

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



**“DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *Lippia graveolens*
(Verbenaceae) PROCEDENTES DE LOS ESTADOS DE
QUERÉTARO, PUEBLA Y GUANAJUATO”**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN

BIOLOGÍA

PRESENTA

ALMA ARIADNA MARTÍNEZ ROCHA

DIRIGIDA POR

DR. LUIS GERARDO HERNÁNDEZ SANDOVAL

CENTRO UNIVERSITARIO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.- MÉXICO 2004

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq: 1469909

No. Título _____

Clas TS

583.96

M385d

21 2 3 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a la *Biol. Rosalía Ocampo*, por haberme proporcionado las muestras con las que se realizó este trabajo. A la *Dra. Dora Marina Gutiérrez A.*, *Dra. Mahinda Martínez* y *M. en C. Valentina Serrano C.*, por su colaboración dentro de esta tesis, por dedicarle un tiempo especial para revisar este trabajo.

Gracias a los Químicos *Germán González*, *Ma. Guadalupe García* y *Diana Arteaga*, por su valioso apoyo para completar este proyecto. A la *Dra. Flavia Loarca Piña*, por brindarme su apoyo para realizar parte de los experimentos en su laboratorio.

Dra. Sandra Mendoza D., por su paciencia para enseñarme el extraño mundo de la química, gracias por haberme dado gran parte de su tiempo y siempre brindarme un buen consejo. Gracias por apoyarme para concluir esta preparación.

Dr. Luis Hernández S., por su valiosa colaboración en esta tesis, que aunque esté por el camino erróneo de la vida (siendo Americanista), tengo la esperanza de que algún día pueda ver claro, y corregir este gran error. Gracias por toda la preparación que me brindaste durante toda la carrera, me ha sido de gran ayuda.

Dra. Edith Garay por estar siempre al pendiente de mí durante todo este tiempo. Gracias por compartir conmigo tus experiencias y mostrarme ese apasionado mundo celular.

"*Mamá*", quiero dedicarte este gran esfuerzo, por que gracias a ti pude cumplir un sueño, un sueño del cual eres parte. Recuerdo el día en que partí de casa y recuerdo el sentimiento que tuvimos en ese momento al iniciar este camino, pero ahora por fin lo hemos cumplido. Gracias por tu entrega y sacrificios, por tus enseñanzas de cómo ser una gran mujer y por tu apoyo incondicional. A mi "*hermana*", le agradezco el apoyo que siempre me ha brindado. Aunque fue largo el camino de esta aventura, creo que entre tu y yo se acortaron las distancias, te quiero mucho.

Quiero agradecerle a una persona que es y será especial para mí, gracias *Estuardo* por todos los momentos maravillosos que pasamos juntos. Espero que estos momentos se multipliquen y perdure éste sentimiento por mucho tiempo. Te amo.

A todos mis amigos, en especial a *Alejandro Dominguez* alias "Pumba" por las desesperantes tardes de trabajo y las gratificantes tardes de cine, pan y vino. No podría dejar de mencionar a mí mejor amiga, gracias "*Marika*" por estar siempre ahí. Al menos este año será diferente a los 6 anteriores.

De una manera muy especial, quisiera agradecer a *Gloria Castellanos* "*Yoyis*", por su amor y enseñanzas de la vida, donde quiera que yo este, siempre estarás en mi corazón. A *Isaac Rocha*, que aunque no puede despedirme de ti como hubiera deseado, quiero decirte, que muchas veces en las que mis ánimos estaban bajos, sólo tenía que recordarte, para tomar de ti, la entereza y valentía que mostrabas ante las circunstancias mas duras a las que estuviste expuesto. Donde quiera que estés...Te quiero. A toda mi familia por la ayuda que recibí para terminar mi tesis. Gracias a todos.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
II.1. Usos e importancia de <i>Lippia graveolens</i> (Verbenaceae).....	3
II.2. Generalidades sobre la especie en estudio <i>Lippia graveolens</i> Humb.; Bompl. & Kunth (Verbenaceae).....	5
A. Descripción.....	5
B. Distribución.....	7
C. Problemas taxonómicos.....	7
D. Estudios químicos y biológicos preliminares.....	12
II.3. Otros estudios realizados con <i>Lippia graveolens</i> y su importancia económica	14
III. HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVO GENERAL.....	19

V.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
VI.1.	Materiales.....	20
VI.2.	Métodos.....	23
A.	Estudio fenético.....	23
B.	Obtención del material botánico para el estudio químico.....	24
C.	Preparación de extractos.....	27
D.	Cromatografía de capa fina (CCF).....	27
E.	Determinación de fenoles totales y flavonoides.....	27
F.	Determinación del ácido rosmarinico.....	29
G.	Determinación de la actividad antioxidante.....	29
VII.	RESULTADOS.....	33
A.	Estudio fenotípico.....	33
B.	Cromatografía de capa fina (CCF).....	46
C.	Determinación de fenoles totales	49
D.	Determinación de flavonoides y ácido rosmarinico.....	51
E.	Determinación de la actividad antioxidante.....	52
VIII.	DISCUSIÓN.....	53
A.	Estudio fenotípico.....	53
B.	Cromatografía de capa fina (CCF).....	56
C.	Determinación de fenoles totales	56
D.	Determinación de flavonoides y del ácido rosmarinico.....	57

E. Determinación de la actividad antioxidante.....	59
IX. CONCLUSIONES.....	60
X. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1a. Estructuras químicas reportadas por Salgueiro <i>et al.</i> (2003) para <i>Lippia graveolens</i> . Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.....	15
1b. Estructuras químicas reportadas por Domínguez <i>et al.</i> (1998) para <i>Lippia graveolens</i> . Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.....	16
1c. Estructuras químicas reportadas por Rastrelli (1998), para <i>Lippia graveolens</i> . Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.....	17
1d. Continuación de las estructuras químicas reportadas por Rastrelli (1998), para <i>Lippia graveolens</i> . Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.....	18
2. Datos morfológicos para cada ejemplar junto con las unidades en las que se registraron.....	24
3. Localidades donde fueron colectadas las muestras.....	25
4. Diseño experimental para la determinación de la actividad antioxidante. P1= Puebla concentración 1; P2= Puebla concentración 2; P3= Puebla concentración 3; P4= Puebla concentración 4. Q1= Querétaro concentración 1; Q2= Querétaro concentración 2; Q3= Querétaro concentración 3; Q4= Querétaro concentración 4. G1= Guanajuato concentración 1; G2= Guanajuato concentración 2; G3= Guanajuato concentración 3; G4= Guanajuato concentración 4. T0.5 = TROLOX 0.5 µM,	

