



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

Evaluación de la producción de los aceites esenciales de orégano  
(*Lippia graveolens* Kunth) in vitro y el orégano silvestre como  
herramienta para la mejora de manejo de recursos

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Ciencias - Recursos Bióticos

**Presenta**

Areli Erandine Torres Bojórquez

Santiago de Querétaro, Octubre del 2011



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Ciencias-Recursos Bióticos

Evaluación de la producción de los aceites esenciales de orégano (*Lippia graveolens* Kunth) in vitro y el orégano silvestre como herramienta para la mejora de manejo de recursos

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias-Recursos Bióticos**

**Presenta:**

Arelí Erandine Torres Bojórquez

**Dirigido por:**

Guadalupe Xochitl Malda Barrera

Dra. Guadalupe X. Malda Barrera  
Presidente

Firma

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz  
Secretario

Firma

Dr. Oscar García Rubio  
Vocal

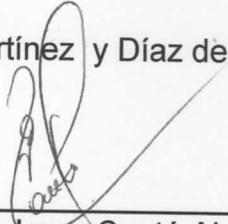
Firma

Dra. Rosalía V. Ocampo Velázquez  
Suplente

Firma

Mahinda Martínez y Díaz de Salas  
Suplente

Firma

  
Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Director de la Facultad de  
Ciencias Naturales

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y  
Posgrado

Campus Juriquilla  
Querétaro, Qro. Octubre, 2011

## RESUMEN

El orégano mexicano (*Lippia graveolens*) crece de forma silvestre en las zonas áridas del país, donde el principal factor que promueve la producción interna de metabolitos secundarios{ XE "metabolitos secundarios" }, es el estrés hídrico, altamente demandados debido a su utilidad en áreas como la medicina y la industria alimenticia, en especial sus aceites esenciales{ XE "aceites esenciales" } que poseen propiedades antioxidantes y antibacterianas. En los cultivos in vitro de esta planta al no haber estrés hídrico la producción de aceites esenciales es casi nula por lo que fue necesario utilizar herramientas como el uso de hormonas vegetales auxinas y citoquininas como Benziladenina (BA) y ácido Naftalenacético (NAA) y compuestos como el Polietilenglicol (PEG) y el ácido Abscísico (ABA) para inducir multiplicación de brotes y estrés hídrico.

En el presente estudio, se adicionaron BA y NAA a los medios de cultivos para la inducción de multiplicación de brotes. Los tratamientos  $T_6= 44 \text{ nM NAA}/3.5 \text{ } \mu\text{M BA}$   $T_{10}= 54\text{nM NAA}/3.5 \text{ } \mu\text{M BA}$   $T_{11}= 54\text{nM NAA}/4.5 \text{ } \mu\text{M BA}$   $T_{12}= 54\text{nM NAA}/5.5 \text{ } \mu\text{M BA}$ , fueron los tratamientos que mejor funcionaron en cuanto a la inducción de multiplicación de brotes, obteniendo el mayor número de brotes por planta de 13 a 25. Las plantas que estuvieron sometidas a mayor estrés hídrico, medido por el porcentaje de pérdida de electrolitos, conductividad eléctrica relativa (CER) fueron las que estuvieron bajo los tratamientos ABA 2 (10  $\mu\text{M}$ ) (CER, 40.45%), ABA 3 (100  $\mu\text{M}$ ) (CER, 46.46 %) y PEG 3 (10%) (CER, 49.14%). El análisis de las muestras con cromatografía de Gases (FID) indicó que los aceites esenciales de los tratamientos ABA1 y ABA 2 fueron presentaron los metabolitos secundarios característicos, timol, p-cimeno y carvacrol. El tratamiento con PEG 3 presento la mayor concentración de timol de las muestras, confirmando que el estrés hídrico es uno de los factores más importantes para la producción de aceites esenciales.

**Palabras clave:** *Lippia graveolens*, Cultivo in vitro, timol, p-cimeno, carvacrol.

## SUMMARY

Mexican oregano (*Lippia graveolens*) grows wild in arid areas of Mexico. Secondary metabolites of oregano have high demand because of their uses in areas such as medicine and food industry, and particularly, because their essential oils have antibacterial and antioxidant properties. The main factor that promotes the production of secondary metabolites is water stress. With the absence of water stress in in vitro cultivation of the oregano, the essential oil production is almost null, so is necessary use tools, like vegetal hormones such as auxins and cytokinins as Benzyladenine (BA) and Naphtalenacetic acid (NAA), compounds like Polyetileneglycol (PEG) and Abscisic acid (ABA) for the induction of shoot multiplication and water stress to evaluate the production of essential oils de in response to these factors . Were added { XE "estrés hídrico" } BA y NAA to the culture medium to the induction of shoot multiplication, treatments T<sub>6</sub>= 44 nM NAA/3.5 μM BA T<sub>10</sub>= 54nM NAA/3.5 μM BA T<sub>11</sub>= 54nM NAA/4.5 μM BA T<sub>12</sub>= 54nM NAA/5.5 μM BA, were the best functioned, getting the greatest number of shoots for plant from 13 to 25. While the plants were subjected to higher water stress measured by the percentage electrolyte loss, Relative Electrical Conductivity (REC) were those that were subjected to treatments ABA 2 (10 μM) (REC, 40.45%), ABA 3 (100 μM) (REC, 46.46 %) and PEG 3 (10%) (REC, 49.14%) coinciding with this by analyzing the samples with gas chromatography (FID) resulting ABA1 y ABA 2 were the treatments that showed the 3 compounds searched tymol, p-cymene and carvacrol, while PEG 3 showed the highest concentration of tymol among all the samples confirming that water stress is one of the factors more importants for the production of essential oils.

**Palabras clave:** *Lippia graveolens*, *in vitro* cultivation, thymol, p-cymene. Carvacrol.

***DEDICATORIAS***

**A mi madre María Eugenia Bojórquez** por apoyarme en todo momento, brindarme su amor y darme hasta lo imposible para seguir adelante.

**A mi padre José Luis Torres Lucio** por lo que fue en mi vida y por todo lo que pudo ser...

**A mi hermana Yunnuen Torres** por darme ánimo y comprensión cuando más lo necesité

**A mi tía Carmen Bojórquez** por ser una de las columnas fuertes que me ha acompañado y sujetado toda mi vida.

**A mi abuela Olga Hernández** por ofrecerme su cariño incondicional.

**A mi tío Domingo Torres** por ser siempre el ejemplo paterno y profesional con el que me he guiado.

**A toda la familia Bojórquez Hernández** que me ha apoyado en el camino que elegí, sin los cuales no podría ser la persona que soy.

**A mis compañeros y amigos de la Maestría,** en especial a Brenda Almaguer y Zaira González con los que compartí conocimientos y vivencias.

**A mis amigos** en especial Jazziel Nájera y Selene Alvarado que fueron un soporte importante en mi vida profesional y personal.

**A Gerardo Mosqueda** por darme apoyo y cariño para realizar mis metas.

## ***AGRADECIMIENTOS***

**A la Dra. Guadalupe Malda Barrera** que me permitió trabajar a su lado y me asesoró con lo que necesité para mi camino en la maestría.

**Al Dr. Oscar García Rubio** que me guió desde trabajo de campo hasta laboratorio con su experiencia y conocimiento.

**A la Dra. Sandra O. Mendoza Díaz** por permitirme trabajar en su laboratorio y apoyarme con lo necesario para la investigación.

**A la Dra. Rosalía Ocampo Velázquez** por aportar sus conocimientos en el medio para ayudar a dar dirección y soporte a la investigación.

**A la Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas** por aportar sus conocimientos en el medio para ayudar a dar dirección y soporte a la investigación.

**A la comunidad de San Juan Raya, Puebla,** por contribuir en la parte de recolección de material vegetal indispensable en este proyecto.

**A la Bióloga Karina Luna Maldonado** por contribuir con asesoría y trabajo en campo y laboratorio para la realización de esta tesis.

**A la Dra. Rita Miranda** del Instituto Tecnológico de Celaya, que puso a nuestra disposición el uso de su laboratorio y equipos para la realización de este proyecto.

**A todos mis profesores de la maestría en ciencias de los recursos bióticos** que aportaron su conocimiento para mi crecimiento como estudiante.

**A CONACYT,** por la asignación de la beca de maestría (No. registro 333348)

**A todos GRACIAS**

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	i
<b>Summary</b>	ii
<b>Dedicatorias</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	v
<b>Índice</b>	vi
<b>Índice de Cuadros</b>	x
<b>Índice de Figuras</b>	xi
<b>I. <u>INTRODUCCION</u></b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
Producción nacional de orégano ( <i>L. graveolens</i> )	4
Características generales del orégano ( <i>L. graveolens</i> )	5
Taxonomía	5
Características químicas del orégano ( <i>L. graveolens</i> )	6
Usos del orégano	8
Cultivo <i>in vitro</i>	9
Uso de hormonas vegetales para inducción de brotes de plantas	10
Auxinas	10
Citoquininas	11
Estrés hídrico, ácido abscísico (ABA) y polietilenglicol (PEG)	12
Ácido Abscísico (ABA)	13

Polietilenglicol (PEG)	14
Métodos de extracción	14
Extracción usando disolventes	16
Concentración de extractos	16
Análisis de aceites esenciales	16
Cromatografía	16
Cromatografía de gases CG	17
Detector de ionización de flama (FID)	18
<u><b>HIPOTESIS</b></u>	19
<b>OBJETIVO</b>	20
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	20
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
Obtención de semillas	21
Desinfección de semillas	22
Inicio de cultivo <i>in vitro</i>	22
Tratamientos Hormonales para la Multiplicación de Brotes	23
Establecimiento de Tratamientos para la Inducción de estrés hídrico	25
Tratamiento con Acido Abscísico	25
Tratamientos con Polietilenglicol	26

Perdida de Electrolitos (conductividad eléctrica relativa)	27
Obtención de Extractos Hexánicos	28
Análisis de Cromatografía	29
Identificación de compuestos volátiles	30
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
Porcentaje de Germinación	32
Multiplicación de Brotes	33
Conductividad Eléctrica Relativa	35
Identificación de compuestos volátiles	37
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>40</b>
<b>VI. <u>BIBLIOGRFÍA</u></b>	<b>42</b>

