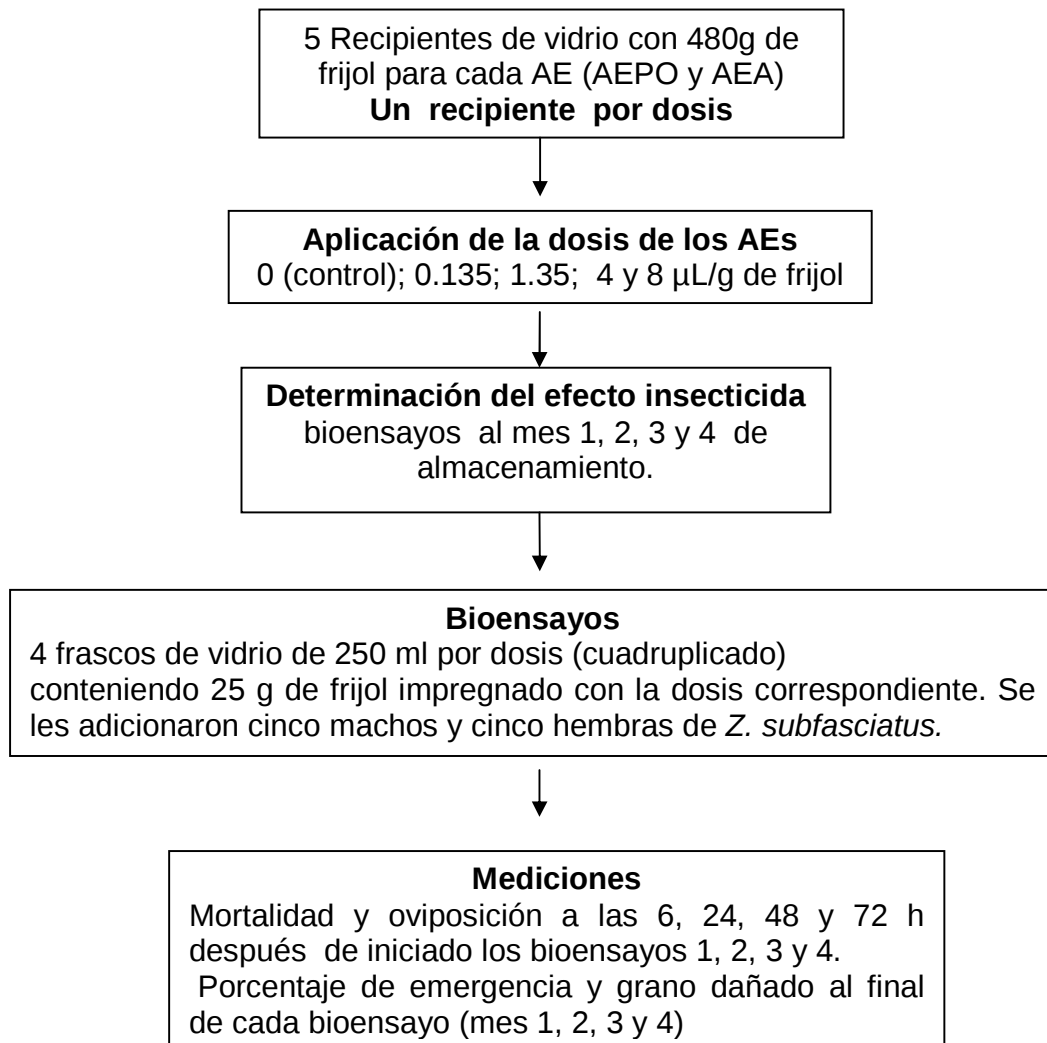


Figura 2. Porcentaje promedio de la mortalidad de *Zabrotes subfasciatus* Boheman de: A) la doble interacción de la procedencia del aceite esencial AEPO y AEA y las cinco dosis probadas. B) la doble interacción de dosis evaluadas y cuatro tiempos de observación. y C) la doble interacción de dosis evaluadas y meses de aplicado el tratamiento.

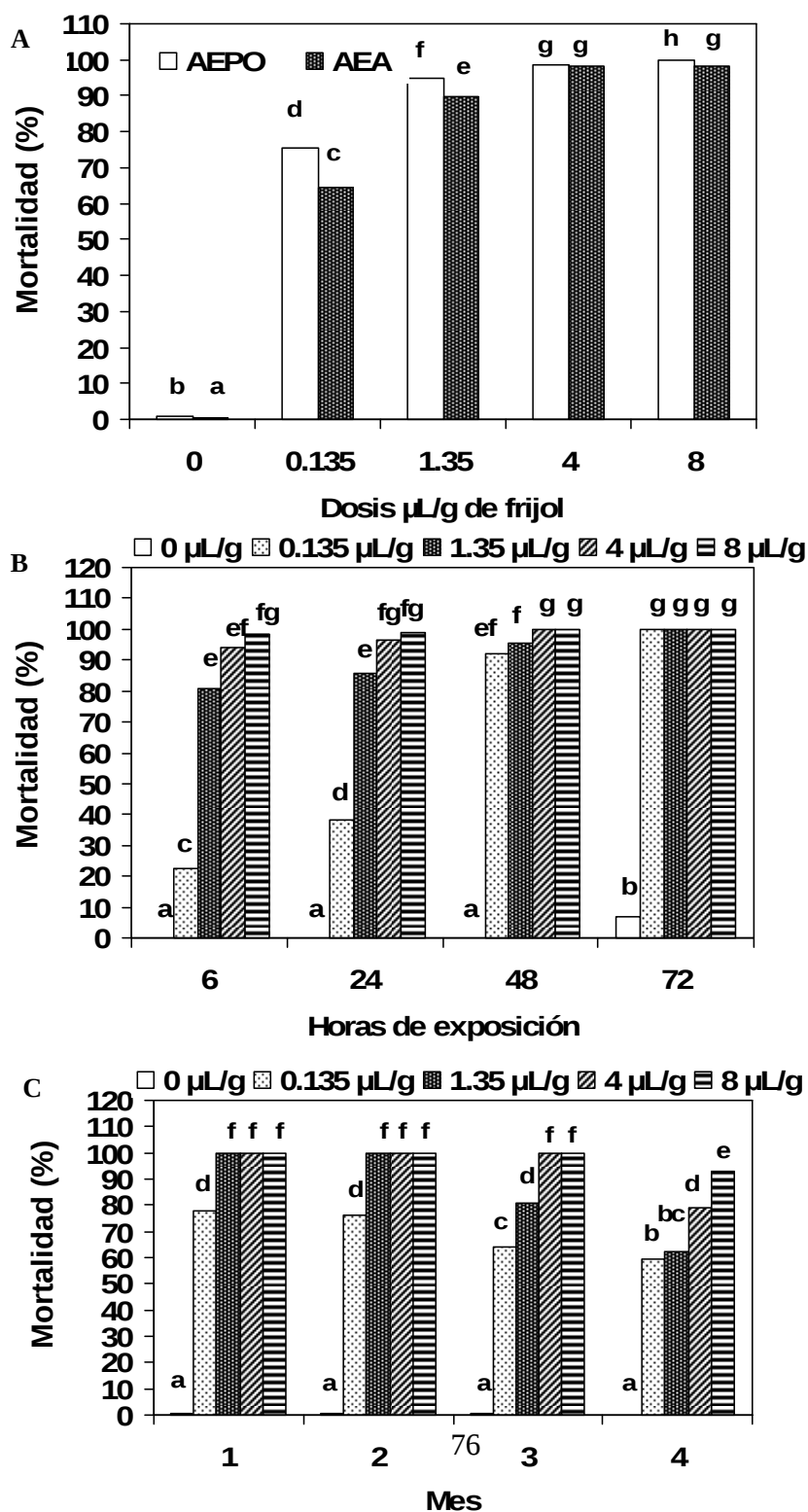


Figura 3. Efecto de la doble interacción de la procedencia del aceite esencial (AEPO y AEA) y las cinco dosis probadas sobre: A) el número de huevecillos promedio. B) porcentaje de emergencia promedio y C) porcentaje de grano dañado promedio.

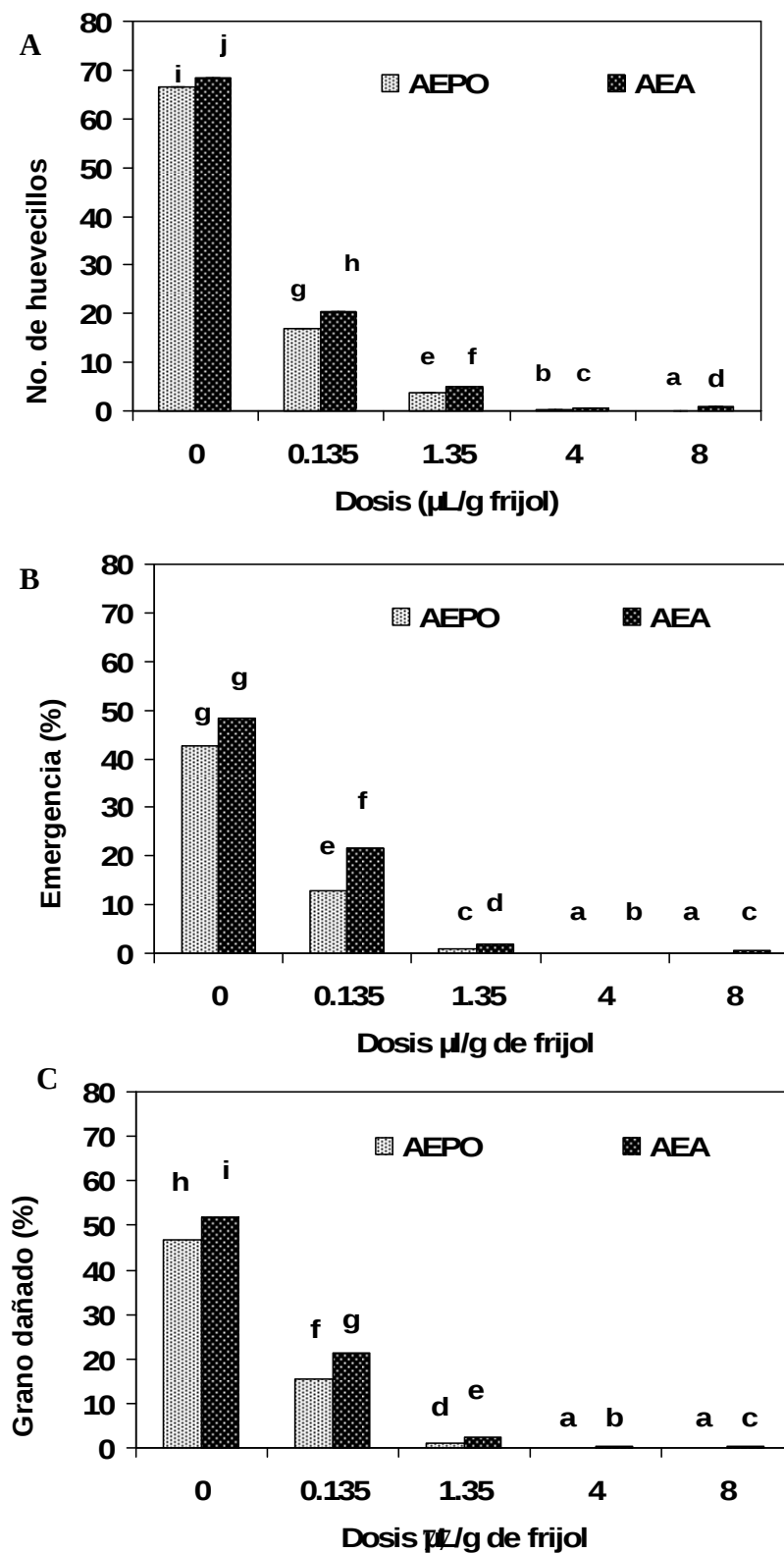


Figura 4. Efecto de la doble interacción de dosis evaluada y meses de aplicado el tratamiento sobre: A) el número de huevecillos promedio. B) porcentaje de emergencia promedio y C) porcentaje de grano dañado promedio.