T1= TROLOX 100 μ M, T2= TROLOX 200 μ M, T3= TROLOX 300 μ M, T4= TROLOX 400 μ M, T5= TROLOX 500 μ M, T6= TROLOX 600 μ M, T7= TROLOX 700 μ M, T8= TROLOX 800 μ M. Nar= Naringenina.....32

5.a-f. Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.....33

6. Descripción de las claves utilizadas, para interpretar el dendrograma de la figura 13.....43

7. Resultados de los flavonoides y ácido rosmarinico.....51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lippia graveolens</i>. Fotografía Biol. Rosalía Ocampo.....	5
2. Mapa de distribución de <i>Lippia graveolens</i>, adaptado de Rzedowski y Calderón (2002).....	9
3. Mapa del estado de Querétaro, en donde el símbolo de una estrella color negro señala el municipio de Peñamiller. INEGI 2003.....	26
4. Área de colecta en el municipio de Peñamiller, Querétaro. Fotografía Biol. Rosalía Ocampo.....	26
5. Mapa del estado de Guanajuato, en donde el símbolo de una estrella color negro señala el municipio de Victoria. INEGI 2003.....	28
6. Área de colecta en la localidad de Salitrera, Victoria, Guanajuato. Fotografía Rosalía Ocampo.....	28
7. Mapa del estado de Puebla, en donde el símbolo de un círculo color amarillo señala el municipio de Zapotitlán Salinas. INEGI 2003.....	30
8. Área de colecta en la localidad de Zapotitlán Salinas, estado de Puebla. Fotografía Biol. Rosalía Ocampo.....	30
9. Distribución de <i>Lippia graveolens</i>, tomando los registros para el estudio fenético.....	38

Figura 10. Dendrograma a partir de los datos obtenidos para el estudio fenético, en el que se incluyen todos los estados registrados.....	40
11. Distancia (diferencias) entre los ejemplares, obtenidos en el dendrograma de la figura 10	41
12. Localidades de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato. Datos tomados de los registros para el estudio fenético.....	44
13. Dendrograma a partir de los datos obtenidos para el estudio fenético, de los estados de Puebla, Querétaro y Guanajuato.....	45
14. Distancia (diferencias) entre los ejemplares, obtenidos en el dendrograma de la figura 13.....	46
15. Cromatografía en capa fina. 1= Timol, 2= Ácido. rosmarínico, 3= Carvacol, 4= Extracto de <i>Lippia graveolens</i> del estado de Querétaro, 5= Extracto de <i>L. graveolens</i> del estado de Guanajuato, 6= Extracto de <i>L. graveolens</i> del estado de Puebla. El solvente utilizado para esta cromatoplaca fue el diclorometano.....	47
16. Cromatografía en capa fina. 1= Ácido rosmarinico, 2= Extracto de <i>Lippia graveolens</i> del estado de Querétaro, 3= Extracto de <i>L. graveolens</i> del estado Puebla, 4= Extracto de <i>L. graveolens</i> del estado de Guanajuato.	

El solvente utilizado para esta cromatoplaaca fue el diclorometano / metanol.....	48
17. Gráfica de los resultados de la cuantificación de los fenoles totales.....	49
18. Porcentajes de Fenoles totales por estado. A) Salitrera, Gto. 39.5%, B) Portugués, Qro. 41.4%, C) Alto Bonito, Qro.18.7%, D) San Juan Raya, Pue. 100%. INEGI.....	50
19. Actividad antirradical de extractos metanólicos, libres de aceite esencial, de orégano. Extracto de Puebla (P), extracto de Guanajuato (G), extracto de Querétaro (Q), p1,g1,q1= 1 mg/ml, p2,g2,q2 = 100 µg/ml, p3,g3,q3= 10 µg/ml, Naran= naringenina 1 mg/ml, BHT10 = 1 mg/ml.....	52

I. INTRODUCCIÓN

El orégano es una planta aromática con sabor característico, la mayoría de los oréganos pertenecen a la familia Lamiaceae y Verbenaceae. A nivel mundial se conocen dos tipos de orégano, el Mediterráneo (*Origanum* sp.) y el mexicano (*Lippia* sp.). El género *Lippia* Houtt (Verbenaceae) es el más conocido en México, consiste en aproximadamente 200 especies de las que se han examinado desde el punto de vista químico sólo 46. La especie más usada es *Lippia graveolens* Humb.; B. & Kunth o *L. berlandieri* L. (Kintzios, 2002). Actualmente se han determinado algunos problemas taxonómicos dentro de la familia Verbenaceae, un ejemplo de esto es el caso de *Lippia graveolens* ya que varios autores mencionan otras especies en sinonimia con ésta especie. Nash y Nee (1984) registran las siguientes especies dentro de *Lippia graveolens*, mostrando así, el problema taxonómico que existe dentro de ésta especie.

Lippia graveolens Humb.; B. & Kunth, Nov. Gen. Sp. 2:266.1818. Tipo: México, Campeche, *Humboldt & Bonpland s.n.*

Lantana origanoides Martens & Galeotti, Bull. Acad. Roy. Sci. Bruxelles 11(2):327. 1844. Tipo: México, *Galeotti 784.*

Lippia berlandieri Schauer, en DC., Prodr. 11:575. 1847. Sin tipos: México, Tamaulipas, between Santander and Victoria, *Berlandier 2252 (G)*; Oaxaca, *Andrieux 166 (B)*; San Bartolo, *Ehrenberg 720 (B)*.

Goniostachyum graveolens (Humb.; B. & Kunth) Small, Fl. Southeast. U.S. 1012. 1903.

La planta tiene, como uno de los principios activos, un aceite esencial de un olor intenso muy característico, cuyo componente principal es el carvacol (Maldonado, 1991), la mayoría de los reportes científicos se basan en estudios de estos aceites esenciales. De manera adicional se han aislado y caracterizado algunos metabolitos secundarios no volátiles como iridoides, fenilpropanoides, naftoquinoides y flavonoides (Catalan y Lampasona, 2002).

Los metabolitos secundarios se caracterizan por la gran heterogeneidad de su estructura química y su distribución restringida. Se forman gracias a la acción de enzimas codificadas por material genético especial. La expresión del metabolismo secundario, se entiende como un aspecto de especialización celular o bien de nueva formación de células especializadas por integración, en los programas de diferenciación y desarrollo del organismo productor. Existe una falta de continuidad filogenética en muchos de ellos. Aunque las rutas biogénicas de los metabolitos secundarios son bien documentadas poco se sabe acerca de la manera específica que actúan, de los factores más destacados que influyen sobre el metabolismo secundario, de los mecanismos moleculares que integran la biosíntesis de un producto secundario en los programas de diferenciación y desarrollo de un organismo (Orellana *et al.*, 1999).