## INDICE DE CUADROS

	<b>PAG</b>
<b>Cuadro 2.1</b> Comparación entre los principales métodos de extracción de aceites esenciales.	15
<b>Cuadro 3.1</b> Tratamientos hormonales para la multiplicación de brotes	24
<b>Cuadro 3.2</b> Tratamientos a base de ácido absísico para la inducción al estrés hídrico	25
<b>Cuadro 3.3</b> Tratamientos a base de Polietilenglicol para inducción de estrés hídrico	26
<b>Cuadro 3.4</b> Programa de temperatura utilizado en GC	29
<b>Cuadro 3.5</b> Condiciones cromatográficas utilizadas en GC (FID)	30
<b>Cuadro 4.1</b> No. de brotes obtenido para cada tratamiento utilizado con las distintas combinaciones de hormonas para la inducción a la multiplicación de brotes	33
<b>Cuadro 4.2</b> Análisis de varianza de los tratamientos utilizados en la multiplicación de brotes	33
<b>Cuadro 4.3</b> Prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$ para las medias de los tratamientos de multiplicación de brotes, medias en diferentes columnas muestran diferencias significativas.	34
<b>Cuadro 4.4</b> Análisis de varianza para la pérdida de electrolitos en los tratamientos de inducción al estrés hídrico.	35
<b>Cuadro 4.5</b> Prueba de Tukey $\alpha = 0.05$ para pérdida de electrolitos en los tratamientos a la inducción de estrés hídrico. Medias en diferentes columnas muestran diferencias significativas.	36
<b>Cuadro 4.6</b> Tiempos de retención y magnitudes de las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos de los compuestos estándar utilizados en el cromatografía de gases (FID).	38
<b>Cuadro 4.7</b> Concentraciones en ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) de p-cimeno, timol y carvacrol encontrados en cada uno de los tratamientos de inducción al estrés hídrico, así como a la muestra control y a la muestra de orégano silvestre.	38

## INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 2.1</b> Planta de orégano <i>Lippia graveolens</i>	6
<b>Figura 2.2</b> Principales compuestos presentes en el orégano (Dewick, 1997).	7
<b>Figura 2.3</b> Esquema general de un cromatógrafo de gases (Dellacsa, 2002).	17
<b>Figura 2.4</b> Esquema de un Detector de ionización de flama (Repositorio de la Universidad de Alicante )	18
<b>Figura 3.1</b> Sitio de muestreo de <i>Lippia graveolens</i> , San Juan Raya, Puebla.	21
<b>Figura 3.2</b> Medio MS para inicio de cultivo in vitro	23
<b>Figura 3.3</b> Esquema de un conductímetro (Oakton, modelo WD- 35607-00).	28
<b>Figura 3.4</b> Imagen rotavapor	29
<b>Figura 4.1</b> No. de semillas germinadas contra tiempo, de los lotes de semillas recién colectadas y de las almacenadas durante dos meses.	32
<b>Figura 4.2</b> Pérdida de electrolitos (CER %) en los tratamientos de inducción de estrés hídrico y el control.	35
<b>Figura 4.3</b> Cromatograma para la muestra ABA 3, obtenido con GC (FID) utilizando hexano como disolvente.	37

## I. INTRODUCCIÓN

El nombre "orégano" se ha asignado a más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico. Las hojas secas del *Origanum vulgare* L. nativo de Europa y de *Lippia graveolens*{ XE "Lippia graveolens" }, planta nativa de México son de uso culinario común (Pierce 1999). El género *Origanum* pertenece a la familia Lamiaceae, mientras que *Lippia graveolens*, a la familia Verbenaceae. La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; usos que lo han convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos, por ejemplo los terpenoides, para sus cuidados primarios de salud (Arcila *et al.*, 2004).

En cuanto a los estudios de manejo hechos sobre el orégano, los trabajos que se han llevado a cabo han sido en su mayoría sobre el recurso silvestre, casi todos relacionados con aspectos de inventario, rendimiento de hoja seca, así como modelos para cuantificar y predecir la producción (Bautista *et al.*, 1990)

El valor del orégano está íntimamente relacionado con la producción de metabolitos secundarios{ XE "metabolitos secundarios" } en especial de sus aceites esenciales{ XE "aceites esenciales" }. Muchos compuestos fitoquímicos que se originan en la planta tienen funciones metabólicas importantes, respondiendo al estrés ambiental para su sobrevivencia a través de las generaciones. Estos metabolitos se producen como respuesta al estrés ambiental, en especial el estrés hídrico{ XE "estrés hídrico" } que incrementa sus concentraciones (Penuelas y Llucsa, 1997). Por esta razón el orégano cultivado no posee altos estándares de calidad en cuanto a sus aceites esenciales, debido a que la planta no está sometida a estrés ambiental.

Aunque ya ha sido probado que el manejo agrícola del orégano disminuye su calidad (Carriles 1994) se puede recurrir a la biotecnología{ XE "biotecnología" } como una herramienta para la mejora de las características de esta planta.

El cultivo *in vitro*{ XE "cultivo in vitro" } permite la proliferación de tejidos particulares por ejemplo, callo derivado de hojas o plantas completas a partir de brotes vegetativos. Hasta el momento, no se sabe si la producción de aceites esenciales{ XE "aceites esenciales" } se puede generar a partir de tejidos aislados, como lo son callos derivados de hojas o brotes nuevos producidos *in vitro*. Se desconoce si la presencia de hormonas{ XE "hormonas" } aplicadas externamente influye en la producción de metabolitos secundarios{ XE "metabolitos secundarios" }. Una de las hormonas que se producen en condiciones de estrés es el ácido abscísico{ XE "ácido abscísico" } (ABA) el cual es un regulador de crecimiento vegetal que se sintetiza en los plastidios, fundamentalmente en los cloroplastos. Un aumento en la concentración de este regulador en la hoja como respuesta a un estrés hídrico{ XE "estrés hídrico" } causa el cierre de estomas, disminuye la transpiración, inhibe el crecimiento de la planta y el desarrollo de las semillas y los frutos (Krikorian, 1995).

Otros reguladores de crecimiento vegetal{ XE "hormonas" } como las auxinas{ XE "auxinas" }, promueven el crecimiento y diferenciación celular, por lo tanto el crecimiento en longitud de la planta estimula el crecimiento y maduración de los frutos y la floración. Las citoquininas{ XE "citoquininas" } son reguladores de crecimiento vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos, estimulan la germinación de semillas así como la inducción de la formación de brotes (Krikorian, 1995). El uso de este tipo de compuestos modifica las condiciones de crecimiento de la planta.

Se sabe que las condiciones comunes del cultivo *in vitro* no favorecen la producción de aceites puesto que la humedad relativa es muy alta; en el medio de cultivo se puede manipular osmóticamente la disponibilidad de agua simulando así un estrés hídrico{ XE "estrés hídrico" } que podría favorecer la producción de los aceites en las plantas o tejidos del orégano *in vitro* (Cárdenas 2002).

En este proyecto se evaluó la presencia de los compuestos timol, carvacrol y p-cimeno en extractos hexánicos obtenidos de las plantas de orégano expuestas a tratamientos de inducción de estrés hídrico y proliferación de brotes. Estos metabolitos, le dan a la planta de orégano características de gran interés en la industria.

## II. ANTECEDENTES

### **Produccion nacional de orégano (*Lippia graveolens*)**

El orégano del género *Origanum* (europeo) se extrae generalmente de plantaciones bien establecidas, mientras que el mexicano se obtiene de poblaciones silvestres de casi todo el territorio nacional, sin un plan de manejo. Se sabe que los pobladores de las zonas semiáridas del país recolectan esta planta en los meses de agosto a septiembre y la venden, lo cual significa un ingreso importante en estos meses. Actualmente existen varios grupos de oreganeros que ya se encuentran organizados y comercializan la hoja (Oliver, 1996).

Ya se ha mencionado que las especies mexicanas de orégano se caracterizan por ser plantas que crecen principalmente en climas secos y las europeas en climas mediterráneos. Las condiciones ambientales donde habitan estas especies reflejan la cantidad y composición de sus aceites esenciales, de tal manera que el orégano mexicano es descrito con un sabor mucho más fuerte y con una mayor cantidad de aceites esenciales (3-4%) a comparación del orégano europeo que contiene entre 2-2.5% (Oliver, 1996).

El volumen de la producción de orégano en México ha llegado a ser de 2559 ton (en 1989), lo que representa un valor monetario de 3.2 millones de dólares, aunque este volumen ha variado entre 1100 y 1800 ton anuales lo que representa de 1 a 2 millones de dólares dependiendo de la variación de precios en el mercado.

Cavazos (1991) señala que el pastoreo y la cosecha intensa pueden afectar negativamente la producción de hojas ya que la mayor producción proviene de áreas con pastoreo moderado y que el pastoreo puede tener efectos negativos en su hábitat o afectar directamente la estructura de edades de esta especie.

Se estima que en 2002 las exportaciones de orégano seco no manufacturado con destino a los Estados Unidos fueron de 6, 648,313 kilogramos; México contribuyó con 2,143 ,377 kilogramos, solo por debajo de Turquía.

### **Características generales del orégano (*Lippia graveolens*)**

El orégano mexicano crece de forma silvestre en climas secos y semisecos, se distribuye desde Texas hasta Nuevo México en Estados Unidos, así como en México y Sudamérica (Correl y Johnston, 1970).

La distribución de *Lippia graveolens* en México, ocurre en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Oaxaca y Sinaloa principalmente (Martínez, 1979).

García (1973), menciona que en las altitudes de 1400 a 1600 msnm, es donde se distribuyen la mayoría de las poblaciones de orégano, en suelos pedregosos, ligeramente alcalinos con un pH de 7.3 a 7.6; clima seco semicálido, con precipitaciones en verano no mayores a los 300 mm de promedio anual. Se alcanza una producción nacional anual de 350 toneladas y se exporta principalmente a países como: Estados Unidos, España, Reino Unido y Singapur (Gutiérrez, 2007).

### **Taxonomía**

Según SEMARNAT (2001) la taxonomía del orégano mexicano es.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsidae

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Esta planta es un arbusto caducifolio, muy ramificado que normalmente llega a alcanzar 2.50 m, de altura y 1.20 m, de diámetro de cobertura foliar aunque en las poblaciones de bajo aprovechamiento miden de 0.70 m a 1.20 m de altura y de 0.30 a 0.80 m, de diámetro de cobertura dependiendo de las condiciones específicas y la edad de la planta (Martínez *et al*, 1979).

### **Características químicas del orégano.**

Con el nombre de orégano se conocen a dos grandes grupos: el orégano mediterráneo o europeo y el mexicano. El primero proviene del genero *Origanum vulgare* subs. *hirtum* (orégano griego) y *O. vulgare* subs. *gracite* (orégano turco). El orégano mexicano proviene de dos especies de la Familia Verbenaceae: *Lippia palmeri* y principalmente de *L. graveolens* (Huerta, 1997).