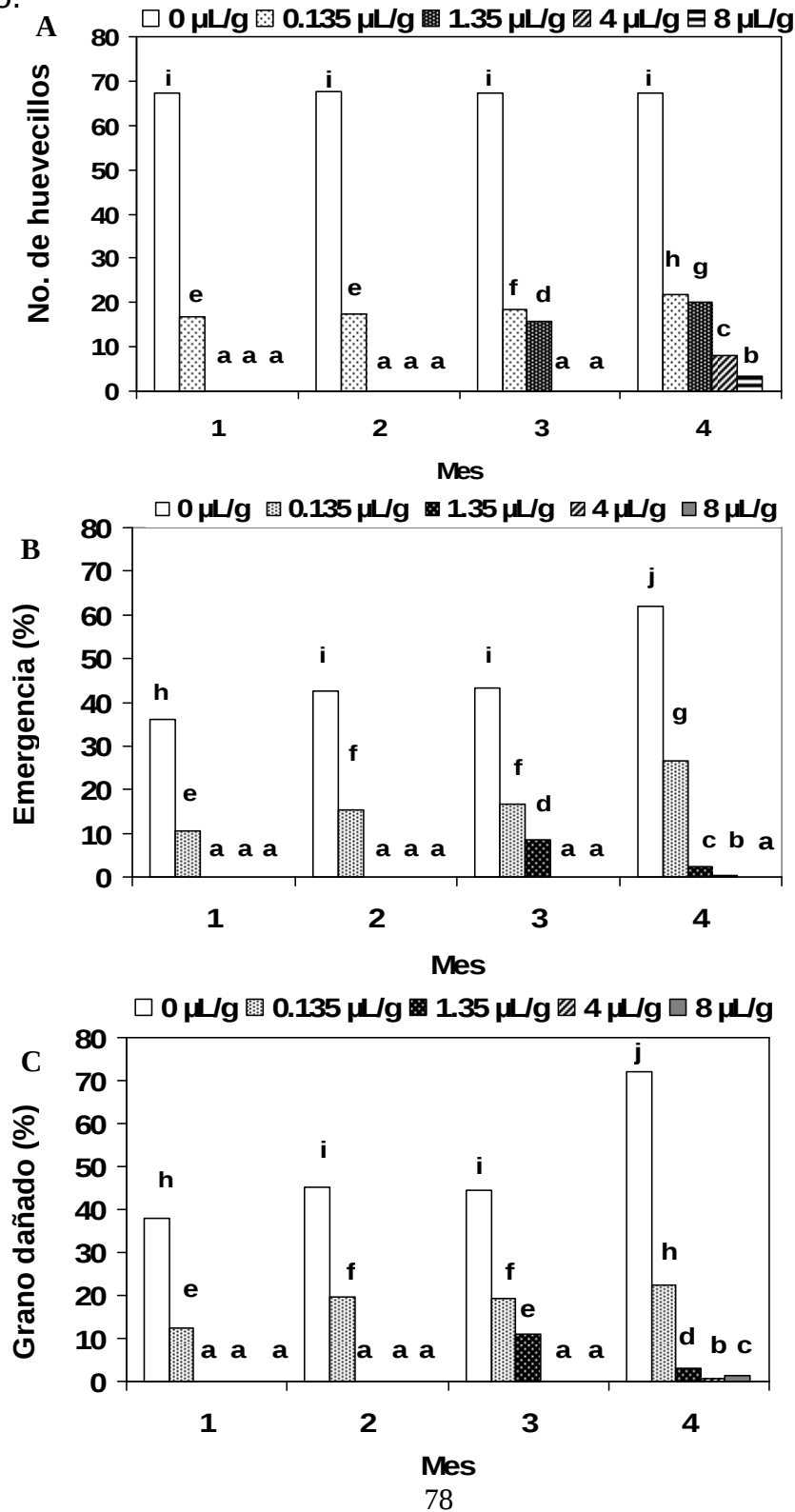


Tabla 1. Componentes de ambos aceites residuales al día 30 del segundo mes de la aplicación de AEPO y AEA en dosis de 0.135 µl/g.

Tr	Componentes	Porcentaje		m/z	m/z
		AEPO ^a	AEA ^b	Ión Molecular	Fragmentos
5.64	Borneol	3.28	ND	154	67,95,81,55,110,93
11.467	α-Pineno	0.87	0.62	136	93,91,77,92,79
14.866	β-Pineno	1.04	0.88	136	93,79,41,105,68
15.637	Limoneno	0.95	ND	136	68,119,93,91,67,79
16.533	p- Cimenol	15.62	33.70	134	91,119,67,65,41
26.221	Carvacrol	37.35	18.32	150	135,107,91,51,43
26.420	p-Timol	ND	5.47	150	135,107,91,43,151
27.485	Timol	24.56	20.80	150	135,107,151,43,91
29.512	β-Cariofileno	7.31	7.25	204	93,69,134,91,41,105
29.997	Aromandreno	1.52	0.42	222	161,91,105,119,107,41
30.453	α-Cariofileno	0.98	ND	204	93,151,91,105,79,77
31.153	γ-Terpineno	ND	5.72	136	93,121,78,105,91,43
33.606	α-Bisaboleno	6.28	6.55	204	95,107,121,109,105,43

Tr: tiempo de retención; AEPO^a: Aceite esencial del Puerto del Orégano, AEA^b: Aceite esencial de Álamos ambos del estado de Sonora.

CAPITULO 4

COMPOSICIÓN Y EFECTO INSECTICIDA DE FRACCIONES DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO *Lippia palmeri* W SOBRE *Zabrotes subfasciatus* B.

COMPOSITION AND INSECTICIDAL EFFECT OF FRACTIONS OF ESSENTIAL OIL OF OREGANO *Lippia palmeri* W IN *Zabrotes subfasciatus* B.

Ortega-Nieblas, M. M¹; Robles-Burgueño, M. R²; Morales-Trejo, A³ y Vázquez-Moreno, L^{2*}

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n, e/Sahuaripa y Reforma, CP. 83000 Hermosillo, Sonora. mortega@guayacan.uson.mx.

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Carretera a la Victoria Km. 0.6, CP 83000 Hermosillo, Sonora. cuquis@ciad.mx ; lvazquez@ciad.mx;

³Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Carretera a Delta s/n 21705 Ejido Nuevo León. amorales24@yahoo.com.

*Corresponding author lvazquez@ciad.mx

RESUMEN

El aceite esencial (AE) del orégano *Lippia palmeri* Wats, proveniente de dos localidades silvestres, Puerto del orégano (AEPO) y Álamos (AEA), se fraccionó mediante destilación y a diferentes temperaturas. Los componentes mayoritarios de las fracciones (F1, F2 y F3) de cada aceite fueron para AEPO, F1: cimeno (34%), cariofileno (23%), pineno (7.5%) y tujeno (6%); F2: carvacrol (68%), mirceno (14%), eugenol (5%) y linalol (4%); y F3: timol (50.5%), pineno (10%), metil eugenol (3%) y el iso-carifileno (3%). En el AEA se encontraron en F1: carvacrol (32%), cariofileno (18%), espatuleno (13%) y bisaboleno (6%); F2: p-cimeno (48%), carvacrol (15%), aromandreno (8%) y longipineno epóxido (6.5%); y F3: timol (67%), mirceno (8%), p-timol (8%) y terpineno-4ol (3%). Para conocer el efecto tóxico de cada fracción sobre *Zabrotes subfasciatus* se aplicarán las dosis 4, 8, 15 y 30 µl/g de frijol. Observando que la dosis de 4 µl/g el comportamiento de mortalidad fue igual a la dosis de 8 µl/g; y de igual forma la dosis de 15 µl/g fue igual a dosis de 30 µl/g, por lo que en este trabajo solo se reportan los resultados con la dosis de 4 y 15 µl/g. Los bioensayos realizados con la dosis de 4 µl/g, con F1 AEPO fue menos tóxico que la F1 AEA, ya que la mortalidad del insecto fue incrementando desde 20, 50, 90 y 100% de mortalidad a las (6, 12, 24 y 48h), y de 40, 60 y 100% de mortalidad a las (6, 12 y 24h) para F1 AEA. Registrándose huevecillos en los granos de frijol. Observando que al mes no hubo emergencia debido a que la larva no logró su desarrollo normal. Resultados que fueron significativamente menor ($P < 0.05$) que el control. Las fracciones (F2 y F3) del AEPO presentaron un mayor efecto insecticida ó tóxico (100% mortalidad desde las 6h), que las de AEA. Con la dosis de 15 µl/g la AEA F1 fue más tóxica que la de AEPO, mientras que la F2 de AEPO su efecto tóxico fue mayor que la de AEA. La F3 de AEPO y AEA presentaron mortalidad y altamente tóxica para *Z. subfasciatus*, registrando el 100% de mortalidad a partir de la hora 6 de evaluación. La Mortalidad de *Z. subfasciatus* puede ser atribuida a los componentes más abundantes de cada fracción en F1 y F2 que fueron p-cimeno y carvacrol, mientras que para F3 fue timol.

Palabras clave: aceite esencial fraccionado, orégano *Lippia palmeri*, efecto insecticida, *Zabrotes subfasciatus*.