Entre los principales metabolitos secundarios podemos citar: compuestos alifáticos, carbocíclicos y heterocíclicos, compuestos que contienen nitrógeno, fósforo y azufre, compuestos saturados e insaturados, glicósidos, péptidos, ácidos hidroxicinámicos, azometinas que contiene grupos funcionales diversos (hidroxilo, epóxidos, éster, éter, amino, nitro, carboxilo). En general, entre más reacciones químicas se necesiten para sintetizar un compuesto secundario, más restringida será su distribución geográfica (Orellana *et al.*, 1999).

La probabilidad de que una vía metabólica se desarrolle independientemente durante la evolución, en grupos diferentes de organismos, disminuye a medida que aumenta su complejidad. Por lo tanto, los metabolitos secundarios con estructuras químicas complicadas son importantes desde el punto de vista taxonómico. El efecto que los metabolitos secundarios tienen sobre la comunidad depende de su estructura química particular, las mezclas de los mismos, las condiciones físico-químicas del sustrato a través del cual actúan y la composición microbiológica y el clima. Existen diferentes factores que afectan la cantidad de metabolitos secundarios producidos por las plantas, como radiación (calidad de la luz, intensidad de la luz, foto período); edad, estado fenológico y

órgano de la planta; deficiencias minerales (nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, boro, calcio); temperatura; estrés hídrico; compuestos orgánicos; genética (Orellana *et al.*, 1999).

Entre los metabolitos secundarios podemos encontrar grupos de presencia y distribución más constante, se ha comprobado que el control genético es determinante y estos compuestos son más o menos específicos de ciertos grupos de plantas, por ejemplo, los terpenos abundan en las coníferas, los alcaloides en las ranunculáceas, los taninos en las fagáceas y los aceites esenciales en las labiadas (Orellana *et al.*, 1999).

El material con el que se trabajó dentro de este proyecto es un conjunto de plantas silvestres que se encuentran expuestas a diferentes cambios climáticos y de suelo. Estos cambios climáticos afectan la producción de metabolitos secundarios, por lo que existe un gran interés por determinar la cantidad y actividad biológica de los compuestos fenólicos de *Lippia graveolens* de diferentes regiones.

II. ANTECEDENTES

II.1 Usos e importancia de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth (Verbenaceae).

A nivel mundial se conocen dos tipos de orégano, el Mediterráneo y el mexicano, este último incluye principalmente la especie *Lippia graveolens* (Figura 1). Esta es una planta caducifolia, crece en climas semiáridos, y tradicionalmente se usa como antiséptico intestinal (Morton, 1981), antiespasmódico (Forestieri *et al.*, 1996), analgésico, antiinflamatorio, antipirético (Cáceres *et al.*, 1993), abortivo (Domínguez *et al.*, 1998) y para el tratamiento de desordenes menstruales (Compadre *et al.*, 1986) y diabetes (Morton, 1981).

Como ya se mencionó anteriormente el componente principal del aceite esencial del orégano es el carvacol, esta sustancia tiene una actividad antiséptica muy enérgica, por lo que se usa para el tratamiento de las infecciones de estómago, como vermífugo, antiespasmódico y expectorante (Maldonado, 1991). Dentro de la literatura se ha reportado el uso del orégano como afrodisíaco, estimulante del cuero cabelludo para evitar la calvicie (Almeida, 1991), diaforético, tónico para los nervios, funguicida, expulsivo de gusanos parásitos estomacales, para el alivio de dolores de cabeza, indigestión, picadura de insectos y dolores de muelas (Cavazos, 1991). El aceite esencial es ampliamente utilizado como ingrediente básico en la industria refresquera y de cosméticos (Maldonado, 1991).

El orégano era utilizado en la Roma antigua como hierba aromática culinaria y medicinal. Era la representación de un símbolo de paz y de felicidad. En el México prehispánico el uso del orégano se dirigía más hacia aplicaciones de carácter medicinal que como especie culinaria (Maldonado, 1991).

Aunque el uso de *Lippia graveolens* como condimento y hierba curativa empezó desde las antiguas culturas mexicanas, este continúa hasta nuestros días. Recientemente la recolección y el procesamiento de hojas de orégano ha llegado a tener gran importancia económica ya que el 90% del total de la producción se destina a la exportación (Cavazos, 1991).

De manera adicional Salgueiro y colaboradores (2003) determinaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial, demostrando que éste presenta una actividad significativa contra *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Streptococcus faecalis*; *Proteus vulgaris*; *Candida albicans*; *Cryptococcus neoformans*; *Cladosporium cladosporioides*; *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*.

II.2. Generalidades sobre la especie en estudio, *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth (Verbenaceae).

A. Descripción.

Lippia graveolens (Figura 1) pertenece a la familia Verbenaceae, la cual está formada por unos 90 géneros y aproximadamente 3000 especies, de distribución casi cosmopolita, pero preferentemente de las regiones tropicales y subtropicales. En el Valle de México se tienen registros de siete géneros (Arroyo, 1985).



Figura 1. *Lippia graveolens*. Fotografía Biol. Rosalía Ocampo.

El género *Lippia* Houst. es un árbol o arbusto, algunas especies aromáticas; hojas opuestas o ternadas, rara vez alternas, enteras, dentadas, aserradas o lobadas; inflorescencia en cabezuelas o espigas breves, contraídas, axilares, solitarias o numerosas, constituidas por muchas flores; flores pequeñas, sésiles, estas flores nacen en las axilas de brácteas conspicuas, imbricadas, algunas veces decusadas o seriadas; cáliz pequeño, membranoso, generalmente comprimido o campanulado, carinado; corola zigomorfa, tubo cilíndrico, recto o curvo, limbo oblicuo, amplio, un poco bilabiado, lóbulos 4; estambres 4, didínamos, anteras ovadas, insertos en la mitad del tubo de la corola, generalmente inclusos; ovario globoso, bilocular, con un óvulo por lóculo, estilo breve, estigma brevemente bilobado, oblicuo o recto; frutos parciales 2, pequeños, secos, envueltos por el cáliz persistente, separables fácilmente en la madurez, de paredes papiráceas o subóseas. El género comprende alrededor de 100 especies, distribuidas ampliamente en América tropical y subtropical, pocas en el Viejo Mundo (Arroyo, 1985).

Lippia graveolens, Nov. Gen. Sp.2:266. 1818. *Lantana origanoides* Mart & Gal., Bull. Acad. Roy. Sci. Brux. 11:327.1844. *Lippia berlandieri* DC., Prodr. 11: 576. 1847.

Nombres comunes registrados en la zona del Bajío: orégano, vadanga orégano (lengua otomí).

Nombres comunes registrados fuera de la zona de estudio: hierba dulce, oreganillo, orégano cimarrón, romerillo del monte, salvia real, té de monte (Rzedowski y Calderón, 2002).