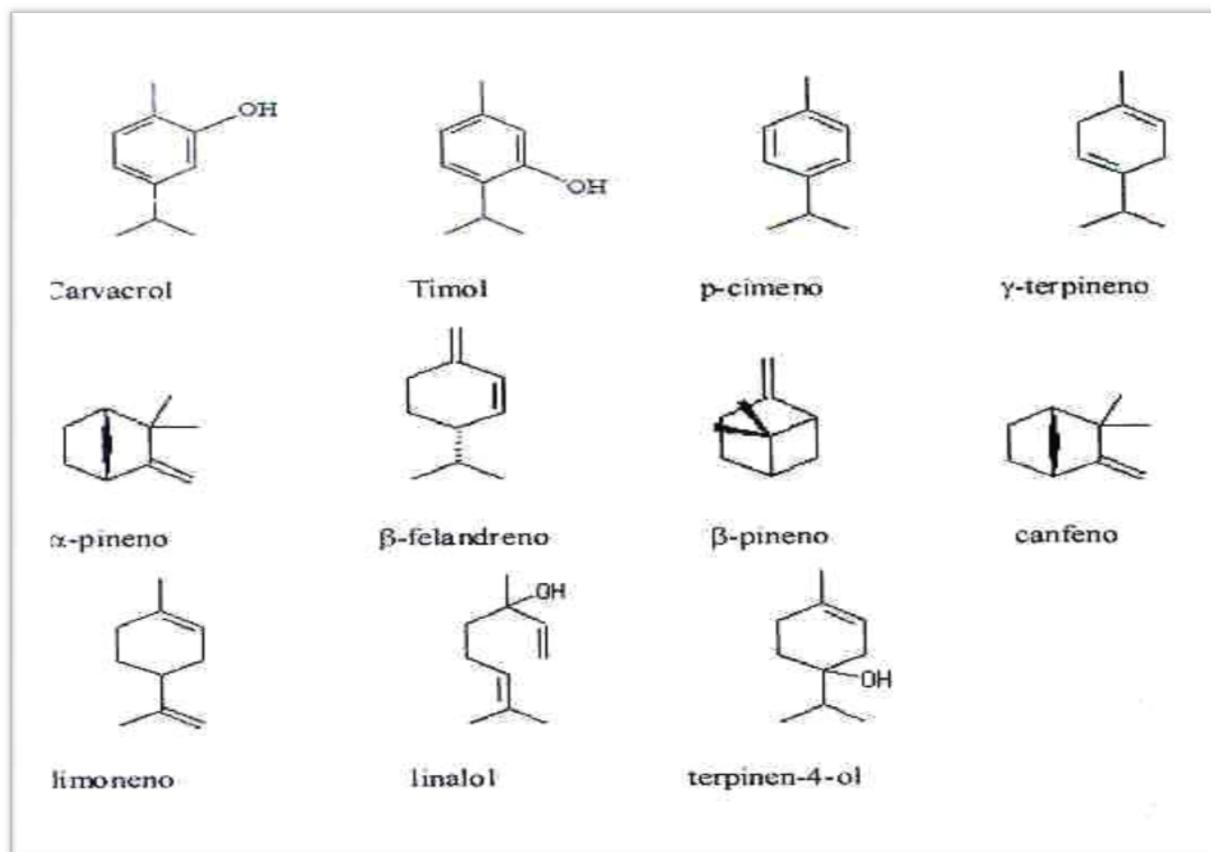


**Figura 2.1** Planta de orégano *Lippia graveolens*

La composición química y la producción de metabolitos secundarios del orégano, depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento de la planta (Arcila *et al.*, 2004).

Se han reportado gran cantidad de compuestos aromáticos: limoneno, terpineno, o-cimeno,  $\alpha$ -pineno, mirceno y p-cimeno, así como el carvacrol y timol, siendo estos dos últimos los de mayor abundancia y los que le proporcionan al orégano algunas de sus principales características sensoriales y antimicrobianas (Leite *et al*, 2006; Díaz y Pérez, 2006; Lambert *et al.*, 2001); algunos alcoholes monoterpénicos como linalol y 4-terpineol, además contiene minerales como potasio, magnesio, manganeso, cobre, hierro y zinc; taninos y vitaminas: niacina y  $\beta$ -caroteno (Gotsiu *et al.*, 2002).

El orégano posee propiedades importantes como antioxidante (al contener cerca de 20 compuestos con dicha propiedad) antiespasmódico, expectorante, carminativo y antiséptico (Triantaphyllou *et al.*, 2007).



**Figura 2.2** Principales compuestos presentes en el orégano (Dewick, 1997).

## Usos del orégano

Huerta (1997), menciona que la mayoría de las especies de orégano poseen notables propiedades medicinales, que se explican por la extraordinaria y compleja composición química que tienen estas plantas. En la práctica terapéutica (herbolaria) las especies de orégano europeas (*Origanum spp*) y las mexicanas (*Lippia spp*) se administran para las mismas dolencias.

Las hojas y los tallos del orégano contienen aceite esencial, sustancias tónicas, un principio amargo, goma-resina, entre otras; la esencia tiene como componentes principal, el carvacrol y también contiene timol, alfa-pineno, cimeno, terpenos, principalmente. Estos elementos le dan propiedades tónicas: amargo-excitante, antisépticas, expectorantes, diuréticas y sudoríficas; también se le considera un producto duradero de consumo final, ya que una vez deshidratado conserva sus propiedades y no sufre descomposición. En base a sus propiedades, en México se usa además de condimento para alimentos, como medicina popular, en forma de infusiones para la tos, cólicos, padecimientos de los riñones, fiebre y enfermedades de las vías respiratorias.

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado 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 las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*). Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el timol el más activo. Los valores de la concentración mínima

inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/ml para hongos (Arcila, 2004).

Ya se ha mencionado que el orégano cultivado no tiene las mismas propiedades que el orégano silvestre; pero hay pocas investigaciones que involucren al cultivo *in vitro* y el manejo de inducción de estrés hídrico con la planta de orégano para analizar la producción de aceite esencial como respuesta al estrés, lo cual podría resultar una herramienta que pudiera contribuir a establecer una alternativa en la producción de los aceites esenciales.

### **Cultivo *in vitro***

La expresión cultivo *in vitro* de plantas, significa cultivar plantas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características fundamentales: la asepsia (ausencia de gérmenes, etc.), y el control de los factores que afectan el crecimiento. El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular, y en condiciones de laboratorio es posible actualmente reproducir todos los factores que puedan incidir en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Castillo *et al.*, 1999).

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente de la planta en la naturaleza es técnicamente muy complejo. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que se puedan mantener controlados. Con finalidad puramente descriptiva se puede clasificar los principales factores no biológicos que afectaran al desarrollo del cultivo *in vitro* (Castillo *et al.*, 1999):

### *Ambiente químico*

- Composición del medio de cultivo
- Fuerza osmótica
- pH

### *Ambiente físico*

- temperatura
- luz y fotoperiodo
- humedad

La metodología de cultivo in vitro permite mejorar el acceso a una gran cantidad de plantas a partir de cantidades mínimas de material vegetal, y su desarrollo productivo representa una oportunidad de crecimiento y diversificación.

### **Uso de hormonas vegetales para la inducción de brotes en plantas.**

Las fitohormonas son moléculas orgánicas que se producen en una región de la planta y que normalmente se trasladan hacia otra región, en la cual se encargan de iniciar, terminar, acelerar o desacelerar un proceso, su efecto lo producen actuando en muy bajas concentraciones. Pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhibe propiedades fuertes de regulación del crecimiento en plantas. Se incluyen al etileno, auxinas, giberelinas, citoquininas y el ácido abscísico, cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta (Rojas 1993).

### **Auxinas**

Las auxinas más utilizadas son el ácido indolacético, el ácido indenoacético, el ácido 2-benzofuranacético, el ácido 3-benzofuranacético, el ácido naftalenacético, entre otros (Azcon *et al.*, 1996).

Los principales procesos orgánicos que controlan las auxinas son: iniciación de la radícula y raíces adventicias, retención de flores y frutos, paso de flor a fruto, juventud del follaje (interacción compleja) y tropismos. Las auxinas a bajas concentraciones estimulan el metabolismo y desarrollo y a concentraciones altas lo deprimen (Azcon *et al.*, 1996).

Las auxinas intervienen básicamente en dos estados del enraizamiento:

- El primero, en el cual se forman los meristemas radiculares, estado inicial de su crecimiento. Este a su vez se puede dividir en un estado activo de acción de las auxinas en el cual debe haber una continua presencia de auxinas, pudiendo éstas venir de los brotes terminales o laterales o de una aplicación externa, y una segunda etapa, la cual se puede denominar como de auxinas inactivas, ya que están presentes en la raíz cuatro días mas pero no tienen ningún efecto adverso en su formación.
- En la segunda etapa se da la elongación de los primordios radicales, en ésta la nueva raíz atraviesa la corteza hasta emerger de la epidermis del tallo, se forma un sistema vascular en la nueva raíz y se fusiona a los tejidos vasculares del tallo, una vez llegado a éste punto ya no hay mayor respuesta a las auxinas (Azcon *et al.*, 1996).

### **Citoquininas:**

Algunas de las citoquininas más usadas son Zeatina, Kinetina y Benziladenina, se sintetizan en los meristemas apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en las frutas.

Se transportan en la planta por vía acropétala, desde el ápice de la raíz hasta los tallos, moviéndose a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema (Rojas 1993).

Las funciones a destacar de las citoquininas son:

1. Estimulan la división celular y el crecimiento.

2. Inhiben el desarrollo de raíces laterales.
3. Rompen la latencia de las yemas auxiliares.
4. Promueven la organogénesis en los callos celulares
5. Retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales.
6. Promueven la expansión celular en cotiledones y hojas.
7. Promueven el desarrollo de los cloroplastos.

Con la ayuda de las citoquininas, las células vegetales son transformadas en otro tipo de células específicas para formar un órgano en particular, ya sean raíces, hojas, flores o frutos, ya que cada uno tiene diferentes tipos de células. Estos eventos, no se realizan de manera exclusiva por las citoquininas, desde luego, sino que estas hormonas son las encargadas de causar el efecto diferenciación celular, de «dar la orden» y de dirigir el proceso, en el cual intervienen otras sustancias con las que las citoquininas realizan esta tarea conjuntamente. Sin las citoquininas, probablemente no habría diferenciación de órganos vegetales (Azcon *et al.*, 1996).

### **Estrés hídrico, Ácido Abscísico y Polietilénol**

El estrés es considerado una desviación significativa de las condiciones óptimas de vida, que induce cambios que en primera instancia son reversibles, pero también pueden ser permanentes.