SUMMARY

The essential oil (EO) of Oregano *Lippia palmeri* Wats, from two localities wild Puerto del Orégano (EOPO) and Alamos (EOA), was fractionated by distillation at different temperatures. The main components of the fractions (F1, F2 and F3) of each oil were to EOPO, F1: cymene (34%), caryophyllene (23%), pinene (7.5%) and thujene (6%), F2: carvacrol (68%), myrcene (14%), eugenol (5%) and linalool (4%) and F3: thymol (50.5%), pinene (10%), methyl eugenol (3%) and iso-caryophyllene (3%). In the EOA were found in F1: carvacrol (32%), caryophyllene (18%), espatulene (13%) and bisabolene (6%), F2: p-cymene (48%), carvacrol (15%), aromandrene (8%) and longipinene epoxide (6.5%) and F3: thymol (67%), myrcene (8%), p-thymol (8%) and terpinen-4ol (3%). For the toxic effect of each fraction on *Zabrotes subfasciatus* be applied dose 4, 8, 15 and 30 ul/g of beans. Watching that the dose of 4 ul/g the behavior of mortality was equal to the dose of 8 ul/g, and similarly the dose of 15 ul/g was equal to the rate of 30 ul/g, so that in this work we only report the results with the dose of 4 and 15 ul/g. Bioassays performed with a dose of 4 ul/g, with F1 AEPO was less toxic than F1 AEA, as the insect mortality was increased from 20, 50, 90 and 100% mortality at the (6, 12, 24 and 48h), and 40, 60 and 100% mortality at the (6, 12 and 24) for F1 AEA. Registering eggs in the beans watching that month there was no emergency because the larvae failed to normal development. Results that were significantly lower $p \leq 0.5$ than the control. The fractions (F2 and F3) of AEPO had higher insecticidal or toxic (100% mortality from 6am), the AEA. With the dose of 15 ul/g of AEA F1 were more toxic than AEPO, while F2 AEPO its toxic effect was greater than that of AEA. The AEA F3 AEPO and mortality presented as highly toxic to *Z. subfasciatus* recorded 100% mortality from the 6h evaluated.

Mortality *Z. subfasciatus* can be attributed to the most abundant components of each fraction in F1 and F2 were p-cymene and carvacrol, while for F3 was thymol.

Keywords: essential oil fractionated, Oregano *Lippia palmeri*, insecticidal, *Zabrotes subfasciatus*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el interés de conocer y usar algunos compuestos orgánicos biológicamente activos que poseen ciertas plantas como mecanismo de defensa contra insectos y microorganismos patógenos. Estos elementos podrían actuar también contra plagas que hayan desarrollado resistencia a plaguicidas sintéticos (Daferera *et al.*, 2003). Entre los principales metabolitos secundarios que producen las plantas para protegerse contra los insectos dañinos se encuentran los fenoles y terpenos presentes en sus aceites esenciales (Erler, 2005; Cowan, 1999).

Los aceites esenciales (AEs) son mezclas complejas que contienen compuestos volátiles aromáticos, como los monoterpenos y sesquiterpenos; generalmente menos densos que el agua que confieren el sabor y aroma característico de la fuente vegetal de donde provienen. Se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son de importancia comercial en el mercado de las fragancias (Van y Leijten, 1999). Algunos aceites esenciales poseen características insecticidas, antioxidantes, antibióticas y antivirales (Burt, 2004; Kordali *et al.*, 2005). En el caso del orégano de los géneros *Origanum* y *Lippia*, sus propiedades antioxidantes se han atribuido a su contenido de compuestos fenólicos, carvacrol y timol, mismos que bajo ciertas condiciones presentan actividad fungicida, bactericida e insecticida (Isman, 2000; Aballa y Rosen, 2001).

Los mecanismos de acción bactericidas e insecticidas de los aceites esenciales varían dependiendo de sus componentes. Por ejemplo, la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos y los terpenos están involucrados en el rompimiento de las membranas celulares, a través de los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). En insectos se ha propuesto que algunos componentes de los aceites esenciales pudieran inhibir a la enzima acetilcolinesterasa, en este caso se interrumpe la transmisión de

señales en el sistema nervioso central y se provoca acumulación de acetilcolina en la unión sináptica y un desequilibrio en la actividad motora que causa asfixia, fallo respiratorio y muerte del insecto (Bisset, 2002; Rocha y García, 2008).

En algunas especies de orégano se ha comprobado el efecto insecticida de sus aceites esenciales. Por ejemplo, los aceites esenciales del *Origanum basilicum* L y del *Origanum gratissimum* L provocaron una elevada mortalidad del gorgojo *Callosobruchus maculatus* F en granos almacenados (Sékou *et al.*, 2001), probablemente debido a su contenido de carvacrol y timol, los componentes más abundantes en ambos aceites. El aceite esencial del *Origanum vulgare* L aplicado sobre dos plagas *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) y *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera) también presentó efecto insecticida atribuido a su contenido de eugenol (Bittner *et al.*, 2008). En el caso del aceite esencial de *L. rugosa* (Thunb) el efecto insecticida sobre *S. zeamai* y *S. oryzae* L se debió probablemente al contenido de compuestos oxigenados (Ngamo *et al.*, 2007). En un estudio reciente se reportó que algunos aceites esenciales son eficaces para el control de bruquidos, ya que reducen la oviposición e inhiben la emergencia de estos insectos, y por consiguiente reducen el daño de las semillas infestadas (Deus *et al*; 2009).

En México se desarrolla la especie de orégano *L. palmeri* Wats, que posee características semejantes al orégano europeo *O. vulgare*. El orégano *L. palmeri* (familia verbenaceae) es una planta aromática que crece en forma silvestre en los estados de Sonora, Baja California Sur y Sinaloa (Shreve y Wiggin, 1964; González *et al*; 2007), sus hojas se aprovechan como condimento y en medicina tradicional (Pascual *et al*; 2001). El volumen de producción de *L. palmeri* permite extraer suficiente aceite esencial, de muy buena calidad, para su exportación a la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Blanco *et al*; 2005; González, 2005). Además, en un estudio reciente se demostró que los

componentes más abundantes del aceite esencial de *L. palmeri* son el carvacrol, timol y cimeno (Ortega *et al*; 2011), que a concentraciones bajas también presenta efecto biocida sobre el gorgojo del frijol *Zabrotes subfaciatus* (Coleoptera: Bruchidae, datos no publicados).

Z. subfaciatus es una plaga importante en el frijol almacenado, cada hembra de esta especie deposita de 35 a 50 huevecillos que eclosionan en 30-35 días (Dendy y Credland, 1991) y en consecuencia, pueden ocasionar pérdidas hasta en el 40% de las semillas (Credland y Dendy, 1992).

Conociendo la complejidad de elementos en los aceites esenciales, este trabajo tuvo como objetivo fraccionar el aceite esencial de *L. palmeri* y analizar los componentes mayoritarios de cada fracción, posteriormente se evaluó el efecto insecticida sobre *Z. subfaciatus* de cada fracción y todo ello para emplearlo como alternativa al uso de insecticidas sintéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las plantas de orégano *L. palmeri*, fueron cosechadas de dos localidades naturales del estado de Sonora (Puerto del Orégano y Álamos Sonora). Puerto del Orégano localizado a 52 km de Hermosillo, Sonora con coordenadas geográficas de 29° 02' 52.5" latitud Norte y 110° 40' 15.8" longitud Oeste (Ortega *et al*; 2008) y una altitud de 380 msm; caracterizado como clima árido, con una temperatura máxima de 48°C y una mínima de 14°C, su precipitación pluvial es de 180mm anual en promedio (INEGI, 2009); y Álamos, Sonora, localizado a 450 km de Hermosillo, Sonora con coordenadas geográficas de latitud Norte de 27° 01' 18" y longitud Oeste a 108 ° 56' 34", y una altitud de 1 700 msm,

temperatura máxima de 30°C y mínima de 16°C caracterizado como clima semi seco cálido, y la precipitación pluvial de 347 mm (Ortega *et al*: 2008; INEGI, 2009). La colecta de las hojas se realizó antes de la floración de la planta en octubre del 2009, planta registrada bajo número 01655 en el herbario de la Universidad de Sonora, donde su taxonomía fue confirmada.

Obtención del aceite esencial de *Lippia palmeri*.

El aceite esencial de *L. palmeri* fue extraído de 100g de hojas, las cuales previamente fueron secadas a temperatura ambiente 27°C a la sombra por dos días. El aceite esencial fue obtenido por arrastre con vapor durante cuatro horas, usando un equipo de vidrio tipo Clevenger (Winzer ®). El aceite esencial se separó de la fase acuosa por decantación y se pasó por sulfato de sodio anhidro para eliminar la poca humedad y posteriormente se guardó en vial ámbar a 4°C para su conservación y uso posterior.

Obtención del aceite esencial fraccionado.

Se depositaron 25 ml de aceite esencial de Puerto del orégano (AEPO) y de Álamos (AEA) en un matraz balón de 75 ml del rotavapor (Büchi Mod 461, Flawil, Switzerland) y se fraccionó por destilación aplicando las temperaturas de 30-40, 40-50 y de 50-60°C. Las condiciones optimizadas de trabajo fueron, de 150 a 200°C en baño de aceite y a 2 mm de Hg de presión. De esta forma, se reunieron todas las fracciones volátiles que destilan entre 30°C y 75°C (Tomova *et al*; 2005), repitiendo 3 veces esta operación. Cada fracción obtenida se analizó por CG-EM para identificar sus componentes.

Análisis CG-EM de las fracciones del aceites esencial de *Lippia palmeri*

Cada una de las fracciones obtenidas se analizó por CG/EM, para conocer sus componentes. El equipo utilizado fue un CG-EM Varían 3900 Saturno acoplado a detector

de masas Varían Saturno 2100T. Una columna capilar: DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), la temperatura del inyector fue 250°C, con modo de inyección con Split relación 1:50; el volumen de inyección fue 1 μ l/min de muestra diluida 1:10 en metanol, helio ultra puro grado 5.0 como gas acarreador a flujo de 1ml/min, usando un programa de temperatura de 50°C por 10 min, 50°C a 290°C (5°C/min) y mantenida a 290°C por 10min. Con una fuente de ionización electrónica (EI) a 70 y la temperatura de transferencia de 250°C. El monitoreo de ión total fue a intervalo de masas de 40-400 m/z (D'antuono *et al*; 2001). La identificación de los componentes se realizó por tiempos de retención y mediante la comparación de espectros de masas de la biblioteca de NIST.

Material biológico.