Arbusto hasta de 2-3 m de alto, aromático al estrujarse; ramas estrigoso-pubérulas o a veces pilosas, las principales a menudo con corteza exfoliante; hojas opuestas, pecíolo delgado, de 2 mm a 1-2 cm de largo, lámina angostamente ovada a oblonga o elíptica, de 1 a 5-6 cm de largo, de 0.4 a 2-3.5 cm de ancho, ápice por lo general obtuso a redondeado, a veces agudo, base obtusa a subcordata, pero con cierta frecuencia también diminuta y abruptamente cuneada, margen más o menos regularmente crenado, de textura cartácea, haz

eticulado-rugoso, estrigoso-piloso a casi glabro, envés pubérulo a tomentoso; inflorescencias en forma de espigas cortas, cónicas a cilíndricas, de 4 a 12(15) mm de largo, por lo general agrupadas en fascículos de 2 a 4 en las axilas de las hojas, sobre pedúnculos de 2 a 15 mm de largo, brácteas comúnmente ordenadas en 4 hileras, persistentes, ovadas a suborbiculares, de 2 a 3 mm de largo conduplicado-aquilladas, agudas a acuminadas en el ápice, densamente piloso-vilosas por fuera; inconspicuamente 4-dentado, de 1 a 2 mm de largo, piloso-viloso; corola blanca amarilla, hipocraterimorfa, tubo de 3 a 6 mm de largo, pubérulo por fuera; estambres inclusos; frutos desconocidos (Rzedowski y Calderón, 2002).

B. Distribución.

Lippia graveolens es una planta aromática, se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Costa Rica. E.U.A.; Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas (lectotipo de *L. berlandieri*: J. L. Berlandier 2252(G)), Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo (tipo *Lantana origanoides*: H. Galeotti 756 (BR)), Nayarit, Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Puebla, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Campeche (tipo: A. Humboldt y A. Bonpland s. N. (P)), Yucatán, Quintana Roo, Centroamérica (Figura 2 Rzedowski y Calderón, 2002).

C. Problemas taxonómicos.

Los problemas taxonómicos, también conocidos como “complejos de especie”, se presentan como sinonimias entre las especies, o simplemente características que no están bien descritas para cada especie en cuanto a la relación de una localidad, hablando evolutivamente (Stuessy, 1990). Actualmente se han determinado algunos problemas taxonómicos dentro de la familia Verbenaceae, un ejemplo de esto es el caso de *Lippia graveolens*, ya que varios autores mencionan otras especies en sinonimia con ésta especie. Nash y Nee

(1984) registran las siguientes especies dentro de *Lippia graveolens*, mostrando así, el gran problema taxonómico que existe dentro de esta especie.

Lippia graveolens Humb.; Bompl. & Kunth, Nov. Gen. Sp. 2:266.1818. Tipo: México, Campeche, *Humboldt & Bonpland s.n.*

Lantana organoides Martens & Galeotti, Bull. Acad. Roy. Sci. Bruxelles 11(2):327. 1844. Tipo: México, *Galeotti 784*.

Lippia berlandieri Schauer, en DC., Prodr. 11:575. 1847. Sintipos: México, Tamaulipas, between Santander and Victoria, *Berlandier 2252 (G)*; Oaxaca, *Andrieux 166 (B)*; San Bartolo, *Ehrenberg 720 (B)*.

Goniostachyum graveolens (Humb.; Bompl. & Kunth) Small, Fl. Southeast. U.S. 1012. 1903.

En cuanto a los estudios taxonómicos 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 (Vázquez, 1991). Una de las técnicas taxonómicas para resolver problemas de diferenciación de especies, es la fenética o taxonomía numérica.

Los conglomerados fenéticos se han definido como un medio de separación de unidades taxonómicas a través de la similitud o diferencias totales de los grupos a estudiar. El método se usa a menudo con datos bioquímicos comparativos, pero también es recomendado a veces usarlo con datos morfológicos (Platnick and Funk, 1983).