El estrés hídrico desencadena una serie de respuestas tales como la biosíntesis de metabolitos secundarios y la activación simultánea de la síntesis de proteínas específicas denominadas de estrés, hasta cambios en el desarrollo y/o reproducción de las plantas.

Ejerce efectos profundos sobre el crecimiento, el rendimiento y la calidad de la planta. El primer efecto es la pérdida de turgencia, la que afecta la elongación

del tallo, la expansión foliar, la apertura estomática y finalmente se ocasiona un decremento en la tasa de crecimiento (Hale y Orcutt, 1987).

Se presentan algunos cambios fisiológicos en la planta como respuesta a la sequía: un incremento en los niveles de ácido abscísico, el cierre de estomas y cambios en la osmolaridad celular. También, como respuesta al estrés hídrico, se tiene la acumulación de solutos compatibles, como las betaínas, la prolina, los polioles (manitol, sorbitol y pinitol); actúan como osmolitos citoplásmicos en el ajuste osmótico, no obstante, pueden desempeñar otras funciones como el mantenimiento de la estabilidad de las macromoléculas y las membranas (Hale y Orcutt, 1987).

Bajo esta condición, la síntesis de proteínas en los tejidos vegetales también sufre efectos profundos; en algunos casos hay reducción en la síntesis de proteínas totales y una disociación de ribosomas, y en otros la síntesis de proteínas las que se acumulan como respuesta a estas condiciones de deshidratación celular considerándose como moléculas que proveen a la planta de mecanismos osmoprotectores.

### **Ácido Abscísico (ABA)**

Este regulador de crecimiento vegetal cumple importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas; cuyos efectos son especialmente inhibidores, y se distribuye preferentemente en hojas, yemas, tubérculos, semillas y frutos. Es una sustancia química de la familia de los terpenoides. También se conoce con el nombre de hormona del estrés y antiguamente como abscisina y dormina.

El ABA juega roles regulatorios en la iniciación y mantenimiento de la dormancia de semillas y botones florales, y en la respuesta de las plantas al estrés. Influye en otros aspectos del desarrollo vegetal por interacción, usualmente como antagonista, con auxinas, citocininas y giberelinas, además promueve el cierre de los estomas como respuesta al estrés hídrico.

El rol de la acumulación de ABA en el control estomático de la transpiración, es el mejor ejemplo de la adaptación mediada por hormonas para cambios ambientales. Algunas plantas tienen la capacidad de sintetizar rápidamente gran cantidad de ABA, como respuesta a la desecación, por ejemplo las mesófitas; esta rapidez de inducción sugiere que éste se encuentra involucrado en respuestas al estrés de tiempo corto y también en la transducción de sus señales, ya que cuando se aplica ABA, se dispara la síntesis de polipéptidos que también se inducen como una respuesta rápida al estrés hídrico.

### **Polietilenglicol (PEG)**

Poliéter, capaz de competir con las células por el agua debido a su alto peso molecular, lo cual facilita la retención del líquido y provoca de esta forma un estrés osmótico.

Aunque el PEG es soluble en agua, al variar la temperatura de la disolución, se pueden formar fases ricas en polímeros y pobres en éste. Esto se debe a los grupos hidrofóbicos de metileno a lo largo de la cadena de polímero intercalados con los grupos hidrofílicos éter o alcohol.

En las aplicaciones químicas, el PEG actúa como co-disolvente y proporciona una aparente disminución de polaridad en la disolución, lo cual dirige al incremento en la solubilidad de moléculas orgánicas.

Se ha utilizado exitosamente el PEG como agente osmótico en cultivos *in vitro* y se ha probado que es un inductor del estrés hídrico (Chen *et al.*, 2005).

### **Métodos de extracción**

Existen varios métodos de extracción de aceites esenciales y compuestos aromáticos, entre ellos la extracción usando disolventes, destilación por arrastre de vapor, hidrodestilación, etc. El idóneo es aquel que permita extraer la mayor cantidad posible de compuestos; no siempre es posible, debido a las cantidades

tan pequeñas de los compuestos que se encuentran en la planta. La elección del método depende de la cantidad y características del aceite que se desea obtener, así como la cantidad de materia vegetal con la que se disponga (Gascon y Pelayes, 2002).

**Cuadro 2.1** Comparación entre los principales métodos de extracción de aceites esenciales.

<b>Método de extracción</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>
<b>Destilación por arrastre de vapor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Método industrial y de laboratorio.</li> <li>- Buenos resultados en aceite extraído.</li> <li>-Bajo costo</li> <li>-Tecnología no sofisticada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Procesos colaterales como polimerización y resinificación de los terpenos.</li> <li>-Hidrólisis de los ésteres.</li> <li>-Destrucción térmica de algunos componentes.</li> </ul>
<b>Extracción con disolventes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Uso de temperaturas bajas.</li> <li>-No provoca termodestrucción ni alteración química de los componentes del aceite.</li> <li>-Posibilidad de separación de los componentes individuales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Contaminante del ambiente.</li> <li>-Co-extracción de ceras y pigmentos.</li> <li>-Riesgo en el uso de algunos disolventes.</li> </ul>
<b>Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Alto rendimiento.</li> <li>-Ecológicamente limpio</li> <li>-Fácil retiro y reciclaje del disolvente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ácidos grasos, pigmentos y ceras pueden ser extraídos junto con el aceite esencial.</li> <li>-Altos costos de inversión.</li> </ul>

(Esquivel, 2002).

### ***Extracción usando disolventes***

En el proceso de extracción con disolventes, el factor más importante es la selección del disolvente, debe ser selectivo, ser químicamente inerte a los compuestos de interés, evaporarse completamente sin dejar cualquier residuo odorífero, ser de bajo costo, así como tener una polaridad a fin a los compuestos de interés. En éste método la muestra vegetal molida se pone en contacto con disolventes como alcohol, éter, cloroformo, hexano, entre otros, permitiendo realizar una extracción eficiente (Sánchez, 2006).

### ***Concentración de extractos***

El uso del rotavapor para el método de concentración de extractos es muy común, en este sistema, el vacío disminuye la presión y por lo tanto disminuye el punto de ebullición del disolvente que se desea evaporar. Y con ello existe menos posibilidad de que los compuestos volátiles de bajo punto de ebullición se evaporen con el disolvente. Permitiendo que el disolvente sea removido sin la necesidad de aplicar calor excesivo al sistema (Figmay, 2007).

### **Análisis de aceites esenciales.**

Los métodos analíticos para el estudio de aceites esenciales se basan principalmente en las características físico-químicas de los mismos, así como las características de sus componentes (Braithwaite, 1985).

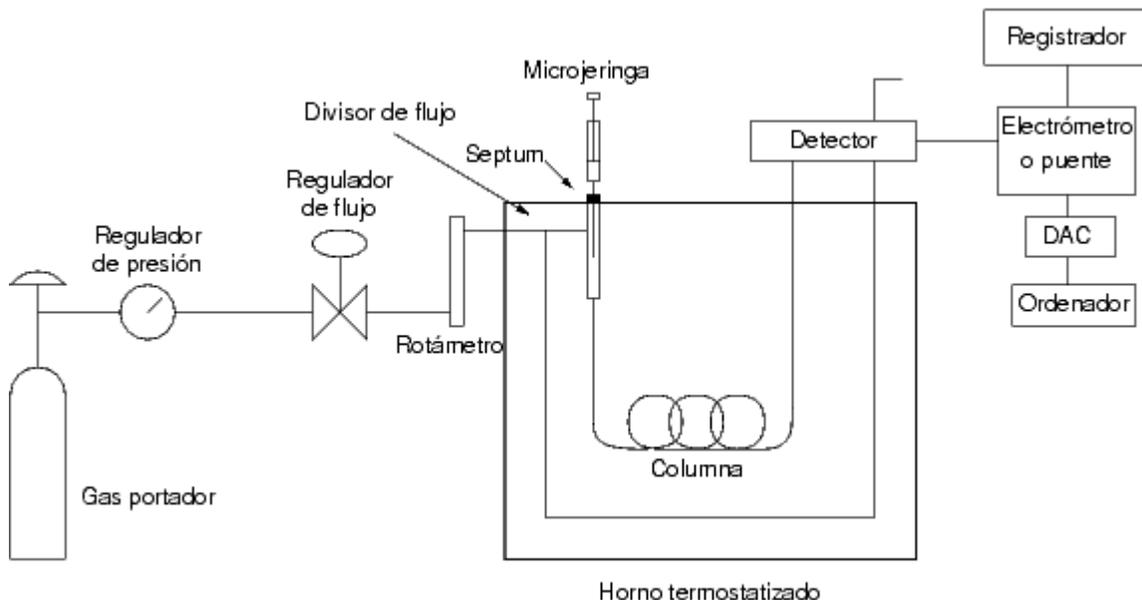
### ***Cromatografía***

La cromatografía es una técnica de separación muy potente, los compuestos químicos son separados en función de su diferente afinidad por una fase móvil y una fase estacionaria. Existen variantes en función a la naturaleza de dichas fases, cromatografía de columna, cromatografía de capa fina, cromatografía de gases GC, cromatografía de líquidos LC, etc. (Braithwaite, 1985).

## **Cromatografía de gases (GC)**

La cromatografía de gases, es una técnica instrumental de separación de mezclas volátiles en el cual los componentes de la misma se reparten en dos fases: la estacionaria (columna cromatográfica) que posee una superficie de exposición muy amplia y la otra, la fase móvil, es un gas que circula en contacto con la fase estacionaria produciéndose la separación de la mezcla. La muestra se evapora en el sistema de inyección y es transformada por la fase móvil o gas portadora través de la columna (Turko *et al.*, 2007).

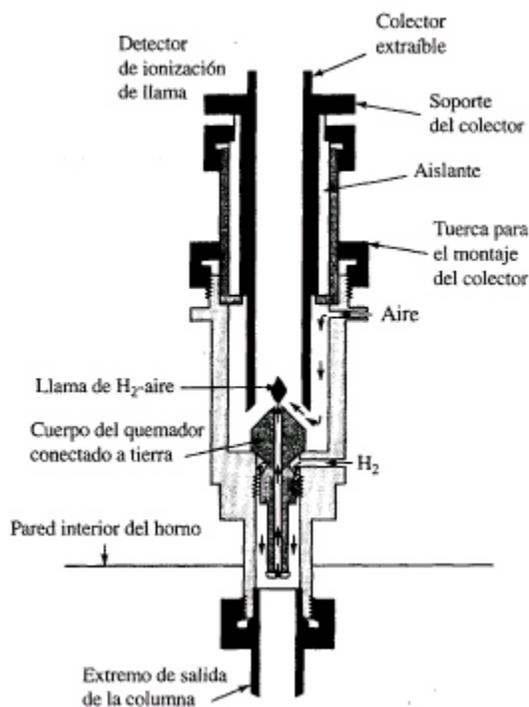
La repartición de componentes de la muestra con la fase estacionaria está basada en las diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada, los componentes de las mezclas (solutos o analitos) se separan entre sí con base a sus presiones de vapor relativas y afinidades con la fase estacionaria (Dellacsa, 2002).