Para obtener la cantidad de insectos necesarios y conocer su edad al momento de utilizarlos se realizó la cría del gorgojo *Z. subfasciatus*, siguiendo la técnica (USDA, 1969). En frascos de vidrio de 2 litros, se depósito 1 Kg del frijol y se introdujeron 150 ejemplares de *Z. subfasciatus* (75 hembras y 75 machos). *Z. subfasciatus* y frijol se mantuvieron en una incubadora Shell lab® modelo R128, en condiciones de 27°C, 70% H.R y fotoperíodo de 12:12h luz: oscuridad. Donde cada 30-35 días se obtienen insectos jóvenes para utilizarlos en los bioensayos correspondientes.

Bioensayos con las fracciones del aceite esencial de ambas localidades.

En frascos de 50 ml, se depositaron 10 gorgojos de *Z. subfasciatus* (5 hembras y 5 machos), de cinco días de emergidos y en papel filtro circular de 24 mm cada una de las fracciones fueron adicionadas, en las dosis 0; 4; 8; 15 y 30 μ l/g de frijol de cada fracción. La mortalidad y número de huevecillos se registró a las 6, 12, 24, 48 y 72 h y también al mes de cada bioensayo el número de emergencia y grano dañado. Cada bioensayo fue

realizado por triplicado siguiendo el método de Guigon *et al.* 2005; Papachristo, *et al.* 2004 modificado.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial (2 x 5 x 6), donde el Factor A fueron procedencia del aceite (AEPO y AEA); con cinco niveles: [0 (control); 4; 8; 15 y 30 µl/g de cada fracción]; el factor B fue representado por los 6 niveles de las fracciones (F1, F2 y F3 de AEPO y F1, F2 y F3 de AEA), con tres repeticiones por tratamiento. Las variables de respuesta fueron: La mortalidad expresada en porcentaje y número de huevecillos.

Análisis estadístico.

Se utilizó el análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ y para la comparación de medias la prueba de Tukey's $\alpha= 0.05$, usando el paquete computacional JMP Ver 5.0.1 SAS Institute (2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimientos y composición de las fracciones (1, 2 y 3) de AEPO y AEA.

Se obtuvo un total de seis fracciones (tres en AEPO y tres en AEA). Los rendimientos fueron similares en las fracciones de ambos aceites esenciales (Tabla 1). Las fracciones 1 y 3 en ambos aceites esenciales fueron de color amarillo, mientras que las fracciones 2 presentaron un color blanco transparente.

Tabla 1. Rendimiento de las fracciones de AEPO y AEA.

Fracciones	Temperatura °C	Volumen (ml)	Rendimiento (%)
AEPO			
F1	30-40 ⁰ C	10	40
F2	40-50 ⁰ C	9.5	38
F3	50-60 ⁰ C	5.4	21.6
AEA			
F1	30-40 ⁰ C	9.5	38
F2	40-50 ⁰ C	9.6	38.4
F3	50-60 ⁰ C	5.3	21.2

AEPO: Aceite esencial de Puerto de Orégano; AEA: Aceite esencial de álamos, Sonora

La fracción F1 AEPO contiene 16 compuestos, mientras que en la F1 AEA se identificaron catorce componentes (Tabla 2), la F1 AEPO el componente más abundante fue p-cimeno (34.64%), seguido de cariofileno (23.44%). Mientras que F1 AEA, registró carvacrol (32.67%), m-cimeno (20%) como los componentes más abundantes. También se presentaron en concentraciones más bajas al β -pineno, α -tujeno, mirceno, terpinoleno, cariofileno, carvacrol y o-cimeno compuestos que están presentes en ambos aceites de la fracción 1 (Tabla 2). Para F1 AEPO su quimiotipo fue p-cimeno/cariofileno y los quimiotipos para F1 AEA fueron carvacrol/cimeno.

Tabla 2. Componentes de las Fracción 1 en ambos aceites esenciales *L. palmeri*.

tr	Componentes	%	tr	Componentes	%
	AEPO			AEA	
4.39	Prenal	0.54	10.61	β -Pineno	1.62
10.54	β -Pineno	1.80	11.06	α -Tujeno	0.49
11.00	α -Tujeno	5.60	13.78	o-Cimeno	0.82
11.43	α -Pineno	7.45	14.88	Mirceno	0.95
12.13	Origaneno	1.87	16.08	Terpinoleno	0.53
12.44	Camfeno	2.36	22.25	Borneol	0.49
14.84	Mirceno	0.15	26.83	Carvacrol*	32.67
15.56	α -Terpineno	2.59	29.52	Cariofileno	0.42
16.07	Terpinoleno	5.00	33.72	Cariofilen oxido	18.12
16.53	p-Cimeno*	34.64	34.25	Espatuleno	12.92
22.51	Terpineno-4ol	3.85	34.46	1-Nonen-3 ol	2.99
25.76	Carvacrol	0.13	34.62	α -Bisaboleno	4.59
29.49	Cariofileno*	23.44	40.93	Durenol	2.89
29.95	Aromandreno	1.92	42.75	m-Cimeno*	20.00
32.42	Aloaromandreno	1.34			
35.72	Isoaromandreno	1.87			

tr: tiempo de retención; *mas abundantes; AEPO: aceite esencial del Puerto del orégano; AEA: aceite esencial de Álamos Sonora.

La fracción F2 AEPO presentó, once componentes y los más abundantes fueron el carvacrol (67.57%), seguido por mirceno (14.00%) y eugenol (5.68%). Mientras que la fracción F2 AEA, registró nueve componentes al p-cimeno (48.14%), aromandreno (30.

00%) y carvacrol (8.13%). El carvacrol/mirceno fue el quimiotipo para F2 AEPO y en F2 AEA es p-cimeno/aromandreno (Tabla 3). Se identificaron un total de catorce componentes en F3 AEPO, registrando como componentes más abundantes al timol (50.52%), seguido de α -pineno (9.91%) y p-cimeno (8.54%). También para F3 AEA fue el timol (67.23%) el más abundante seguido de β -mirceno (7.92%) y de p-timol (7.65%). El quimiotipo fue timol en ambas fracciones de F3 (Tabla 3).

La condición óptima de destilación al obtener cada una de las fracciones de AEPO y AEA, fue la adecuada ya que de esta forma se obtuvieron todas las fracciones que destilan entre 30 y 45°C obteniendo los monoterpenos hidrocarburos mayoritariamente. Después, se reúnen las fracciones que destilan entre 45 y 60°C, donde se obtuvieron principalmente monoterpenos oxigenados. Por último se recogió los que destila entre 60 y 85°C correspondientes a los sesquiterpenos; y lo que queda sin destilar constituyó la fracción de las partes más pesadas (menos volátiles) del aceite y otras impurezas inorgánicas.

Tabla 3. Componentes de las Fracciones 2 y 3 de AEPO y AEA de *L. palmeri*.

tr	F2 AEPO	%	tr	F2 AEA	%	tr	F3 AEPO	%	tr	F3 AEA	%
5.9	Borneol	2.28	10.60	β -Pinenol	1.70	11.49	α -Pinenol	7.7	11.10	α -Pinenol	1.5
13.	3-Careno	0.58	16.54	p-Cimeno*	48.1	13.72	o-Cimeno	8.5	13.89	3-Careno	0.7
14.	3-Octanol	0.58	21.42	2-Pinenol 4	0.50	14.08	β -Felandreno	1.4	14.88	Mirceno*	7.9
14.	Mirceno*	14.0	25.7	Carvacrol	1.14	16.18	β -Cimeno	1.6	15.51	Felandreno	1.0
15.	α -Felandreno	1.70	29.49	Cariofileno	0.10	16.54	p-Cimeno	1.6	19.64	Linalool	0.3
16.	Limoneno	2.24	29.74	Bergamoteno	1.05	19.74	Linalool	1.7	22.09	3-Tujeno	0.6
19.	Linalol	3.93	31.70	β -Bisaboleno	3.66	22.79	p-Cimeno-8-ol	1.3	22.48	Terminen	3.3
22.	Terpineno-	0.09	35.76	Isoaromandr	30	26.37	Timol*	50	24.04	Timol metil	2.7
26.	Carvacrol*	67.6	39.7	Longipinenol	6.07	26.53	p-Timol	9.9	26.37	Timol*	67.
27.	Eugenol*	5.72				27.76	Eugenol	1.9	26.45	p-Timol	7.6
31.	β -Bisabolene	1.33				28.98	Metil eugenol	3.1	29.98	Aromandren	4.9
						29.80	Bergamoteno	0.4			
						30.42	α -Cariofileno	6.5			
						35.75	Isocariofileno	2.9			
						43.10	Limoneno-6-ol	1.9			

Tr: tiempo de retención; F2 y F3 AEPO: fracción 2 y 3 de aceite esencial de Puerto del Orégano; ; F2 y F3 AEA: fracción 2 y 3

de aceite esencial de Álamos; *: componentes mas abundantes.

Mortalidad originada por las fracciones de AEPO y AEA sobre *Z. subfasciatus*.

Los bioensayos con las dosis de 4, 8, 15 y 30 $\mu\text{l/g}$ de cada fracción sobre *Z. subfasciatus*, demostraron que la dosis de 4 $\mu\text{l/g}$ presentó los mismos resultados de mortalidad que la dosis de 8 $\mu\text{l/g}$, y con la dosis de 15 $\mu\text{l/g}$ el comportamiento fue igual a la de 30 $\mu\text{l/g}$. Por lo que en este trabajo se presentan solo los resultados de los bioensayos con la dosis de 4 y de 15 $\mu\text{l/g}$.

Con la dosis de 4 $\mu\text{l/g}$ de cada fracción, F1 AEPO presentó una mortalidad del 20% a las 6h de haber introducido los insectos, incrementando a 50% a las 12h y a 100% de mortalidad de *Z. subfasciatus* a las 48h (Figura 1). Las fracciones 2 desde las 6h registraron el 100% de mortalidad y la F3 que a las 6h presentó el 80% de mortalidad y a las 12 h presentó el 100%. La mortalidad obtenida fue significativamente mayor que la registrada por el control la cual fue de 0-10% de 6-72h. Los bioensayos con la dosis de 4 $\mu\text{l/g}$ de las fracciones F1, 2 y 3 de AEA presentaron el 100% de mortalidad del zabrotes a partir de las 24h.

Las fracciones F2 y F3 de AEPO presentaron mayor toxicidad que la F2 y F3 AEA, con AEPO F2 y F3 presentaron el 100% de mortalidad a las 6 h mientras la F2 AEA a las 6 y 12h arrojó el 20 y 60% de mortalidad respectivamente.