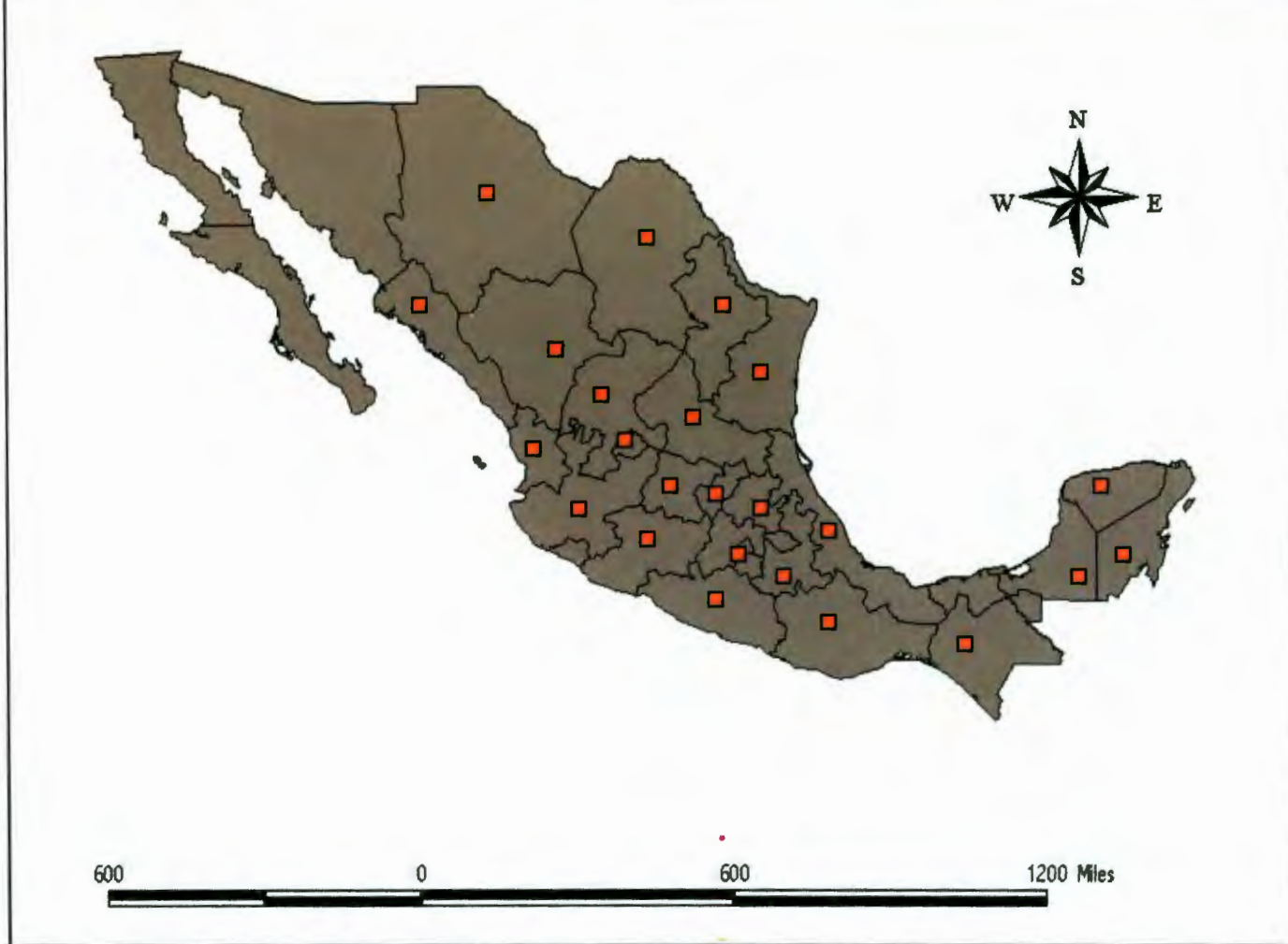


Figura 2.- Mapa de distribución de *Lippia graveolens*, adaptado de Rzedowski y Calderón (2002).

Lo que hace esta metodología, es agrupar los taxa de acuerdo a todos los caracteres similares y posteriormente ofrece la evidencia entre relaciones taxonómicas. Esto tiene un importante papel en el trabajo taxonómico, particularmente en la identificación y en la determinación de los especímenes comparando uno o más entidades distintas. Dos organismos o muestras de organismos normalmente diferirán a una mayor o menor magnitud y por muchas razones puede ser deseable cuantificar el grado por el que ellos difieren entre sí, o qué tanto se parecen (Quicke, 1993).

El método puede utilizar caracteres binarios o valores continuos. Las variables continuas pueden ser complicadas, porque las diferencias en los rangos de los valores obtenidos a partir de las medias de cada variable, puede contribuir desigualmente al índice de similitud entre los grupos. Superando esto, se requiere alguna clase de procedimiento de ajuste y a su vez requiere del conocimiento de variación del carácter en cuestión de unidades taxonómicas operativos (OTUs) (Quicke, 1993).

El método más empleado para igualar los efectos de variables continuas diferentes, se llama normalización, mediante una transferencia a una normal estándar con media 0 y varianza 1. Hay dos usos principales para los datos de distancia en taxonomía numérica. Primero, pueden usarse para investigar los modelos en los datos, para tener una visión de en qué grupos puede estar presente un juego dado de OTUs y entre sí estos son similares. Alternativamente, si los taxa a los que OTUs pertenecen ya son conocidos, qué datos pueden usarse para ayudar asignar un nuevo OTUs de afinidad incierta (Quicke, 1993).

Los resultados se expresan en fenogramas o árboles de conglomerados (grupos taxonómicos). Su construcción puede ser secuencial. En fenética los métodos taxonómicos de agrupamientos son: el grupo más lejano, unweighted par-grupo método que usa aritmética promedia (UPGMA), weighted par-grupo método que usa aritmética promedia (WPGMA), y conglomerados. Éstos se discuten en

detalle por Sneath y Sokal (2000); resaltando que el método más utilizado es el de UPGMA (Quicke, 1993).

Unweighted par-grupo método que usa aritmética promedia (UPGMA).

Este método es basado, en unir un OTU a los grupos con base a su promedio, y la distancia a los miembros de ese grupo. El cálculo de la distancia entre dos grupos de OTUs, es llevado a cabo sumando las distancias entre todas las posibles combinaciones de parsimonia de los OTUs en los dos grupos, por el número de combinaciones posibles (Quicke, 1993).

Por otra parte, Skoula y Harborne (2000) llevaron a cabo un estudio de la clasificación intrafamiliar del género *Origanum*, donde tomaron en consideración el método filogenético. Los análisis fueron basados principalmente en las flores, frutos y la morfología vegetativa, pero también en la analogía de la embriología, fitoquímica y anatomía epidérmica, también utilizaron como evidencia molecular, la variación del sitio de la restricción del cpDNA.

Con respecto al orégano, en algunos estudios que hicieron Skoula y Harborne (2000) dentro de la clasificación infragenérica, reorganizaron tres grupos en este género (*Origanum*), 10 secciones, 38 especies, seis subespecies y 17 híbridos, la clasificación fue basada en los caracteres morfológicos siguientes: longitud de vástagos, indumentum de vástagos y hojas; arreglo, número y longitud de ramas, forma de hojas, longitud de pecíolos, número de glándulas sésiles en las hojas, arreglo de verticilos, forma de puntos, número de flores en un verticilo; forma, tamaño, textura y color de brácteas, forma y longitud general de cálices; forma y color general de corolas, formas de labios y de lóbulos de las corolas, arreglo de estambres, longitud del filamentos estaminales y longitud de los estilos.

Gracias a estos estudios Skóula y Harborne (2000) clasifican de una manera geográfica los diferentes grupos en los que se pueden observar las diversas especies del género *Origanum* en el Mediterráneo. Así como el comportamiento de este género a nivel geográfico e intrafamiliar. Por lo que nos da la pauta para llevar a cabo estudios similares con *Lippia graveolens* aunque a un nivel geográfico mucho menor.

D. Estudios químicos y biológicos preliminares.

Plantas con flores, helechos, musgos, hepáticas, y entre ellos el orégano, contienen diversos tipos y cantidades de compuestos fenólicos, mismos que tal vez son subproductos del metabolismo. Los compuestos fenólicos poseen un anillo aromático al que se unen diversos grupos sustituyentes, como hidroxilo, carboxilo y metóxilo y a menudo otras estructuras cíclicas no aromáticas (Salisbury y Ross, 1994).

El orégano, comercializado en México, se obtiene básicamente de plantaciones silvestres y su calidad se define por la cantidad y composición de su aceite esencial. Sin embargo, es importante caracterizar su contenido de compuestos fenólicos ya que estos no sólo presentan actividades farmacológicas interesantes (antioxidante y anticarcinogénico) sino también las estructuras químicas son usadas para correlacionar diversas diferencias morfológicas entre especies muy relacionadas en un género en particular. Por ejemplo, los flavonoides que se presentan en especies relacionadas de un género dan a los taxónomos información que puede utilizarse para clasificar y determinar las líneas de evolución vegetal (Salisbury y Ross, 1994).

La composición química del aceite esencial de *Lippia* H. ha sido investigada mediante cromatografía de gases, encontrándose que éste posee un alto contenido de monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados, siendo el carvacol, *p*-cumeno y timol los mayoritarios. Algunas de estas estructuras las podemos

observar en el cuadro 1a (Salgueiro *et al.*, 2003), en el que sólo se muestra los compuestos mayoritarios.