**Figura 2.3** Esquema general de un cromatógrafo de gases (Dellacsa, 2002).

## Detector de ionización de flama (FID)

Es probablemente el detector más popular. La combustión de la muestra en una flama de hidrógeno/ aire produce iones que se recogen y se convierten en una corriente. Responde a la mayoría de los compuestos orgánicos. El FID es más sensible que el detector de conductividad térmica por ejemplo, ya que detecta casi cualquier compuesto orgánico (Figura 2.4).



**Figura 2.4** Esquema de un detector de ionización de flama (FID) (Repositorio de la Universidad de Alicante).

## HIPÓTESIS

Se sabe que la producción de metabolitos secundarios (como lo son los aceites esenciales) se producen ante condiciones de estrés ambiental, por lo cual se espera que las plantas cultivadas *in vitro* produzcan una cantidad menor de aceites con respecto a las plantas silvestres, puesto que no crecen bajo ningún tipo de estrés. Por esta misma razón, al simular una situación de estrés en el cultivo *in vitro*, se espera una inducción en la producción de aceites. Se espera lograr un shock osmótico por medio de la adición de Polietilenglicol y al añadir ABA simular la condición interna de la planta como cuando se encuentra en estrés, esperando obtener una producción de aceites esenciales{ XE "aceites esenciales" } en tejidos *in vitro* con la presencia de timol y carvacrol en mayor cantidad que aquellos que no estuvieron en presencia de Polietilenglicol y ABA.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la producción del aceite esencial de orégano cultivado *in vitro* y comparar el contenido de aceite con el orégano silvestre.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Definir un protocolo de propagación *in vitro* del orégano aplicando tratamientos de inducción para la producción de aceites.
- 2) Evaluar el efecto de la adición exógena de ABA y PEG como factores relacionados con estrés hídrico sobre la producción de aceites.
- 3) Comprobar si el orégano cultivado *in vitro* puede ser viable para la obtención de aceites esenciales como carvacrol y timol.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Obtención de semillas{ XE "recolección de semillas" }

La localidad de donde se extrajeron las muestras de semillas de *Lippia graveolens* para realizar el cultivo *in vitro* correspondió a una población en San Juan Raya, Zapotitlán Salinas, Puebla (18° 18' 58" N y 97° 38' 04" O), a una altitud de 1750 m, con clima semiseco, con una precipitación media anual de 443.7 mm, principalmente en verano. La temperatura{ XE "temperatura" } media anual es de 18 °C. El orégano proveniente de esta localidad presenta un quimiotipo carvacrol, indicando que la localidad de San Juan Raya es de gran importancia comercial por su producción y quimiotipo (Ocampo 2005).



**Fig. 3.1** Sitio de muestreo de *Lippia graveolens*, San Juan Raya, Puebla.

Obtenidas las semillas, el siguiente paso fue la desinfección del material para evitar problemas de contaminación en el cultivo *in vitro*.

## **Desinfección de semillas**

El proceso de desinfección de semillas que se utilizó fue el siguiente:

1. Las semillas se sumergieron en una solución de Tween 20 (surfactante) y agua corriente. Se repitió la operación enjuagando muy bien.
2. Se sumergieron en alcohol al 70% por 1 minuto y se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril donde se utilizó cristalería esterilizada.
3. Se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 10% de 5 a 8 minutos, durante el tiempo de inmersión se agitó constantemente.
4. Se enjuagaron con agua destilada estéril.
5. Se sumergieron por 10 minutos en hipoclorito de sodio al 20% más unas gotas de Tween 20, donde también se utilizó agua destilada estéril para hacer las soluciones.
6. Se sumergieron en una solución de nitrato de plata al 1% de 5 a 10 minutos agitando constantemente
7. Se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

## **Inicio del cultivo in vitro**

Se utilizó el medio de cultivo{ XE "medio de cultivo" } basal MS (Murashige y Skoog, 1962) colocando en cada frasco 30 ml de medio esterilizados en una autoclave a 121 ° C (18 psi) por 15 minutos. En el medio de cultivo estéril se sembraron asépticamente 2 lotes de 50 semillas provenientes de San Juan Raya, el primer lote con semillas recién colectadas y el segundo lote con semillas almacenadas por 2 meses.

Se colocaron tres semillas de *Lippia graveolens* en cada frasco en una campana de flujo laminar previamente desinfectada y se incubaron en cámaras de crecimiento (Lab Line Biotronette serie 798-001) a una temperatura de 26 ± °C bajo un flujo total de fotones de de 120-130  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provista de lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 12 horas. Con estos lotes de semillas se llevaron a cabo las pruebas de germinación, donde se utilizó el método descriptivo

de registro del número final de semillas germinadas o porcentaje de germinación, observando los lotes cada 2 días, se consideró arbitrariamente que una semilla había germinado cuando la radícula había emergido y rebasaba el tamaño de la semilla, se determinó del total de semillas cultivadas en los frascos, cuántas de ellas germinaron, obteniendo el porcentaje de germinación de cada lote (semillas almacenadas y recién cortadas) determinando el promedio entre ambos.



**Fig. 3.2** Medio MS para inicio de cultivo *in vitro*

Las plántulas derivadas de las pruebas de germinación se destinaron para la obtención de explantes para las pruebas de multiplicación de brotes y la estandarización del protocolo de extracción y evaluación de aceites

### **Tratamientos hormonales para la multiplicación de brotes**

Se hizo un diseño factorial 4x4 que permitió la designación de tratamientos combinando todas las concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal. Se designaron 16 tratamientos distintos con 5 repeticiones, cada repetición consta de 1 frasco con 3 explantes cada uno, que incluye las siguientes concentraciones hormonales:

- Citoquininas: BA (Benzil-adenina): 0, 3.5 nM, 4.5 nM y 5.5 nM

- Auxinas: NAA (Acido naftalen-acetico) : 0, 44  $\mu$ M, 54  $\mu$ M y 64  $\mu$ M

**Cuadro 3.1** Tratamientos para la multiplicación de brotes

NAA nM / l	BA $\mu$ M / l			
	0	3.5	4.5	5.5
0	Trat.1	Trat.2	Trat.3	Trat.4
44	Trat.5	Trat.6	Trat.7	Trat.8
54	Trat.9	Trat.10	Trat.11	Trat.12
64	Trat.13	Trat.14	Trat.15	Trat.16

- Se utilizó medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al cual se le agregaron las concentraciones de hormonas especificadas en el Cuadro 3.1 además de 100 mg de myo-inositol, 1mg/L de tiamina, 0.5 mg/L de acido nicotínico y 0.5 mg/L de piridoxina.
- Se distribuyó cada tratamiento en frascos de cultivo se etiquetaron y se esterilizaron como se describió previamente.

Se utilizaron las plántulas de 2 meses de edad, de un tamaño aproximado de 15cm, obtenidas de las pruebas de germinación de las cuales se tomaron 3 explantes de 5cm cada una, las cuales fueron sembrados en una campana de flujo laminar previamente desinfectada y se incubaron en cámaras de crecimiento (Lab Line Biotronette serie 798-001) a una temperatura de  $26 \pm ^\circ\text{C}$  bajo un flujo total de fotones de de 120-130  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provista de lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 12 horas.

Se evaluó por un mes la proliferación de brotes nuevos, cuantificando el número de brotes por explante en cada tratamiento, los datos obtenidos fueron evaluados mediante una prueba de ANOVA y Tukey en el programa SPSS 17.0

Los brotes nuevos obtenidos se subcultivaron en un medio libre de hormonas durante un mes antes de someter las plantas a nuevos tratamientos para la inducción de estrés hídrico.

### **Establecimiento de tratamientos para la inducción de estrés hídrico**

#### **Tratamientos con ácido absícico**

Se designaron cuatro tratamientos con distintas concentraciones de ABA, se realizaron cinco repeticiones, cada repetición consta de un frasco con tres explantes cada uno.

**Cuadro 3.2** Tratamientos a base de ácido absícico para la inducción al estrés hídrico.

	<b>TRATAMIENTOS</b>			
	<b>T<sub>c</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
<b>Concentración de ABA (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0	1	10	100
	5	5	5	5
<b>Repeticiones</b>				

### Tratamientos con Polietilenglicol

Se designaron cuatro tratamientos distintos, con tres concentraciones diferentes de Polietilenglicol con cinco repeticiones, cada repetición consta de un frasco con tres explantes cada uno.

**Cuadro 3.3** Tratamientos a base de Polietilenglicol para inducción de estrés hídrico

<b>TRATAMIENTOS</b>				
	<b>T<sub>c</sub></b>	<b>T<sub>1</sub></b>	<b>T<sub>2</sub></b>	<b>T<sub>3</sub></b>
<b>Concentración de PEG %</b>	0	5	7.5	10
<b>Repeticiones</b>	5	5	5	5

Se utilizó medio MS (Murashige y Skoog, 1962) al cual se agregaron las concentraciones de hormonas especificadas en la Tabla 1 utilizando el mismo procedimiento ya mencionado anteriormente de desinfección y cultivo.

Se utilizaron las plantas que fueron sometidas a los tratamientos hormonales para la multiplicación de brotes, de un tamaño aproximado de 15 cm, fueron subcultivadas en medio MS basal libre de hormonas durante un mes, se incubaron en cámaras de crecimiento (Lab Line Biotronette serie 798-001) a una temperatura de  $26 \pm ^\circ\text{C}$  bajo un flujo total de fotones de de 120-130  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  provista de lámparas fluorescentes, con un fotoperiodo de 12 horas durante 1 mes. Pasado este tiempo, se tomaron muestras, es decir, hojas de las plantas bajo los tratamientos de inducción de estrés, y se llevaron a cabo las pruebas de pérdida de electrolitos (conductividad eléctrica relativa) para determinar si se logró

la inducción al estrés hídrico, después la obtención de los extractos hexánicos para determinar la cantidad y presencia de compuestos que se obtienen del orégano sometido a inducción de estrés hídrico y del orégano silvestre, por medio de la cromatografía de gases (FID).