Las fracciones F2, F3 de AEPO y la F3 AEA con la dosis 4 $\mu\text{l/g}$ no registraron presencia de huevecillos; mientras que la F1 AEPO a las 24h se observaron 12 huevecillos, a las 48 h se observaron solamente 2 huevecillos más (Tabla 4), significativamente menos que en el control ($p < 0.05$). Mientras que las fracciones F1 y F2 AEA, presentaron 10 y 14 huevecillos a las 24 h respectivamente; a las 48h la oviposición fue menor, 5 huevecillos. A pesar de la presencia de huevecillos sobre el frijol al primer

mes, estas larvas no lograron su desarrollo, por lo que se considera que con la dosis de 4 $\mu\text{l/g}$ es la minima que se puede usar para controlar a esta plaga.

Tabla 4. Número de huevecillos y emergencia de *Z. subfasciatus* con la dosis 4 $\mu\text{l/g}$ de cada fracción.

Fracciones	Huevecillos	Huevecillos	Emergencia
	24 h	48 h	(30 días)
AEPO			
F1	12 _d ± 0.27	2a ± 0.005	0a ± 0.00
F2	0a ± 0.00	0a ± 0.00	0a ± 0.00
F3	0a ± 0.00	0a ± 0.00	0a ± 0.00
C	39g ± 0.58	92k ± 2.01	75i ± 0.70
AEA			
F1	10c ± 0.18	5b ± 0.12	0a ± 0.00
F2	14e ± 0.31	5b ± 0.12	0a ± 0.00
F3	0a ± 0.00	0a ± 0.00	0a ± 0.00
C	31f ± 0.49	87j ± 1.34	70h ± 0.65

Letras iguales: No hay diferencias significativas a una ($p > 0.05$); F1, F2, F3 AEPO: Fracciones del aceite esencial del Puerto del Orégano; Fracciones del aceite esencial de Álamos, Sonora: F1, F2, F3 AEA. CAEPO y CAEA: Controles.

Los bioensayos efectuados con la dosis de 15 $\mu\text{l/g}$ de cada fracción de (AEPO y AEA), presentaron un incremento significativo en el porcentaje de la mortalidad de *Z. subfasciatus* (100% de mortalidad) con excepción F1 AEPO a las 6 y 12 h (50% de mortalidad) y F2 a las 6 y 12 h con 42 y 58% de mortalidad respectivamente (Figura 2), se

inhibió totalmente la oviposición ya que no hubo presencia de huevecillos para ninguna de las fracciones aplicadas y por lo tanto no hubo emergencia. En general, al incrementar la dosis de cada fracción con 15 µl, se obtuvo mayor efecto tóxico sobre *Z. subfasciatus*.

La mortalidad producida en *Z. subfasciatus*, al aplicar la dosis de 4 y 15 µl/g de F1 AEPO, puede atribuirse a la presencia de cimeno componente mayoritario en el aceite de esta fracción. En la F1 AEA la mortalidad de *Z. subfasciatus*, puede ser al carvacrol, componente mayoritario en esta fracción. Las fracciones F2 y F3 de AEPO presentaron mayor efecto tóxico sobre *Z. subfasciatus*, probablemente por altas concentraciones de carvacrol y timol en el aceite. Mientras que el efecto tóxico de F2 y F3 de AEA pudo deberse al cimeno y timol.

En el estudio realizado por Tomova *et al*; 2005, donde se evaluó la actividad fumigante del aceite esencial del anís (*Targete minuta*), sobre la reproducción de los pulgones *Acyrtosiphon pisum*, *Aulacorthum solani* y *Myzus persicae*, encontraron que las fracciones obtenidas a menor temperatura (fracción 1: 30-40°C) presentaron menor mortalidad, y las de mayor temperatura correspondientes (fracciones 2: 40-50°C y 3: 50-60°C) registraron mayor mortalidad. Los autores atribuyen el efecto tóxico de las fracciones 2 y 3 al carvacrol, timol y cariofileno componentes más abundantes en el aceite esencial del anís y efectivo para disminuir la población en los pulgones *Myzus persicae*. El comportamiento del presente estudio fue muy similar ya que la F1 AEPO y AEA fueron obtenidas a menor temperatura (30-40°C), y también presentaron menor mortalidad que las de fracciones F2 y F3 de ambos.

Guigón *et al*; 2005, realizó un bioensayo sobre *Acanthoscelis obtectus* (gorgojo del frijol) utilizando el aceite esencial de *L. graveolens* en fracciones del aceite con diferentes concentraciones de carvacrol y timol. Fracciones que se aplicaron en papel filtro en

dosis de 1.5 µl/g, registraron en F1 a las 16h, el 85% de mortalidad, y alcanzó el 100% a las 48h, mientras F2 presentó 100% a las 48h y F3 a las 16h registró el 100% de mortalidad de *A. obtectus*. Esos autores tampoco obtuvieron huevecillos con las fracciones analizadas. Resultados comparables con el presente estudio y tomando como referencia que en el aceite esencial de *L. graveolens* su componente mayoritario es timol, las F2 y F3 de AEPO y AEA registraron el 100% de mortalidad desde las 6 h.

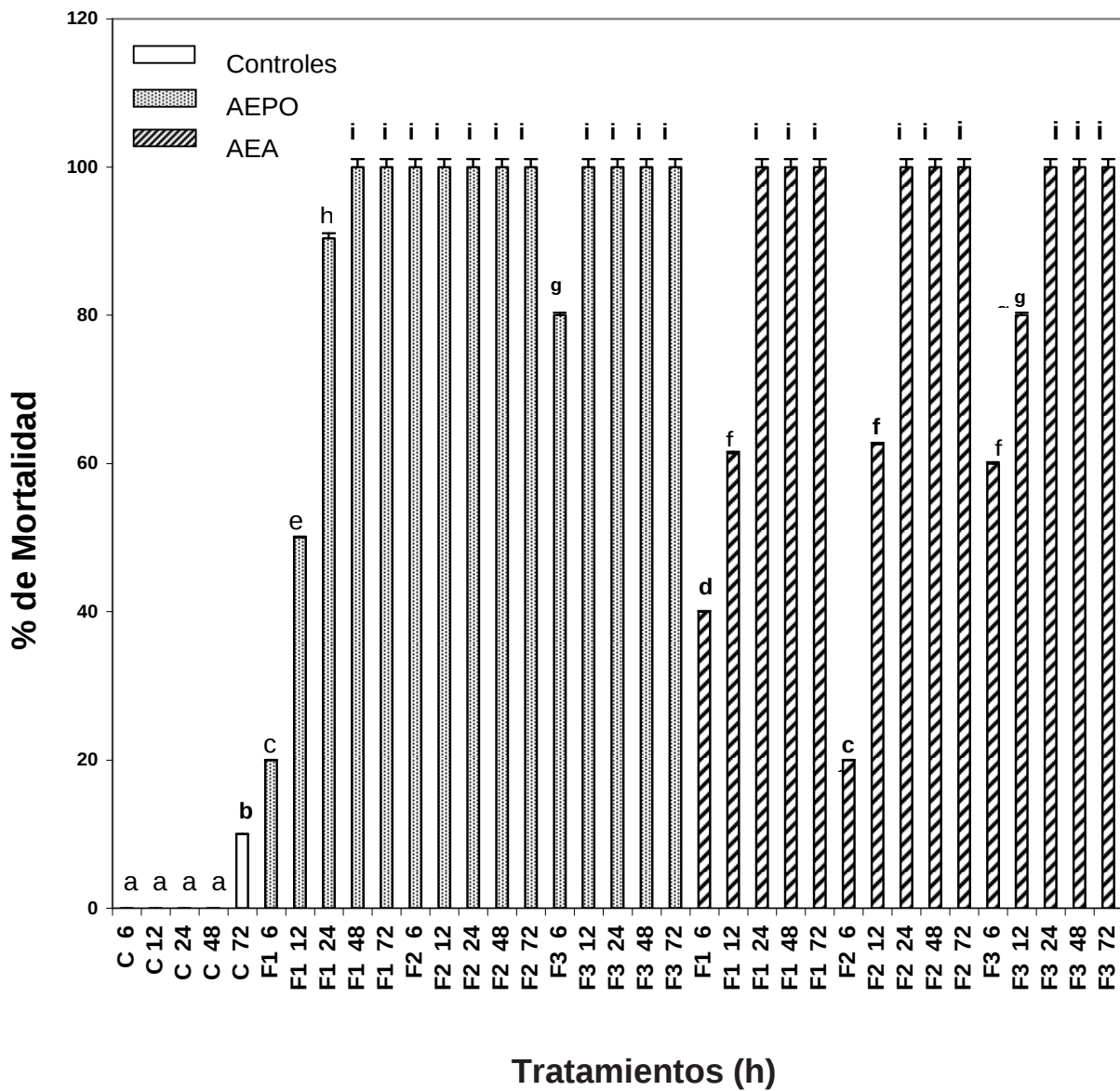
Al respecto Regnault y Hamraoui (1995) señalan que los monoterpenos como timol y carvacrol, exhiben toxicidad fumigante contra *A. obtectus*, en el caso del presente estudio pudiera atribuirse a los mismos elementos la mortalidad de *Z. subfasciatus*.

En tres fracciones del aceite esencial del orégano *O. glandulosum*, que fueron obtenidas por destilación con tolueno obtenidas a 0-2.5 F1, 2.5-5 F2 y F3 5-10 min, y las temperaturas de obtención de F1, F2 y F3 de 20-35, 35-45 y 45-65°C, respectivamente que se utilizaron en dosis de 5 ml sobre gorgo del trigo *Rhyzopertha dominica*. F1 presentó 60% mortalidad, F2 el 100% y la F3 56% a las 2h, del comienzo del bioensayo (Ouassila *et al*; 2008), la mortalidad de *R. dominica* es causada por los monoterpenos oxigenados como el carvacrol y timol que son los más abundantes en cada fracción. F2 contiene timol en más alta la concentración y la de mayor mortalidad, resultado similar se obtuvo con F3 de AEPO y AEA sobre *Z. subfasciatus*.