Los compuestos fenólicos se diferencian de los lípidos porque son más solubles en agua y menos solubles en solventes orgánicos no polares. Sin embargo, algunos compuestos fenólicos son un tanto solubles en éter, en especial cuando el pH es tan bajo para impedir la ionización de cualquier grupo carboxilo e hidroxilo presentes (Salisbury y Ross, 1994).

Estas propiedades permiten la separación de tales compuestos de otros. Existen otros compuestos fenólicos que surgen también de la ruta del ácido sikimico y de reacciones subsecuentes. Se han detectado que éstos previenen enfermedades en plantas resistentes a patógenos (Salisbury y Ross, 1994).

Un punto de interés en los compuestos fenólicos es la oxidación lipídica, la que ocurre cuando el oxígeno reacciona con los lípidos en una cadena de radicales libres que llevan a cambios en los complejos químicos. La oxidación de lípidos, causa la pérdida de calidad en las comidas. En vivo, la oxidación de los lípidos puede jugar un papel en enfermedades del corazón, arterioesclerosis, cáncer, y en el proceso de envejecimiento (Jadhav *et al.*, 1996).

Los antioxidantes son compuestos que pueden tardar o pueden inhibir la oxidación de los lípidos. Cuando están agregados a los alimentos, los antioxidantes reducen al mínimo rancidez, retardan la formación de los productos tóxicos de la oxidación, mantienen calidad alimenticia, y aumentan la vida útil (Jadhav *et al.*, 1996).

Con respecto a otros constituyentes, se han aislado de *Lippia graveolens*, los flavonoides, naringenina y pinocembrina, el naftoquinoide, lapaquenol (ver cuadro 1b. Domínguez *et al.*, 1998), y diez iridoides (Ver Cuadro 1c-d. Rastrelli *et al.*, 1998). Pocos son los estudios relacionados con el aislamiento de los

metabolitos secundarios de *Lippia graveolens* y más escasos son los reportes de las actividades biológicas.

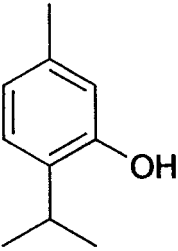
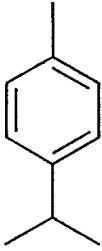
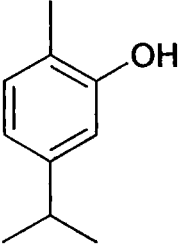
II.3. Otros estudios realizados con *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth y su importancia económica.

También se han llevado a cabo algunos trabajos sobre aspectos económicos. La información sobre su reproducción es escasa, de acuerdo a estudios realizados, se ha observado que ésta, es muy baja debido a que la floración y semillación concuerda precisamente con su fecha de recolección anulando prácticamente su regeneración natural (Vázquez, 1991).

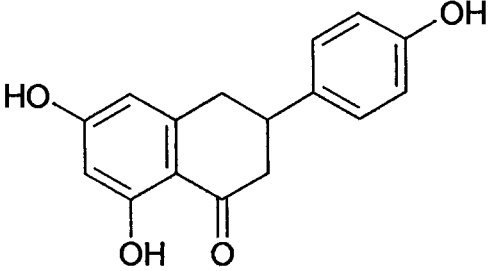
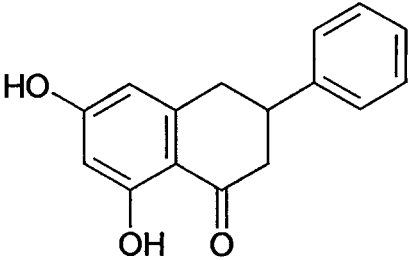
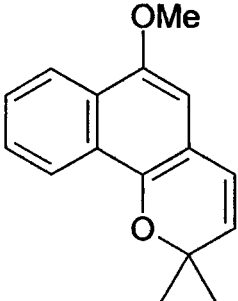
Por otra parte Cavazos (1991) llevó a cabo estudios en cuanto a la producción de orégano y su ecología, en este estudio observó que la cosecha y procesamiento de las hojas de orégano tienen una importancia económica significativa para México, debido a que un gran número de individuos se benefician con la recolección de esta especie. Casi la totalidad de la producción es exportada, siendo los Estados Unidos el principal importador.

Cavazos (1991) menciona que en los sitios de orégano económicamente importantes se encontraron diferencias significativas en la producción de hoja, y que estas diferencias no pudieron atribuirse a las características del suelo que se consideraba en el estudio. Por lo que los factores geográficos de los sitios y su manejo tuvieron una mayor influencia en estas diferencias en producción.

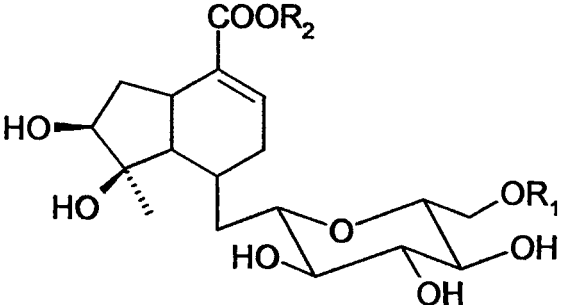
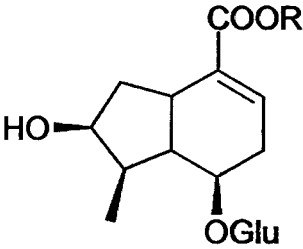
En el caso del orégano, la composición básica del aceite esencial varía con la fuente de la planta y el área geográfica de crecimiento. Basándose en lo anterior, se puede inferir que el género *Lippia* H. posee una diversidad genética rica en sesquiterpenoides y también que la variación putativa es intraespecífica y heredada (Kintzios, 2002).

Nombre	Estructura
<p>Monoterpenos</p> <p>Timol</p>	
<p>Monoterpenos</p> <p>Cumeno</p>	
<p>Monoterpenos</p> <p>Carvacol</p>	

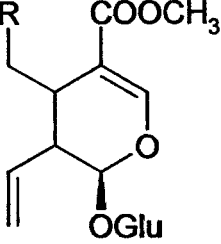
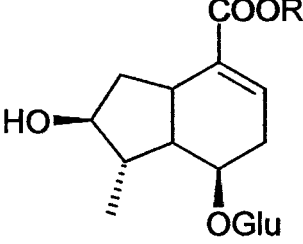
Cuadro 1a.- Estructuras químicas reportadas por Salgueiro *et al.* (2003) para *Lippia graveolens*. Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.

Nombre	Estructura
<p>Flavonoides</p> <p>Naringenina</p>	
<p>Flavonoides</p> <p>Pinocembrina</p>	
<p>Naftoquinoides</p> <p>Lapaquenol</p>	

Cuadro 1b.- Estructuras químicas reportadas por Domínguez *et al.* (1998) para *Lippia graveolens*. Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.