### **Perdida de electrolitos (conductividad eléctrica relativa)**

Basados en las técnicas de Marcum (1998), Blum y Ebercon (1981) y Earnshawn (1993) se determinó la tolerancia celular al estrés hídrico por medio de la medición de la pérdida de electrolitos de la siguiente manera:

Se tomó una hoja por triplicado de cada tratamiento y se enjuagaron tres veces con agua desionizada un min cada vez. Las hojas fueron colocadas en tubos de ensayo que contenían 20 ml de agua desionizada por 72 horas a temperatura ambiente.

Se midió la conductividad eléctrica del agua con un conductímetro (Oakton, modelo WD- 35607-00). Se colocaron los tubos en la autoclave a 110 -120 °C y 15 Psi por 15 minutos, para provocar la lisis celular. Se dejaron enfriar y se volvió a medir la conductividad eléctrica del agua.

Se calculó la conductividad eléctrica relativa (CER) a partir de la siguiente fórmula:

$$\mathbf{CER = (CEi / CEf) * 100}$$

Donde **CEi** es la conductividad eléctrica inicial y **CEf** es la conductividad eléctrica final.



**Figura 3.3** Imagen de un conductímetro (Oakton, modelo WD- 35607-00).

### **Obtención de extractos hexánicos**

Para llevar a cabo la extracción de los compuestos volátiles, se tomaron 2g de orégano de cada tratamiento de inducción al estrés hídrico, una muestra de orégano silvestre y una control sin hormonas ni inducción al estrés hídrico, en 20 ml de hexano (fermont) se maceraron y se dejaron reposar 48 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el material sólido utilizando papel filtro y se concentró en un rotavapor (Brickman mod. Bunchi 461). Se almacenó cada extracto en viales con capacidad de 5 ml a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 3.4** Imagen rotavapor

**Análisis de cromatografía { XE "cromatografía" }**

Para la separación de compuestos volátiles se empleó el programa tiempo temperatura mostrado en el cuadro 3.4 con los parámetros del cuadro 3.5, obteniéndose al final un tiempo de corrida de 37.57 min.

**Cuadro 3.4** Programa de temperatura utilizado en GC (FID)

<b>TEMPERATURA</b>	<b>INCREMENTO</b>	<b>TIEMPO DE SOSTENIMIENTO</b>
<b>C</b>	<b>(C/min)</b>	<b>(min)</b>
50	---	1
180	7	3
220	5	3
220	---	4 (post run)

**Cuadro 3.5** Condiciones cromatográficas utilizadas en GC (FID)

<b>CONDICIONES</b>	<b>GC- MS</b>	<b>GC-0 (FID)</b>
Temperatura del inyector (C)	200	200
Temperatura del detector (C)	250	250
Modo de inyección	Splitless	Splitless
Volumen de la muestra inyectada ( $\mu$ l)	1	1
Gas acarreador	He	He

### **Identificación de compuestos volátiles.**

Los compuestos de orégano extraídos con hexano se separaron utilizando un cromatógrafo de gases 6890N (Agilent Technologies) con detector de ionización de flama (FID).

Las muestras de aceite que fueron comparadas son:

- 1) Muestra de orégano silvestre
- 2) Muestra de orégano cultivado in vitro, sin tratamiento de inducción al estrés hídrico.
- 3) Muestras de orégano con tratamientos de inducción al estrés hídrico.

Para determinar la concentración de los componentes presentes en la muestra por medio de GC (FID), se emplearon estándares de timol, carvacrol y p-cimeno, se obtuvo una relación lineal entre la razón de las áreas y la concentración del analito. El análisis se efectuó de la siguiente manera: se preparó una solución de concentración conocida tanto del estándar, como del

analito, lo que permitió obtener una relación entre ambas concentraciones y así conocer la concentración relativa del estándar dentro de la solución problema. Una vez conocidos estos datos, así como las áreas del compuesto de interés y de los estándares proporcionados por el cromatograma, se procedió a calcular la concentración de los compuestos de interés, de la siguiente manera:

$$C_x = \frac{A_x C_I}{A_I}$$

Donde:

$C_x$  = Concentración del compuesto de interés

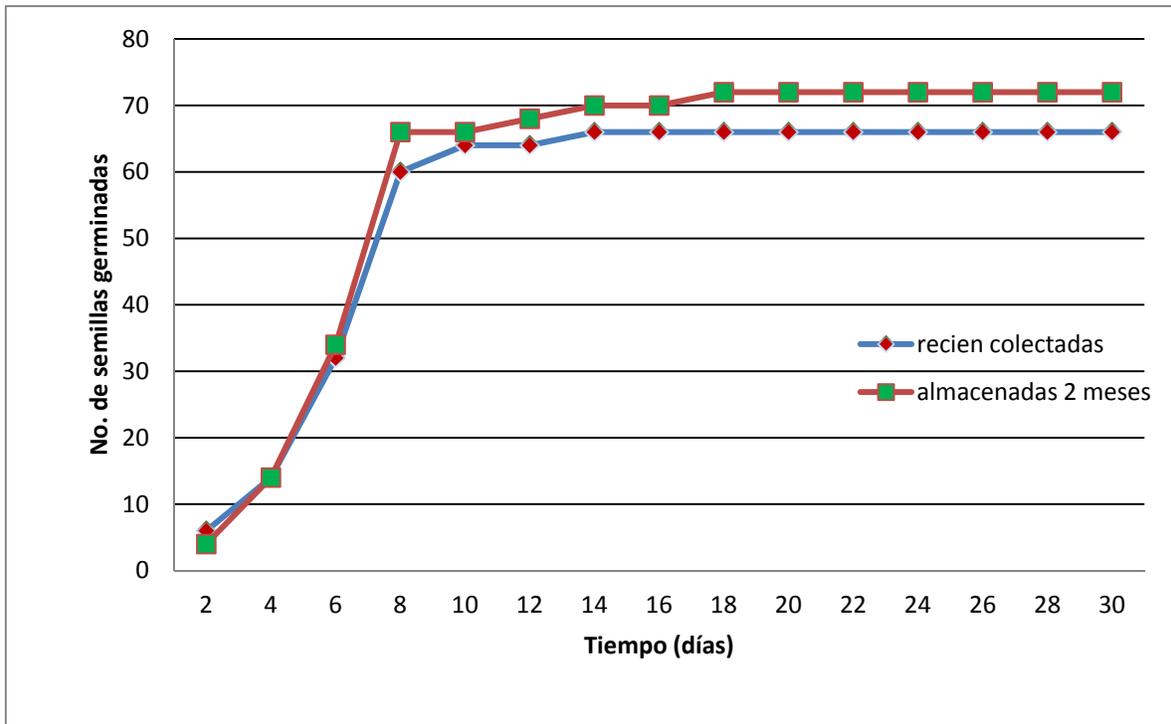
$A_x$  = Área del compuesto de interés

$C_I$  = Concentración del estándar interno

$A_I$  = área del estándar interno

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Porcentaje de germinación



**Figura 4.1** Semillas recién colectadas y almacenadas durante dos meses.

Podemos observar que con el lote de las semillas recién colectadas se obtuvo un porcentaje de germinación de 66%, mientras que las semillas almacenadas por dos meses exhibieron un mayor porcentaje 72%, lo que nos indica que las semillas colectadas tienen un buen porcentaje de germinación

Es importante mencionar que el mayor porcentaje de semillas germinadas se presentó los primeros ocho días, después de estos días muy pocas semillas germinaron.

## Multiplicación de brotes

**Cuadro 4.1** Número de brotes obtenido por cada tratamiento utilizado con las distintas combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción a la multiplicación de brotes

NAA nM / l	BA $\mu$ M / l			
	0	3.5	4.5	5.5
0	6	0	4	4
44	0	13	3	8
54	6	19	25	17
64	4	2	3	8

Como se puede observar en el cuadro 4.1 los tratamientos con los cuales se obtuvieron el mayor número de brotes fueron  $T_6= 44\text{nM NAA}/3.5 \mu\text{M BA}$   $T_{10}= 54\text{nM NAA}/3.5 \mu\text{M BA}$   $T_{11}= 54\text{nM NAA}/4.5 \mu\text{M BA}$   $T_{12}= 54\text{nM NAA}/5.5 \mu\text{M BA}$ . Coincidiendo con lo reportado por Pereira (2005) quien desarrolló un protocolo de micropropagación para *Lippia filifolia* con explantes, siendo la combinación de concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal más exitosa la de  $4.5 \mu\text{M}$  de BA y  $54 \text{ nM}$  de NAA, obteniendo con esta combinación 27 brotes.

**Cuadro 4.2** Análisis de varianza de los tratamientos utilizados en la inducción de multiplicación de brotes

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	P
Inter-grupos	156.750	15	10.450	4.737	.000
Intra-grupos	141.200	64	2.206		
Total	297.950	79			

En el cuadro 4.2 se observa por el valor de ( $P < 0.05$ ) obtenido en el análisis de varianza, que hay diferencias significativa entre los tratamientos de

multiplicación de brotes por lo que se procedió a hacer un análisis de Tukey en el programa estadístico SPSS 17.0

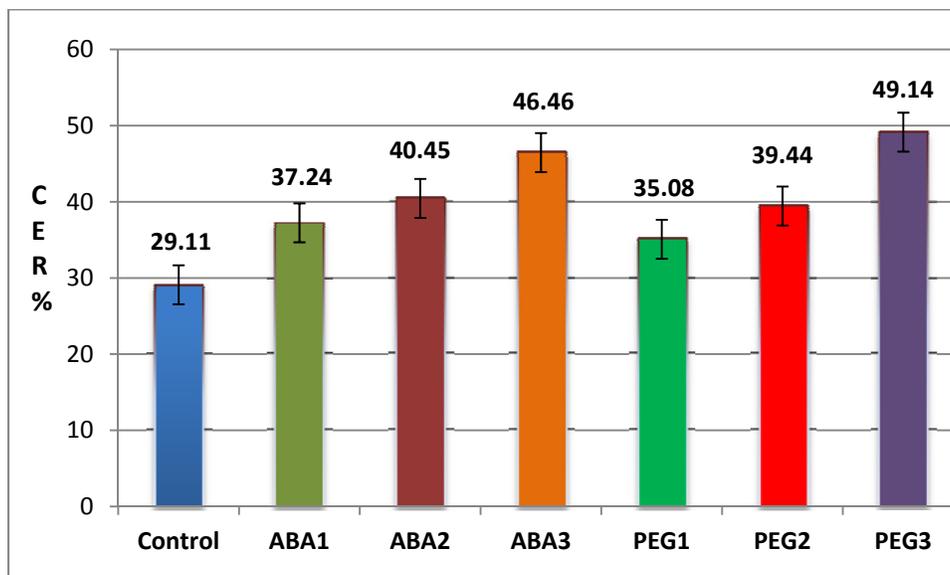
**Cuadro 4.3** Prueba de Tukey con un  $\alpha= 0.05$  para las medias de los tratamientos de multiplicación de brotes, medias en diferentes columnas muestran diferencias significativas.