CONCLUSIONES

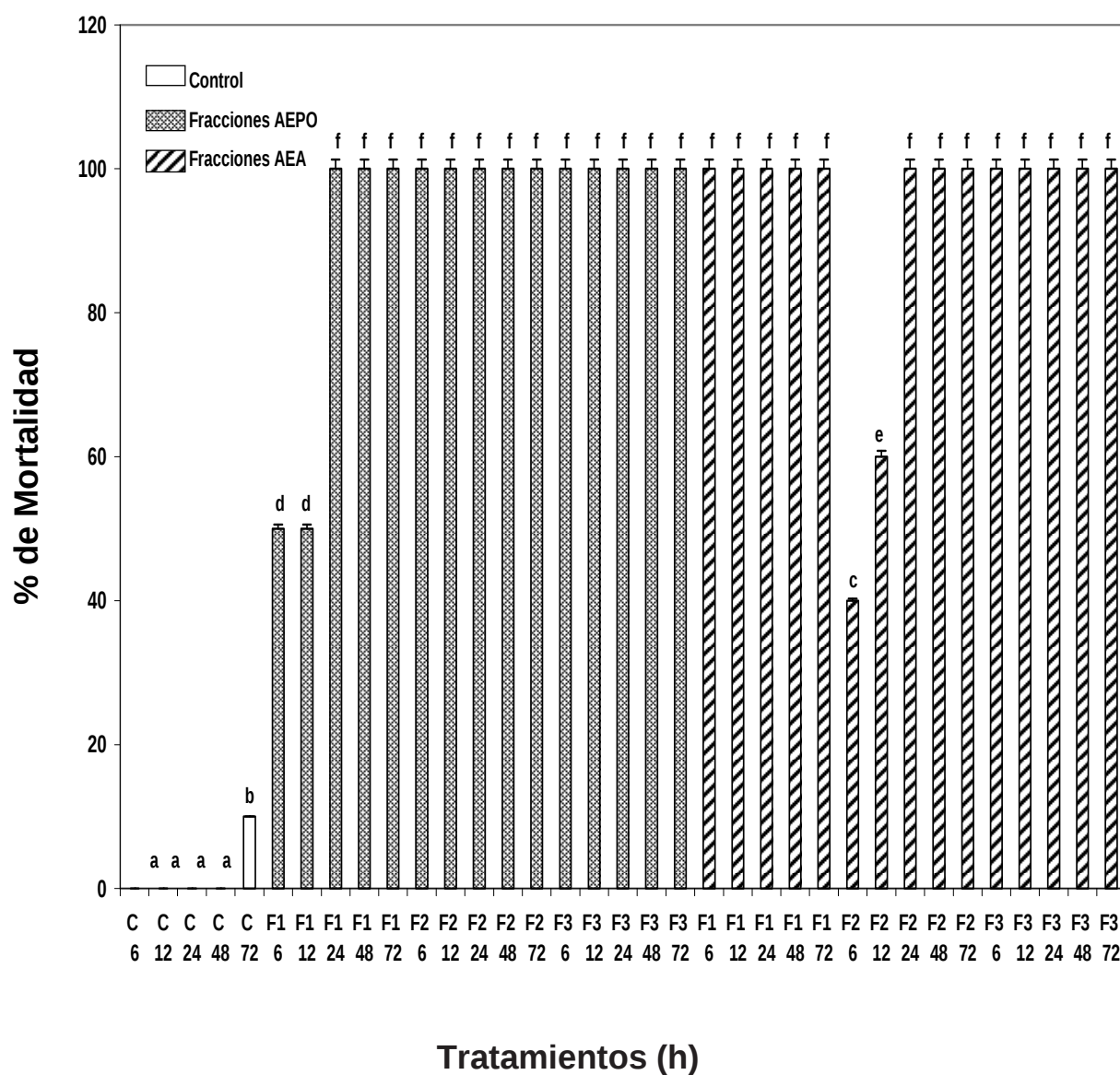
La fraccionación de AEPO y AEA permitió separar sus componentes con rendimientos adecuados. En las tres fracciones de AEPO el rendimiento total fue de 99.6% observando que los componentes mayoritarios y posibles causantes del efecto tóxico sobre *Z. subfasciatus* para ambas dosis evaluadas fueron los monoterpenos oxigenados (cimeno, carvacrol y timol). El rendimiento de las tres fracciones de AEA fue de 97.6% y con los mismos componentes causantes de la mortalidad de *Z. subfasciatus*. Todas las fracciones produjeron un efecto tóxico agudo sobre el insecto *Z. subfasciatus*.

Figura 1. Porcentaje de mortalidad sobre *Z. subfasciatus* aplicando 4 µl/g del aceite esencial proveniente de cada fracción.



C, F1, F2, F3 de AEPO y AEA evaluados (6, 12, 24, 48 y 72h); Letras iguales: no hay diferencias significativas a una ($p>0.05$).

Figura 2. Porcentaje de mortalidad sobre *Z. subfasciatus* aplicando 15 μ l/g de frijol del aceite esencial proveniente de cada fracción.



C, F1, F2, F3 de AEPO y AEA evaluados (6, 12, 24, 48 y 72h); Letras iguales: no hay diferencias significativas a una ($p > 0.05$).

BIBLIOGRAFIA

- Aballa A A, M Diatewa, G Gakosso, M Gbeasson, Th Hondi-Assah, J M Ouamba (2001) Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. Fitoterapia 74:231-236.
- Ashraful Alam, M. Rowshanul Habib, Farjana Nikkon, M Khalequzzaman and M. Rezaul Karim. 2009. Insecticidal Activity of Root Bark of *Calotropis gigantea* L. Against *Tribolium castaneum* (Herbst). World Journal of Zoology 4 (2): 90-95.
- Aliyiannis N, E Kalpoutzakis, S Mitaku, IB Chinou (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:4168-4170.
- Bassole H N, A S Ouattara, R Nebie, C A T Ouattara, Z I Kabore, S A Traore (2003) Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. Phytochemistry 62:209-212.
- Blanco Navarrete J. L., Luengas Jiménez B.C. y Bautista Barrón B. E. 2005. Enrizamiento estacional de semillas de orégano. Reunión Nacional de investigación en Recursos Biológicos de Zonas Áridas. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma de Chapingo. Vol. 4, Núm. 2: 25-30.
- Bisset J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Rev Cubana Med Trop: 54 (3) 202-219.
- Bittner M, Casanueva M, Arbert C, Aguilera M, Hernández V, Becerra J. 2008. Effects of essential oil from five plant species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). J. Chil. Chem. Soc. 53:1455-1459.
- Clemente, S., Mareggiani, G., Broussalis, A., Martino, V. and Ferraro, G. 2003. Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products. Bol. San.Veg. Plagas, 29:421-426.
- Dendy, J., and Credlin, P.F. 1992. Development fecundity and eggs dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. Entomol, exp. Appl. 59:9-17.
- Deus, M. K. Mushobozy¹, Gerod. Nganilevanu, Sosthenus Ruheza, George B. Swella 2009. Plant oils as common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed protectants against infestations by the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (boh.) journal of plant protection research, vol 9 (1):35-41.

- D'antuono L F, G C Galleti, P Bocchini. 2001. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). *Annals of Botany* 86:471-478.
- U.S.D.A. 1969. Rearing manual of stored product insects research and development laboratory, Sanannah, GA. U.S.A.
- Erler, F. and W. Tunç. 2005. Monoterpenoide als Begasungsmittel gegen Gewächshausschädlinge: Toxizität, Wirkung auf Entwicklung und Reproduktion. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 112 (2), 181–192.
- Guigón L. C., Silva, R. y González P. 2005. Actividad Insecticida de Cuatro Fracciones del Aceite de Orégano sobre *A. obtectus*. Memorias de la segunda reunión Nacional sobre orégano 25-26 feb, en Salaices Chihuahua.
- González-Güereca M C, M Soto-Hernández, G Kite, M Martínez-Vázquez (2007) Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the mexican oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*; 30: 43-49.
- Guigón L. C., Silva, R. y González P. 2005. Actividad Insecticida de Cuatro Fracciones del Aceite de Orégano sobre *A. obtectus*. Memorias del la segunda reunión Nacional sobre orégano 25-26 feb, en Salaices Chihuahua pag 213-219.
- González Güereca M.C., Hernández, H.K y Martínez Vázquez, M. 2007. Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 30 (1): 43–49.
- Isman MB (2000) Plant essential oils for pests and disease management. *Crop Protection* 19: 603–608.
- INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2009) Anuario Estadístico de Sonora 2009. 1: 12-13
- Ngamo TSL, Ngatanko I, Ngassoum MB, Mapongmestsem PM, Hance T. 2007. Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. *African Journal of Agricultural Research*. 2:173-177.

- Ouassila K, Naima S, Fatiha B and Chahrazed, B. 2008. Chemical composition and insecticidal properties of *Origanum glandulosum* (desf) essential oil from Algeria. J. Sci. Food Agric 88:1562-1566.
- Ortega-Nieblas M.M, McCaughey-Espinoza D, Robles-Burgueño MR, Serna- Félix M. 2008. Estimación de materia vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Wats) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del Estado de Sonora. Memorias del 5to Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas áridas; 234-249
- Ortega-Nieblas MM, Robles-Burgueño MR, Vázquez-Moreno L, Acedo-Félix E, González-León A, Morales-Trejo A. 2011. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Oregano *Lippia palmeri* Wats from Two Localities in the State of Sonora. Aceptado en Revista Fitotecnia Mexicana, vol 34, 2010.
- Papachristos, D. P. and Stamopoulos, D. C. 2004. Fumigant, Toxicity of there essential oils on the eggs of *Acanthosceñides obtectus* (Say) (Coleoptera:Bruchidea) Journal of stored products research 4:517-525,
- Pascual ME, K Slowing, E Carretero, D Sánchez Mata, A Villar (2001) *Lippia*:traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology 76:201-214.
- Regnault-Roger, C. Hamurai, B.J.R. y Vincent, C. 1995. *Biopesticidas de origen vegetal*. 1era Edición en español. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España.
- Sanon, A., Gauthier, M., Auger, J. and Huigbard, J. 2002. Analysis insecticidal activity of methylisothiocyanate on *Callosobruchud maculates* and its parasitoid *Dinarmus basalis*. J. Stored Product Res, 38:129-138.
- Shreve F, I L Wiggin (1964) Vegetation and flora of the Sonoran Desert, Vol. 2. Stanford University Press 1255.
- Sékou-Moussa K, Jean-Pierre S, John-Thor A, Bélanger A. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab). (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research. 37:339–349.

Tomova, Blagovesta S.; John S. Waterhouse and Julian, Doberski. 2005. The effect of fractionated *Tagetes* oil volatiles on aphid reproduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 115 : 153–159, 2005.

CONCLUSIONES GENERALES

El orégano *L. palmeri* es una planta endémica del desierto Sonorense, aromática y con capacidad de desarrollarse en ambiente árido y semiárido. Las plantas durante su desarrollo resisten a la sequia (estrés hídrico), a altas temperaturas y suelos salinos. Por su olor característico presentan resistencia a enfermedades y plagas en su hábitat a comparación de plantas cultivadas. Los períodos de producción en esta planta silvestre son más largos, crecen menos y la concentración de sus componentes suelen ser mayor.