Nombre	Estructura
<p>Iridoides</p> <p>1.- Ácido carioptosídico 2.- 6'-O-<i>p</i>-coumarol 3.- 6'-O-caffeol 4.- caryoptosido</p>	 <p>1. $R_1=R_2=H$</p> <p>2. $R_1 = \text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{H})=\text{C}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$ $R_2 = H$</p> <p>3. $R_1 = \text{C}(=\text{O})-\text{C}(\text{H})=\text{C}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2-\text{OH}$ $R_2 = H$</p> <p>4. $R_1=H$ $R_2=CH_3$</p>
<p>Iridoides</p> <p>5.- loganina 6.- ácido loganínico</p>	 <p>5. $R = CH_3$ 6. $R = H$</p>

Cuadro 1c.- Estructuras químicas reportadas por Rastrelli (1998), para *Lippia graveolens*. Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.

Nombre	Estructura
<p>Iridoides</p> <p>7.- secologanina 8.- secoxyloganina 9.- dimetil-secologanoside</p>	 <p>7. R = CHO 8. R = COOH 9. R = COOCH₃</p>
<p>Iridoides</p> <p>Ácido epiloganico</p>	

Cuadro 1d.- Continuación de las estructuras químicas reportadas por Rastrelli (1998), para *Lippia graveolens*. Se muestran sólo los compuestos mayoritarios.

IV. HIPÓTESIS

Si se determinara una relación entre el contenido de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, con los aspectos morfológicos desde el punto de vista fenético, de las muestras de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth; entonces; será probable que se encontrara alguna diferencia taxonómica significativa a nivel infraespecífico.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación entre el contenido de los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante con los aspectos morfológicos de las muestras de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth colectadas en diferentes localidades de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Detectar los posibles patrones de variación taxonómica en las poblaciones de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth de las diferentes localidades de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato, utilizando evidencia fenética y fitoquímica.
- ◆ Cuantificar los fenoles totales de las muestras de *Lippia graveolens* colectadas en etapa de floración.
- ◆ Cuantificar los flavonoides totales de las muestras de *Lippia graveolens* colectadas en etapa de floración.
- ◆ Determinar la actividad antioxidante de cada muestra de *Lippia graveolens* colectadas en etapa de floración.

VII. MATERIALES Y METODOS

VII.1. MATERIALES

Estudio fenético:

- ◆ Vernier
- ◆ Programa Jump Statistics Made Visual (JMP)
- ◆ Programa de Arc View 3.1

Procesamiento del material vegetal:

- ◆ Balanza granataria marca Ohaus.
- ◆ Mortero de porcelana con pistilo

Procesamiento del extracto metanólico:

- ◆ Rotaevaporador Büchi.
- ◆ Bomba de alto vacío para rotaevaporador 0.1 microHg motor ¼ HP
- ◆ Soxhlet
- ◆ Hexano, acetona y metanol grado reactivo.

Análisis de fracciones:

- ◆ Agentes de soporte cromatográfico para la realización de cromatografía en:
 - ◆ placa cromatográfica analítica con gel de sílice 60 F254 sobre aluminio (0.2 mm, Merk).
- ◆ Cámara de vidrio para placas cromatográficas.
- ◆ Lámpara de UV marca Spectroline, modelo CL-50 con gabinete.
- ◆ Aspensor de vidrio.
- ◆ Agente revelador de sulfato cérico.
- ◆ Parrilla eléctrica marca Lindberg.

Cuantificación de ácido rosmarinico:

- ◆ Sistema de cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) marca Waters que incluye:
 - ◆ sistema de control y bombeo modelo 600E con capacidad analítica y semipreparativa.
 - ◆ válvula de inyección manual Rheodyne modelo 7725.
 - ◆ desgasificador electrónico Metachem Technologies Inc.
 - ◆ detector UV/VIS programable modelo 486.
 - ◆ estación de trabajo Millenium para análisis y procesamiento de datos.
- ◆ Columna cromatográfica analítica de fase inversa C18 (Prop Nova-Pak HR, 60 Å, 6 µm, 3.9X300 mm, marca Waters).
- ◆ Disolventes orgánicos grado HPLC marca Baker:
 - ◆ metanol
 - ◆ acetonitrilo
- ◆ Agua grado HPLC
- ◆ Para la filtración de disolventes:
 - ◆ membranas de nylon y propileno hidrofílico (47 mm de diámetro y 0.45µm de poro)
- ◆ Para la filtración de muestras:
 - ◆ acrodiscos GHP 0.2 µm y 13 mm.
- ◆ Jeringa para inyección (500 µl) marca Kloehn.
- ◆ Jeringas micrométricas y desechables (3ml).

Cuantificación de fenoles y flavonoides:

- ◆ Folin Ciocalteu 1N
- ◆ Carbonato de Sodio al 20%
- ◆ Solución Estándar de Ácido Gálico (0.1 mg/mL)
- ◆ Nitrito de Sodio al 5%

- ◆ Cloruro de Aluminio al 10%
- ◆ Hidróxido de Sodio 1M
- ◆ Gradilla
- ◆ Tubos de ensayo
- ◆ Matraces aforados de 25mL con tapón
- ◆ Viales de vidrio
- ◆ Espátula
- ◆ Pipeta de 1.0 mL (utilizar de preferencia pipeta automática del 1 mL)
- ◆ Pipeta de 0.1mL (utilizar de preferencia pipeta automática de 0.1 mL)
- ◆ Pipeta de 0.2 mL (utilizar de preferencia pipeta automática de 0.2 mL)
- ◆ Pipeta Pasteur
- ◆ Bulbo para pipeta
- ◆ Piceta con agua destilada
- ◆ Celdas de plástico para el espectrofotómetro

Determinación de la actividad antioxidante:

- ◆ Reactivos:
 - ◆ metanol
 - ◆ DPPH
 - ◆ BHT
 - ◆ Naringenina
 - ◆ agua destilada
 - ◆ TROLOX
- ◆ Matraces aforados de 10 mL
- ◆ Sonicador
- ◆ Pipetas Pasteur
- ◆ Placas con pozos de fondo plano
- ◆ Pipeta multicanales
- ◆ Lector MRX (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA)
- ◆ Papel aluminio.

VII.2. MÉTODOS

A. Estudio Fenético.

Se llevó a cabo un análisis de la morfología de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth, con el fin de seleccionar los caracteres que se tomarían en cuenta para el estudio fenético. Se visitaron diferentes herbarios entre ellos: Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU); Universidad Autónoma de Querétaro (QMEX) y el del Centro Regional del Bajío del Instituto de Ecología (IEB).

Se tomaron los datos ecológicos y geográficos de cada ejemplar, para llevar a cabo un análisis con el fin de observar, si es que hay alguna variación en cuanto al hábitat de *Lippia graveolens*. Con los datos geográficos de cada ejemplar analizado, se obtuvo la distribución de *Lippia graveolens* en un mapa de la República Mexicana, este mapa fue procesado en el programa de Arc View 3.1.