TRATAMIENTO	NAA nM/ BA $\mu\text{M/l}$	a	b	c	d
2	0-3.5	.0			
5	44-0	.0			
14	64-3.5	.40	.40		
7	44-4.5	.60	.60	.60	
15	64-4.5	.60	.60	.60	
3	0-4.5	.80	.80	.80	
4	0-5.5	.80	.80	.80	
13	64-0	.80	.80	.80	
1	0-0	1.2	1.2	1.2	
9	54-0	1.2	1.2	1.2	
8	44-5.5	1.6	1.6	1.6	
16	64-5.5	1.6	1.6	1.6	
6	44-3.5	2.6	2.6	2.6	2.6
12	54-5.5		3.4	3.4	3.4
10	54-3.5			3.8	3.8
11	54-4.5				5

HSD TUKEY

La combinación de BA 54  $\mu\text{M/l}$  /NAA 4.5 nm /l, produce un máximo de 25 brotes, mientras que los tratamientos utilizados por separado, reducen el número de brotes, resultados similares se observaron en *Lippia junelliana* y *Lippia alba* (Gupta *et al.*, 2001) y (Juliani *et al.*, 1999).

## Conductividad Eléctrica Relativa



**Figura 4.2** Pérdida de electrolitos (CER %) en los tratamientos de inducción de estrés hídrico y el control.

Se hizo una prueba de ANDEVA para los datos de pérdida de electrolitos en los tratamientos utilizados arrojándonos los siguientes resultados.

**Cuadro 4.4** Análisis de varianza para la pérdida de electrolitos en los tratamientos de inducción al estrés hídrico.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	P
Inter-grupos	853.69	6	142.28	64.84	<b>.00</b>
Intra-grupos	30.71	14	2.19		
Total	884.41	20			

Se observó en el Cuadro 4.4, por el valor de ( $P < 0.05$ ) obtenido en el análisis de varianza, que hay diferencias significativas entre los tratamientos a la

inducción de estrés hídrico por lo que se procedió a hacer un análisis de Tukey en el programa estadístico SPSS 17.0.

**Cuadro 4.5** Prueba de Tukey  $\alpha= 0.05$  para pérdida de electrolitos en los tratamientos a la inducción de estrés hídrico. Medias en diferentes columnas muestran diferencias significativas.

TRATAMIENTO	a	b	c	d
Control	28.66			
PEG 1		35.08		
ABA 1		37.24	37.24	
PEG 2			39.44	
ABA 2			40.45	
ABA 3				46.46
PEG 3				49.14

En cuanto a la pérdida de electrolitos, expresado como conductividad eléctrica relativa (CER, figura 4.3) se observa que la pérdida de electrolitos es menor en el control (29.11 %) mientras que el tratamiento PEG 3 fue el de mayor pérdida (49.14%), seguido por ABA 3 (46.46 %), y ABA 2 (40.45 %). Los porcentajes más altos reflejan el estrés en estas plantas a comparación de los otros tratamientos.

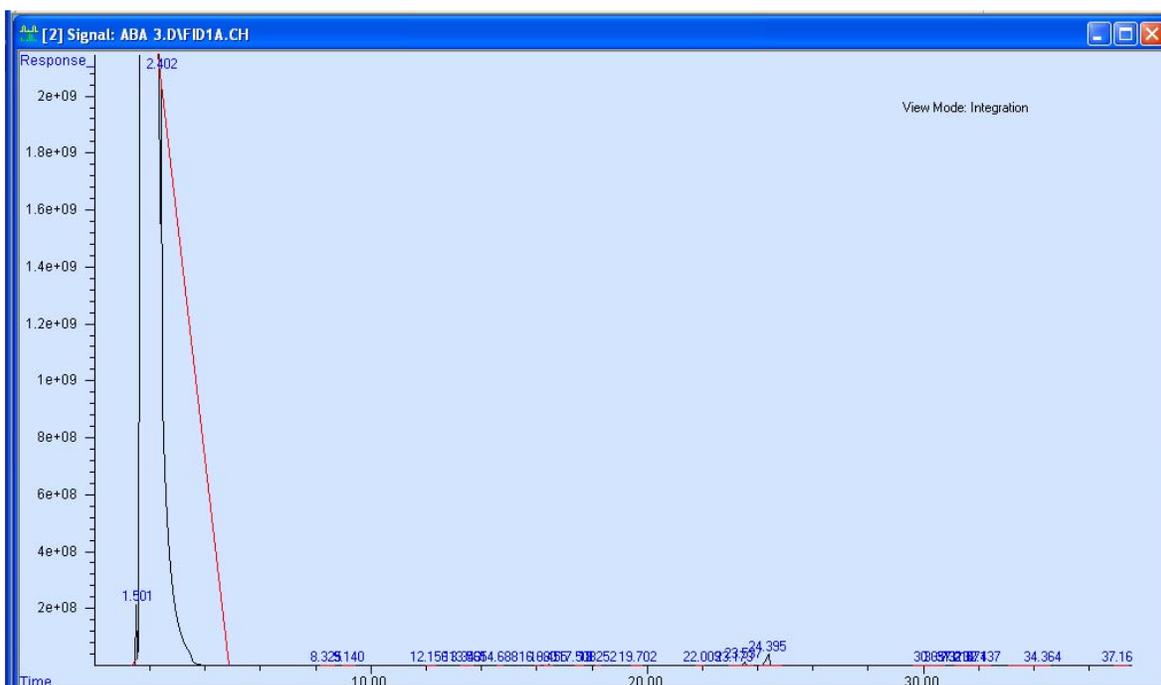
Todo esto dado por el proceso de ósmosis o potencial osmótico, en donde la cantidad de agua en una célula está determinada por la cantidad de electrolitos o sales disueltas en el citoplasma. Si esta condición se ve afectada por el estrés hídrico la célula evitará liberar sales, oponiendo resistencia en la membrana. Ya que la conductividad eléctrica es un indicador de la resistencia en la sequía (Villar-Salvador, 1997), por lo que a mayor porcentaje de pérdida de electrolitos se puede decir que más estresada esta planta.

Determinadas estas condiciones, de los seis tratamientos de inducción al estrés hídrico más una muestra control fueron analizados con cromatografía de gases (FID) para determinar la concentración de los compuestos de timol,

carvacrol y p-cimeno como respuesta a la inducción al estrés hídrico, donde se encontró que efectivamente los tratamientos indujeron a un estrés hídrico en las plantas *in vitro*.

### Identificación de compuestos volátiles.

En la Figura 4.3 se muestra uno de los cromatogramas obtenido del análisis de la muestra ABA 3, se utilizó hexano como disolvente, para cada tratamiento y para cada estándar interno se obtuvo un cromatograma como el presentado a continuación, de los cuales se obtuvieron, los tiempos de retención y las áreas de los picos para obtener las concentraciones de cada compuesto en cada tratamiento.



**Fig. 4.3** Cromatograma para la muestra ABA 3, obtenido con GC (FID) utilizando hexano como disolvente

**Cuadro 4.6** Tiempos de retención y magnitudes de las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos de los compuestos estándar utilizados en el cromatografía de gases (FID)

<b>Compuesto estándar</b>	<b>Concentración (µL/mL)</b>	<b>TR (min)</b>	<b>Área bajo la curva</b>
p-cimeno	1	9.529	6429878638
Timol	1	24.456	20260071350
Carvacrol	1	24.912	3774151639

En el Cuadro 4.7 se muestra el resultado de las concentraciones en µL/mL de timol, carvacrol y p-cimeno determinadas por cromatografía de gases (FID) por separado de cada tratamiento.

**Cuadro 4.7** Concentraciones en (µL/ mL) de p-cimeno, timol y carvacrol encontrados en cada uno de los tratamientos de inducción al estrés hídrico, así como a la muestra control y a la muestra de orégano silvestre.

<b>Tratamiento</b>	<b>p-cimeno (µL/ mL)</b>	<b>Timol (µL/ mL)</b>	<b>Carvacrol (µL/ mL)</b>
Control	0.0015	0.0016	---
ABA1	0.0026	0.1462	---
ABA2	0.0087	0.0268	<b>0.0153</b>
ABA3	0.0072	0.0215	<b>0.0243</b>
PEG1	<b>0.1258</b>	<b>0.2678</b>	---
PEG2	<b>0.1208</b>	<b>0.3297</b>	---
PEG3	0.0925	<b>0.5657</b>	---
<b>OR-SIL</b>	<b>0.4922</b>	<b>0.9202</b>	<b>0.0225</b>

Podemos observar en el Cuadro 4.7 que las concentraciones de p-cimeno y timol son muy bajas, no está presente el carvacrol en el extracto hexánico a base de orégano cultivado *in vitro* sin hormonas ni inducción al estrés hídrico (control), corroborando que es casi nula la producción de aceites al no someter a un estrés hídrico al cultivo. Las plantas que estuvieron sometidas a mayor estrés, fueron las que estuvieron bajo los tratamientos de ABA 2, ABA 3 y PEG 3; ABA 2 y ABA 3 fueron los únicos tratamientos que indujeron la producción de carvacrol y PEG 3 fue el tratamiento que indujo la mayor concentración de timol, seguido de PEG 2, PEG 1 y ABA1.

El tratamiento con PEG 3 presentó la mayor concentración de timol de las muestras (0.5657  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), que siendo comparado con la concentración de timol en el extracto de orégano silvestre de 0.9202  $\mu\text{L}/\text{mL}$  no es tan distante, en cuanto a p-cimeno PEG 1 (0.1258  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) y PEG 2 (0.1208  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) son los más cercanos a la concentración de timol en orégano silvestre (0.4922  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), con el compuesto carvacrol aun los tratamientos utilizados están distantes de tener una concentración similar a la del orégano silvestre.

Poco se conoce sobre lo que determina que las concentraciones de aceites esenciales se modifiquen en la planta, así como la gran diversidad de quimiotipos que se pueden encontrar en el país, por lo que se sugiere que se siga trabajando en la caracterización química del orégano. Poca investigación se ha inclinado a los cultivos *in vitro* de esta planta por lo que también es recomendable seguir con estos estudios a escala laboratorio aprovechando que se cuenta con la facilidad de manipulación de los factores que en el medio ambiente natural es imposible.