La extracción de los AEs, por destilación con arrastre con vapor, permitió obtener en el aceite una gran proporción de compuestos hidrocarbonados (monoterpenos) y oxigenados (carvacrol, timol, cimeno, entre otros). Este procedimiento es sencillo, económico y reproducible.

Los componentes AEPO y AEA tienen estructuras químicas similares a otras Lippias y Origanum que han registrado actividad antimicrobiana e insecticida. La composición del aceite esencial de *L. palmeri*, varió con la región de la recolección de las plantas, por lo que AEPO presentó un quimio tipo carvacrol/timol y para AEA fue p-cimeno/timol.

La actividad antimicrobiana de ambos AEs varió con respecto al origen de la planta. Sin embargo, ambos AEs mostraron actividad contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*.

Este es el primer reporte de la caracterización química del aceite esencial de *L. palmeri* y nuestros resultados apoyan el concepto de que pueden ser utilizados para saborizar y preservar alimentos.

Los aceites AEPO y AEA fueron altamente tóxicos para *Z. subfasciatus* en las dosis probadas (con excepción de la de 0.135 µl/g). En cuanto a la residualidad del AE la dosis mínima efectiva fue de 1.35 µl/g con una mortalidad de 100%, y 0% de huevecillos desde las primeras 6 horas de tratamiento. En el aceite esencial residual de las dosis de 1.35, 4 y 8 µl/g tuvieron un efecto larvicida (muriendo las larvas en el tercer estadio).

Las fracciones de ambos AEs tuvieron mayor efecto tóxico que los AEs sin fraccionar, siendo las F2 y F3 las más efectivas contra *Z. subfasciatus*. Ambos aceites esenciales resultaron eficaces para el control de *Zabrotes subfasciatus*, ya que reducen la oviposición e inhiben la emergencia de estos insectos, y por consiguiente reducen el daño de las semillas del frijol infestado.

El aceite esencial del orégano *L. palmeri*, es una nueva alternativa para el control de bacterias y de insectos, especialmente sobre *Z. subfasciatus*.

Como alternativa al uso de agroquímicos la aplicación de AEs de *L. palmeri* en frijol almacenado ofrecería seguridad al consumidor, a los trabajadores de los almacenes y al ambiente.

PERSPECTIVAS

Se considera que el aceite esencial de *L. palmeri* puede presentar otras actividades biológicas como antifúngicas, antiacaricida, antimicrobiano, entre otras, las cuales requieren de ser probadas. Otros investigadores utilizaron aceites esenciales de otras especies de orégano que presentan estas propiedades, los aceites reportados contienen componentes similares al aceite del presente estudio.

Se sugiere implementar el cultivo de *L. palmeri*, ya que actualmente, la mayor explotación comercial del orégano en Sonora se realiza a través de la venta directa de la hoja, la cual se emplea principalmente para la preparación de alimentos, y en la medicina contemporánea, con un margen reducido de ganancias y con alto impacto ambiental. No hay datos reportados acerca de la producción por hectárea de *L. palmeri*, tampoco sobre su cobertura y densidad de biomasa que demuestren la sustentabilidad de este recurso, ni mucho menos la capacidad productora de aceites esenciales, lo que le daría un potencial valor agregado. Existe el interés en la domesticación de este cultivo por algunos agricultores y de darle valor agregado mediante la producción de aceites esenciales ya que estos se cotizan en altos precios en el mercado internacional. También mediante aplicación de nutrientes en el suelo se puede lograr mayor concentración de carvacrol y timol.

Es importante, además conocer si *Z. subfasciatus* desarrolla resistencia al aceite esencial, ya que la mayoría de los plaguicidas utilizados para control de plagas son aplicados cada mes en los cultivos y almacenes, con el tiempo el insecto se vuelve resistente al plaguicida aplicado para su control. Considerando que el *Z. subfasciatus* se reproduce de 8 a 11 generaciones por año, sería necesario conocer hasta que generación se vuelve resistente a la dosis empleada del aceite esencial.

BIBLIOGRAFÍA

- Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M. G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J. V. and Nevárez-Moorillón, G.V. 2010. Extracts of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with Antioxidant and Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol.* 3:434–440.
- Aligiannis N; Kalpoutzakis E; Mitaku S; Chinou IB. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem.* 49:4168-4170.
- Arcila-Lozano, C. C., Lorca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., y González de Mejía, E. 2004. El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 100–111.
- Argueta, V. A., Cano, L. M. A. y Rodarte, M. E. 1994. Atlas: Las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. 1ª. Edición: V: II y III: 1073-1077.
- Bassole H.N, Ouattara A.S, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore SA. Chemical 2003. Composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochem.* 62:209-212.
- Benyoussef, E.-H.; Hasni, S.; Belabbes, R.; Bessiere, J.-M. 2002 Modelization and transfer of material on extraction of essential oil on fruits de coriandre. *Chem.Eng. J.* 85, 1-5.
- Bittner M, Casanueva M, Arbert C, Aguilera M, Hernández V, Becerra J. 2008. Effects of essential oil from five plant species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53:1455-1459.
- Bahl, J.R., Sinha, S., Naqvi, A.A., Bansal, R.P., Gupta, A.K. & Kumar, S. 2002. Linalool-rich essential oil quality variants obtained from irradiated stem nodes in *Lippia alba*", *Flavour Fragr. J.* 17: 127-132.
- Blanco Navarrete J. L., Luengas Jiménez B.C. y Bautista Barrón B. E. 2005. Enrizamiento estacional de semillas de orégano. Reunión Nacional de investigación en Recursos Biológicos de Zonas Áridas. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma de Chapingo. Vol. 4, Núm. 2: 25-30.
- Botelho MA, N A P Nogueira, G M Bastos, S G C Fonseca, T L G Lemos, F J A Matos, D Montenegro, J Heukelbach, V S Rao, G A C Brito. 2007. Antimicrobial activity of the

- essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40:349-356
- Bisset J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Rev Cubana Med Trop: 54 (3) 202-219.
- Camilo, D. D., Luz A. M., Jairo, R. M. and Stashenko, E. 2007. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *lippia alba* provenientes de diferentes regiones de colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. Scientia et Técnica, (3): 435-438.
- Craveiro A. A., J. W. Alencar, F.J.A. Matos, C.H.S. Andrade and M.I.L. Machado. 1981. Essentials oils from Brazilian *Verbenaceae* genus *Lippia*. Journal of Natural Products. 44, No 5, 598-601.
- CEFP. 2004. Centro de estudios de las finanzas publicas. Boletín de información económica.
- Chatonnet F, Boudinot E, Chatonnet A, Taysse L, Daulon S, Champagnat J & Foutz AS. 2003. Respiratory survival mechanisms in acetylcholinesterase knockout mouse. European Journal of Neuroscience 18: 1419-1427.
- Credland, P. F., and Dendy, J. 1992. Comparison of seed consumption and the practical use of insect weight in determining effects of host seed on the mexican bean weevil, *zabrotes subfasciatus* (boh.). J. stored Prod. Res. Vol. 28, No. 4, pp. 225-234.
- Clemente, S., Mareggiani, G., Broussalis, A., Martino, V. and Ferraro, G. 2003. Insecticidal effects of *Lamiaceae* species against stored products. Bol. San.Veg. Plagas, 29:421-426.
- D'antuono L F, G C Galleti, P Bocchini. 2000. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. Populations from a North mediterranean area (Liguria region, Northern Italy). Annals of Botany 86:471-478
- Dobie, P., Haines, C.P. Hodges, R.J. y Prevett, P. F. 1984. Insect and Aracnids of Tropical Stored Products. Their Biology and Identification Storage Departament Tropical and Research Institute. London, Roand. Pp. 26-39
- Evans, M. E. K., E. S. Menges, and D. R. Gordon. 2003. Reproductive biology of three sympatric endangered plants endemic to Florida scrub. Biol. Conservation. 111: 235-246.

- Elgayyar M; Draughon F; Golden DA; Mount JR. 2001. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *J Food Protect.* 64 (7):1019-1024.
- Fassear M.K., K.C. Mountzouris, P.A. Tarantilis, M. Polissiou, G. Zervas. 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry.* 106, 1188-1194.
- Chouliar E., A. Karatapanis, I.N. Savvaids, M. G. Kontominas. 2007. Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packing on shelf-life extension of fresh chicken breast meat stored at 4 °C. *Food Microbiology.* 24, 607-617.
- García AR, Leyva MA, Martínez JR, Stashenko EE. 1973. Determinación de la composición química y actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Piper auritum* Kunth (*Piperaceae*) difundida en la costa colombiana. *Scientia et Técnica.* XIII(033): 439-442.
- González Güereca M.C., Hernández, H.K y Martínez Vázquez, M. 2007. Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *berlandieri* Schauer). *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 30 (1): 43–49.
- González-Guereca, M. C. 2001. El orégano como alternativa económica en el estado de Durango. *Interciencia Año IV Vol 1 No. 1*, p 33.
- Guigón L. C., Silva, R. y González P. 2005. Actividad Insecticida de Cuatro Fracciones del Aceite de Orégano sobre *A. obtectus*. *Memorias de la segunda reunión Nacional sobre orégano 25-26 feb, en Salices Chihuahua.*
- Gerothanassis I.P, V. Exarchou, V. Lagouri, A. Troganis, M. Tsimidou, and D.Boskow. 1998. Methodology for Identification of phenolic acids in complex phenolic mixtures by high-resolution two-dimensional nuclear magnetic resonance. Application to methanolic extracts of two oregano species. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4185-4192
- Günther, E. 2000. *The Essential Oils.* Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis..Krieger Publishing: New York, USA.
- Guan Wenqiang, Li Shufen, Yan Ruixiang, Tang Shaokun, and Quan Can. 2009. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Chemical Engineering and Technology*, Vol 56:231-238.