Cabe mencionar que aunque se logró inducir un estrés con el ABA y el PEG, y que esto provocó un incremento en la producción de aceites, el periodo en el que se aplicaron los tratamientos de inducción al estrés hídrico fue corto en tiempo. Valdría la pena estudiar el efecto de extender el período de fortalecimiento en condiciones de estrés en las plantas *in vitro*, para determinar si les dará tiempo de sintetizar más aceites.

## V. CONCLUSIONES

En este estudio se muestra que la combinación de las auxinas y citoquininas, benziladenina (BA) y ácido naftalenacético (NAA), en el medio de cultivo MS utilizado para la propagación de *Lippia graveolens* es una combinación exitosa para la multiplicación de brotes en contraste a la adición de una sola de estas hormonas al medio.

Se adicionó polietilenglicol (PEG) y ácido abscísico (ABA) como agentes estresantes en el medio de cultivo y se midió el estrés hídrico por medio del porcentaje de pérdida de electrolitos, teniendo como resultado que PEG provoca un mayor estrés hídrico en el medio de cultivo, teniendo un mayor porcentaje de pérdida (CER, 49.14 %), aunque también el ácido abscísico puede llegar a un porcentaje muy similar de pérdida de electrolitos (CER, 46.46 %), demostrando que ambos agentes provocan un estrés hídrico en la planta, cabe mencionar que la adición de una concentración mayor de 100  $\mu\text{m}$  de ABA, y 10% de PEG provoca daños irreversibles en la planta.

De las plantas sometidas a estrés hídrico, se obtuvieron extractos hexánicos de cada tratamiento, los cuales fueron analizados con un cromatógrafo de gases (FID) en donde se obtuvieron las concentraciones de p-cimeno, timol y carvacrol, siendo comparadas contra la muestra control y la muestra de orégano silvestre analizado por el mismo método, resultando que la muestra control posee la más baja concentración de p-cimeno y timol, además no se produce carvacrol, y es la muestra que menos porcentaje de pérdida de electrolitos presentó. Se llegó a la conclusión de que al aumentar el estrés hídrico de la planta la concentración de compuestos también aumenta, al hacer la comparación de las muestras sometidas a estrés hídrico contra la muestra control, podemos observar que hay diferencias significativas, mucho más marcadas para el compuesto timol.

Por otro lado las concentraciones obtenidas de los compuestos mencionados en el orégano silvestre, son aun más altas, aunque en cuanto a timol la diferencia obtenida entre la muestra de PEG 3, no es tan distante.

En general podemos concluir que el estrés hídrico es uno de los factores más determinantes en cuanto a la producción de aceites esenciales y que al inducir este factor a escala laboratorio en los cultivos *in vitro* por medio de agentes estresantes externos es posible inducir la producción de los mismos.

En el presente trabajo se enfocó principalmente al estudio de la producción de timol, carvacrol y p-cimeno, pero se sugiere ampliar la investigación determinando que otros compuestos están presentes en las muestras.

De igual manera se sugiere probar dosis cruzadas de los factores estresantes ABA y PEG para determinar si la combinación de ambos compuestos ayuda a alcanzar los niveles de producción que *Lippia graveolens* exhibe en condiciones de estrés natural o si existe una inhibición entre ellos.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Arcila C., Loarca P., Lecona Uribe S., González E. 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Órgano oficial de la sociedad latinoamericana de nutrición. 50(1): 101- 111
- Azcon J., y M. Talon. Madrid.(1996). Fisiología y bioquímica Vegetal. 1ra edición.
- Bautista, J., A. Hernández y C. Arias. 1990. Caracterización de la germinación de orégano *Lippia graveolens*, de cuatro diferentes procedencias del altiplano y zona media Potosina. Primera reunión nacional sobre el orégano. Bermejillo Dgo. Pp. 209-214.
- Cárdenas M., y Villegas A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Revista de Fitotecnia Mexicana, abril-junio año/vol. 25, número 002 Sociedad Mexicana de Fitotecnia, A.C, Chapingo México pp. 213-217.
- Carriles R. 1994. Propagación *In vitro* de Orégano (*Poliomintha longiflora* Gray). Tesis. Facultad de Agronomía, U.A.N.L. p. 50.
- Castillo, E. S. 1986. Aspectos entobotánicos y autoecológicos de *Poliomintha Longiflora* Gray en la ranchería Los Picos, municipio de Higuera, Nuevo León. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L. pp. 50.
- Cavazos D., J. R. 1991. «Análisis dimensionales de plantas de orégano (*Lippia berlandieri*) para la estimación de biomasa aérea», en: Meléndez G., R., S. A. Ortega R. y R. Peña R. (eds.). Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Unidad Regional de Zonas Áridas, Universidad Autónoma de Chapingo; Bermejillo, Durango, México.

- Chen, Jin; Spear, Scott; Huddleston, Jonathan; Rogers, Robin (2005).. Green Chemistry 7 (2) Pag. 64.
- Correll, D. S. y M. C. Johnston. 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Foundation; Renner. 1881 pp.
- Dewick P., 1997. Medicinal natural products, a biosynthetic approach. Journal Agriculture Food Chemistry; p. 4185-4192.
- Esquivel A. y Vargas P., 2002."Producción de extractos para industria alimentaria: uso de fluidos supercríticos". Boletín de biotecnología (73): p. 14-21
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la república mexicana) 2ª edición. UNAM. México. 246 p.
- Gascon A. y Pelayes M., 2002. Generalidades sobre los procesos extractivos utilizados en la obtención de aceites esenciales. Universidad Nacional de Cuyo Mendoza argentina. Facultad de Ciencias, Departamento de Química, p. 5-12.
- Gotsiu P., Naxakis G. y Skoula M., 2002. Diversity in the composition of monoterpenoides of *Origanum microphyllum* (Labiatae). Department of natural products, Mediterranean Agronomic Institute of Chania.P.O.Box 85, 73100 Chania Greece. p. 123-132.
- Gupta S. K., Khanuja, S. P. S.; Kumar, S. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. Curr. Sci. 81:206–210; 2001.
- Juliani, H. R. Jr.; Koroch, A. R.; Juliani, H. R.; Trippi, V. S. Micropropagation of *Lippia junelliana* (Mold.) Tronc. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 59:175–179; 1999.

- Gutiérrez E., 2007. Orégano recurso con alto potencial. Revista Ciencia y Desarrollo, Vol. 33, no. 201, p. 60-66.
- Hale, M.G. y D.M. Orcutt, 1987. The Physiology of Plants Under Stress. John Willey and Sons.
- Huerta C. 1997. Orégano mexicano: oro vegetal. Biodiversidad, 3(15): 8–13.
- Krikorian A. 1995. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (PJ Davies, ed.), pp.: 774-796. Kluwer Acad. Publ.Holanda.
- Lambert R.J., Skandamis P., Coote P., Nychas G., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Department of Food Science and Technology, Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Athens, Greece Journal of Applied Microbiology p. 453-462.
- Leite E., Montenegro T., Oliveira E., 2006. Sensitivity of spoiling and pathogen food related bacteria to *Origanum vulgare* (laminacea) essential oil. Brazilian Journal of Microbiology. Universidad federal de Pernambuco, p. 527-532.
- Marcum, K.B. Cell membrane thermostability and whole plant heat tolerance of Kentucky bluegrass. Crop Science. 38: 1214- 1218
- Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- Murashige, T.; Skoog, F. A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–497; 1962.
- Ocampo R. 2005. Caracterización de la biología reproductiva, establecimiento y crecimiento de *Lippia graveolens* Kunth y la producción de sus aceites esenciales en las poblaciones con y sin manejo. Tesis de la maestría en ciencias de los recursos bióticos de la facultad de ciencias naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- Oliver, G.W., 1996. The Word Marked of Oregano. IPGRI, Rome, Italy, pp: 141-145.
- Penuelas J., Llusia J. 1997. Effects of carbón dioxide, wáter supply, and seasonality on terpene content and emission by *Rosmarinus officinalis* . *Journal Chemical Ecology*. 23:979.
- Rojas Gardeñas M., (1993). Control hormonal del Desarrollo de las Plantas. Salisbury F/Ross. C (1994). *Fisiología Vegetal*. Editorial Iberoamericana. Sivory M./Caso 0 . (1980). *Fisiología Vegetal*. Editorial Hemisferio Sur.
- Sánchez F., 2006. Extracción de aceites esenciales. Congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas, Universidad Nacional de Colombia, p. 18-20.
- Triantaphyllou K., Blekas G y Boscou D., 2001. Antioxidative properties of water extracts obtains from herbs of the species *laminaceae*. Laboratory of Food Chemistry and Technology, Faculty of Chemistry, Aristotle Univessity of Thessaloniki, Greece. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, p. 313-317.

Turko A., Chernyak N., Kerimzhanova B., 2007. GC-MS research essential oil from *Stevia rebaudiana*. Chemistry of Natural Compounds vol. 43 p. 744-746.

#### FUENTES CONSULTADAS EN INTERNET

Braithwaite A y Smith, 1985. Métodos de obtención de aceites esenciales. Documento web.

<http://www.montes.upm.es/Dptos/DptoIngForestal/operacionesBasicas/Docencia/PDF/Temas/TEMAS.pdf>

Dellacsa E, 2002. Cromatografía de gases. Documento Web.

<http://www.uam.es/investigacion/servicios/sidi/especifica/croma.html>

Figmay, 2007. Evaporador Rotatorio escala laboratorio. Documento web.

[http://www.figmay.com.ar/evaporador\\_rotatorio\\_escala\\_laboratorio.htm](http://www.figmay.com.ar/evaporador_rotatorio_escala_laboratorio.htm)

RUA, Repositorio de la Universidad de Alicante.

<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8247/4/T3gascromat.pdf>



Nombre de archivo: TESIS\_FINAL\_ARELI.docx  
Directorio: C:\Users\GERARDO\Documents  
Plantilla: C:\Users\GERARDO\AppData\Roaming\Microsoft\Plantillas  
    \Normal.dotm  
Título:  
Asunto:  
Autor: Arelis  
Palabras clave:  
Comentarios:  
Fecha de creación: 01/11/2011 06:08:00 p.m.  
Cambio número: 224  
Guardado el: 04/03/2012 05:59:00 p.m.  
Guardado por: Arelis  
Tiempo de edición: 2,663 minutos  
Impreso el: 06/03/2012 11:26:00 a.m.  
Última impresión completa  
    Número de páginas: 61  
    Número de palabras: 10,935 (aprox.)  
    Número de caracteres: 60,148 (aprox.)