- Gutierrez, M.C y Droguet, M. 2002. La cromatografía de gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de compuestos causantes del olor. Boletín INTEXTER (U.P.C.). N^o. 122. pag 35-54.
- Gleiser, R.M., Bonino, M.A., Zygadlo, J.A., 2007. Bioactividad de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* contra mosquitos [Essential oils from *Minthostachys mollis* as insecticida]. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas 6 (6): 350-351
- Hammer KA; Carson CF and Riley TV.1999. Antimicrobial activity of essential oils extracts plants. J Appl Microbiol. 86 (6):985-990.
- Helander, I. M. 2001. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. of agricultural and food chemistry. Vol. 46. pp. 3590-3595
- Huerta C. 1997. Orégano Mexicano: Oro vegetal. Revista Ciencia y desarrollo (33), 11: 30-37.
- Hernández, T., Canales, M., Ávila, J., García, A., Meraz, S., Caballero, J., and Lira, R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* (Verbenaceae), BLACPMA, 8 (4):295-300.
- Huseyin C, Atila Y. 2006. A study of the larvicidal activity of Origanum (Labiatae) species from southwest Turkey. Journal of Vector Ecology. 31:118-122.
- Isman M. 2000. Plant essential oils for pests and disease management. Crop Protection. Phytochem. 41(5):883-886
- Isman MB, Wan AJ, Passreiter C M. 2001. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm *Spodoptera litura*. Fitoterapia. 72:65-68.
- INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (2009) Anuario Estadístico de Sonora 2009. 1: 12-13
- Juliani H R Jr, F Biurrun, A R Koroch, H R Juliani, J A Zygadlo (2000) Chemical constituents of essential oil of *Lippia laxibracteata* (Verbenaceae). Planta Medica 66:567-568.
- Kokkini S, Karousou R, Dardioti A, Krigas N, Lanaras T. 1997. Autumn essential oils of greek oregano. Phytochem.; 44 (5): 883-886.
- Love, J. and Pearson, A. M. 2006. Lipid oxidation in meat. Catalyst of oxidative rancidity in meats. J. Food Sci. 35: 596.

- Lorenzo, D., Paz, D., Davies, P., Vila, R., Cañigüeral, S. & Dellacassa, E. 2001. Composition of a new essential oil type of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown from Uruguay", *Flavour Fragr. J.* 16: 356-359.
- Magalis Bittner, María Casanova, Cecilia C. Arbert Milenio, Victor J; and José V. Becerra: 2008. Effects of essential oil from five plant species against the granary weevils *Sitophilus zeamais* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera). *J. Chil. Chem. Soc.* 53:1455-1459.
- Martinez-Rios, J.J., 1979. Soil classification in arid lands using Thematic Mapper data. Ph.D. Dissertation Thesis, New Mexico State University, Las Cruces, NM, 170 pp.
- Meza M., N. González de C y A. Usubillaga. 2007. Chemical composition of essential oil from *Origanum majorana* L. extracted by different techniques and its biological activity. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 2007, 24: 725-738.
- Moretti, M.D.L.Sanna-Passino,G.Demontis,S. Bazzoni, E. 2002. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPS Pharm SciTech*, 3(2), 13.
- Ngamo T.S.L, Ngatanko I, Ngassoum M. B., Mapongmestsem P, M and Hance T. 2007. Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 2 (4), pp173-177.
- Nensida Permuy, Orlando Chaveco, Jorge González, Evelio García and Noel Hidalgo. 2008. Postharvest losses of common bean seed in a traditional storage system. *Bol. San. Veg, Plagas*. Vol 30:91-100.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión. 30 de diciembre de 2010. Diario Oficial.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-RECNAT-1997. Que establece los procedimientos y especificaciones para reaÑizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de hojas, pencas, flores, semillas y frutos.Publicado en el diario oficial de la federación..
- Oyedemi S O, A I Okoh, LV Mabinya, G Pirochenva, A J Afolayan. 2009. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol, γ -terpineol and γ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. *African Journal of Biotechnology*; 8:1280-1286.

- Ortega-Nieblas M.M, McCaughey-Espinoza D, Robles-Burgueño MR, Serna- Félix M. 2008. Estimación de materia vegetal del Orégano (*Lippia palmeri* Wats) y su contenido de aceite esencial por planta en dos sitios nativos del Estado de Sonora. Memorias del 5to Simposio Internacional de la Flora Silvestre de Zonas áridas; 234-249.
- Osorno-Sánchez,T., Flores-Jaramillo, D., Hernández-Sandoval, L. and Lindig-Cisneros, R. 2009. Management and Extraction of *Lippia graveolens* in the Arid Lands of Queretaro, Mexico. Economic Botany, 63(3) 314–318.
- Pascual-Villalobos, M. J. 1996. Plaguicidas naturales de origen vegetal: Estado actual de la investigación. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Monografía INIA N0. 92. Madrid. España pp 35
- Pascual-Villalobus, M. J., M. C. Ballesta-Acosta. 2004. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oil on *Collosobruchus maculatus*. Biochem. Syst. Ecol. 31, 673–679.
- Pascual, M.E.;Slowing, K.; Carretero, E.; Sánchez, D.; Villar, A. 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76, 201-214.
- Papachristos, D. P. and Stamopoulos, D. C. 2003. Selection of *Acanthocelides obtectus* for resistance to lavender essential oil vapour. *Journal of stored products research* 39:433-441.
- Papachristos, D. P. and Stamopoulos, D. C. 2004. Fumigant, Toxicity of there essential oils on the eggs of *Acanthosceñides obtectus* (Say) (Coleoptera:Bruchidea) *Journal of stored products research* 4:517-525,
- Parry, Ernest J. The Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes. 1992. 4th Edition. Vol 11. D. Van Nostrand Company., NY, USA.
- Ponce, A., Roura, S., DEL Valle, C. y Moreira, M. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *in vitro* and *in vivo* Studies. *Postharvest Biology and Technology*. 49. 294-300.
- Portillo-Ruiz, M.,Viramontes-Ramos, S., Gastélum-Franco, M.G., Muñoz-Castellanos, L., Torres-Muñoz, J. B. y Nevárez-Moorillón, G. V. 2008. Efecto antifungico de aceite esencial de orégano Mexicano (*Lippia berlandieri* Shauer) sobre hongos

- contaminantes en productos de panadería. 3era Reunión Nacional del orégano. RESPYN Edición Especial No. 1-2008.
- Radudiene J, Judpintiene A, Peiulyte D. and Janulis V. 2005. Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. BIOLOGIJA. Nr. 4: 53-58
- Rajendran S, Sriranjini V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. J Stored Prod Res 44:126-135.
- Ramírez, G. M. 1981. Almacenamiento y conservación de granos y semillas ED. C.E.C.S.A. México, D.F. p.19-66.
- Regnault-Roger, C. Philogéne, B.J.R. y Vincent, C. 2004. *Biopesticidas de origen vegetal*. 1era Edición en español. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España.
- Rocha-Estrada, J. G. y García-Carreño, L. 2008. Insecticidas clásicos y biopesticidas modernos: avances en el entendimiento de su mecanismo de acción. Bio Tecnología Vol 12 (1), 50-62.
- Rodriguez, M.; Valdez, J.; Vera, J. y Castillo, A. Larval, Instalar Identification of *Zabrotes subfasciatus*. Using head capsule size. 2000. Agroscience 34:83-92.
- Samir A. M. Abdelgaleil; Magdy I. E. Mohamed; Mohamed E. I.; Badawy Sailan A. A and El-arami. 2009. Fumigant and Contact Toxicities of Monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their Inhibitory Effects on Acetylcholinesterase Activity. J Chem Ecol, 35:518–525.
- SAGARPA, 2005 <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/geog/index.htm1>
- Salgueiro L, M Cavaleiro, A Goncalves, C Proenca. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. Planta Medica 69:80-83.
- Senatore, F. & Rigano, D. 2001. "Essential oil of two *Lippia* spp. (Verbenaceae) growing wild in Guatemala", *Flavour Fragr. J.*16: 169-171.
- Sékou Moussa Kéita, Charles Vincent, Jean-Pierre Schmita, John Thor Arnason, Andre Bélanger. 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab). (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research 37:339–349.
- Saeberg AC; Labbe RG and Shetty K. 2003. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by elite clonal extract of oregano (*Origanum vulgare*). food Biotechnol. 17 (2):129-139.

- Sagdic O; Kuscu A; Ozcan M and Ozcelik S. 2002. Effects of Turkish specie extracts at various concentration on the growth of Escherichi coli O157:H7. Food Microbiol. 19 (5):473-480.
- Silva-Vazquez R, Dunford NT. 2005. Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant maturity. J Essent Oil Res; 17:668-671.
- Silva G, Lagunes, A. and Rodriguez, J.C. 2003. Control de Sitophilus zeamais (Coleoptera:curcutionidea) con polvos vegetales y en mezclas con carbonato de calcio.Ciencia e investigación. Agraria 30:153-160.
- Seenivasan Prabuseenivasan, Manickkam Jayakumar and Savarimuthu Ignacimuthu. 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and AlternativeMedicine, 6:39, p 1-8.
- Singh, T. 1979. Biology of *Zabrotes subfasciatus* (Boeh) (Coleoptera: Bruchidae). Patiala. India. Entomol. 4(2):201-203.
- SINGH, G., KAPOOR, I., SINGH, P. HELUANI, C. y LAMPASONA, M. 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food and Chemical Toxicology. 46. 3295-3302
- Schoonhoven, A. 1976.Pests of stored beans and their economic importance in latin Americ. In: Proc. Symp. Trop. Stored Prod. Entomol. p 691-698. 15th. Int. Congr. Entomol. pp824.
- Stashenko E.; Jaramillo B.; Martínez J. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. J. Chromatogr. A, 1025: 93–103.
- Spotti, E. 2000. The use of essential oil in environmental microbial decontamination. Food processing industry. Vol. 72. p. 19-27
- Toncer O., Karaman, S, Kizil, S. and Diraz, E. 2009. Changes in Essential Oil Composition of Oregano (*Origanum onites* L.) due to Diurnal Variations at Different Development Stages. Not. Bot. Hort. Agrobot. 37 (2), 177-181
- Velasco, Reinaldo J., Villada, Héctor S. y Carrera Jorge E. 2007. Aplicaciones de los fluidos Supercríticos en la Agroindustria. Información Tecnológica Vol 18 (1), 53-65.
- Vernin G, C Lageot, E M Gaydou, C Parkanyi. 2001. Analysis of essential oil of *Lippia graveolens* HBK fom El Salvador. Flavour and Fragance Journal 16:219-226.

- Villavicencio G., E. E., O. U. Martínez B. y A. Cano P. 2007. Oregano recurso con alto potencial. Rev. Ciencia y Desarrollo. Septiembre 3(211): 60-66.
- Wagner, K.; Elmadfa, I. 2003. Biological relevance of terpenoides. Overview focusing on mono, di and triterpenes. Ann. Nutr. Metabol. 47, 95-106.
- Yesil, C. O., Hames, K. E. E., Bedir, E., Vardar, S. F., Ozek, T. and Baser, K. H. C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and Essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 100: 553–559.
- Young Ch, Si Hyock, J. Marshall, and Young Joon A. 2009. Ovicidal and adulticidal activities of *Origanum majorana* essential oil constituents against insecticide-susceptible and pyrethroid/malathion-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). J. Agric. Food Chem. 57, 2282-2287.