Se revisaron un total de 39 ejemplares y con la ayuda de un vernier se midieron todas las partes de la planta. En el cuadro 2, se muestran las partes de la planta que se midieron para el análisis fenético, los datos morfológicos de cada ejemplar se capturaron en una base de datos y mediante el programa Jump Statistics Made Visual (JMP) se diseñó un dendrograma, para correlacionar diferencias geográficas con variación fitoquímica. Se llevó a cabo la medición de la distancia y la similitud usando datos continuos y el análisis del grupo más cercano para obtener el fenograma.

Se obtuvieron dos dendrogramas diferentes, en el primero de ellos, se tomaron en cuenta los datos morfológicos de las plantas de todos los estados que se analizaron. El segundo dendrograma, se obtuvo sólo con los datos obtenidos de las plantas de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato, ya que *Lippia graveolens* es la que más se usa en la zona centro de la República Mexicana.

Obtención del material botánico para el estudio químico.

El orégano fue colectado por la Biol. Rosalía Ocampo Velázquez, estudiante del doctorado en Recursos Bióticos, en etapa de floración. El material se secó en una estufa a una temperatura controlada de hojas y flores fueron separadas de las plantas.

Partes de la planta	Unidades
Diámetro del tallo principal	cm
Número de nodos por tallo	Número entero
Tamaño de ramas secundarias	cm
Diámetro de ramas secundarias	cm
Número de nodos en rama secundaria	Número entero
Tamaño del pecíolo	cm
Largo de hoja	cm
Ancho de hoja	cm
Número de pares de venas	Número entero
Número de inflorescencia por rama	Número entero
Número de inflorescencia por nodo	Número entero
Tamaño de la inflorescencia	cm
Tamaño del pedúnculo	cm
Diámetro mayor de la cabezuela	cm
Diámetro menor cabezuela	cm
Tamaño de la flor	cm
Tamaño del tubo	cm
Tamaño de los lóbulos	cm
Número de las flores	Número entero
Número de brácteas por cabezuela	Número entero
Tamaño de brácteas	cm

Cuadro 2.- Datos morfológicos para cada ejemplar junto con las unidades en las que se registraron.

En el siguiente cuadro (Cuadro 3) se muestran las localidades donde fueron colectadas las muestras. En las figuras 3, 5 y 7 se muestran los mapas de los estados con las localidades en donde fueron colectados el material botánico y en las figuras 4, 6 y 8 se muestran las fotografías de las zonas de colecta:

ESTADO	MUNICIPIO	LOCALIDAD
Querétaro	Peñamiller	Alto Bonito, Lucio Balderas
		El Portugués
		Enramadas
		El Pílon
		Extoras
		San Lorenzo
		San Ignacio
Guanajuato	Victoria	Salitrera
Puebla	San Juan Raya	Zapotitlán Salinas

Cuadro 3.- Localidades donde fueron colectadas las muestras



Figura 3.- Mapa del estado de Querétaro, en donde el símbolo de una estrella color negro señala el municipio de Peñamiller. INEGI 2003.



Figura 4.- Área de colecta en el municipio de Peñamiller, Querétaro. Fotografía Biol. Rosalía Ocampo.

B. Preparación de extractos.

Se tomaron 10 g del material previamente secado y separado, se molió con la ayuda de un mortero y se pulverizó. Posteriormente se sometió a una extracción en Soxhlet con hexano-acetona 1:1 y después con metanol. Todos los extractos se concentraron al vacío y se llevaron a sequedad, las muestras fueron guardadas bajo atmósfera de argón a 4°C y protegidas de la luz.

C. Cromatografía de capa fina (CCF).

Con la ayuda de capilares, se tomó una pequeña muestra del extracto de cada localidad y se aplicó sobre una cromatoplaça. Posteriormente la cromatoplaça se colocó dentro de una cámara de vidrio a la cual se le adicionó previamente un solvente o mezcla de solventes dependiendo de las características polares de la muestra (el solvente no debe tocar los puntos de aplicación, ya que la muestra podría disolverse). La placa se eluyó, se retiró, se secó, y se reveló con luz ultra violeta y sulfato cérico (agente oxidante universal, éste proceso requirió de calentamiento de la cromatoplaça en una parrilla).

D. Determinación de fenoles totales y flavonoides.

El contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Dewanto, 2002). Brevemente, las disoluciones apropiadas de extractos son oxidadas con el reactivo de Folin-Ciocalteu y la reacción es neutralizada con Na_2CO_3 . La absorbancia producida por la coloración azul es medida a 760 nm después de dos horas usando ácido gálico como estándar. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico/100 g de extracto metanólico.



Figura 5.- Mapa del estado de Guanajuato, en donde el símbolo de una estrella color negro señala el municipio de Victoria. INEGI 2003.



Figura 6.- Área de colecta en la localidad de Salitrera, Victoria, Guanajuato.
Fotografía Rosalía Ocampo.

Para la determinación de flavonoides se realizaron los mismos pasos, pero en este caso la reacción fue neutralizada con NaNO_2 al 5%, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaOH 1 M 510 nm. La absorbancia fue medida a 510 nm y los resultados se expresaron en mg catequina / 100 g de extracto.

E. Determinación del ácido rosmarinico.

La determinación de ácido rosmarinico en las muestras se llevó a cabo mediante HPLC (equipo Waters con detector UV). La fase estacionaria fue una columna analítica de fase inversa C18 Prop-Nova Pack HR, 60 Å, 6 mm, de 3.9-300 mm. El flujo de 1 ml y la elución se monitoreo a 254 nm. Como fase móvil se usó un gradiente de H_2O (1% ac. acético) y CH_3CN . El estándar de ácido rosmarinico se adquirió de Aldrich (Del Baño *et al.*, 2003).

F. Determinación de la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se determinó mediante la evaluación de la actividad antirradical mediante el ensayo de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Brevemente, se tomó una celda de 96 pozos y se agregaron las muestras como se indica en el cuadro 4. Al pozo 1 A se agregó 200 μl de agua destilada, a los pozos 1-2 se agregó 20 μl de MeOH , a los demás pozos se agregó 20 μl de las muestras indicadas en el cuadro 4.

Finalmente se agregó a todos los pozos excepto el de agua 200 μl de la solución de DPPH. En seguida la placa fue leída dentro de un lector MRX (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA) usando una longitud de onda de 520 nm a 0 minutos con intervalos de 10 minutos, durante una hora.

Durante este tiempo, la placa se mantuvo protegida de la luz con una hoja de aluminio a temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$). Los controles positivos fueron el BHT, TROLOX y naringenina. Este proceso se llevó a cabo por triplicado.

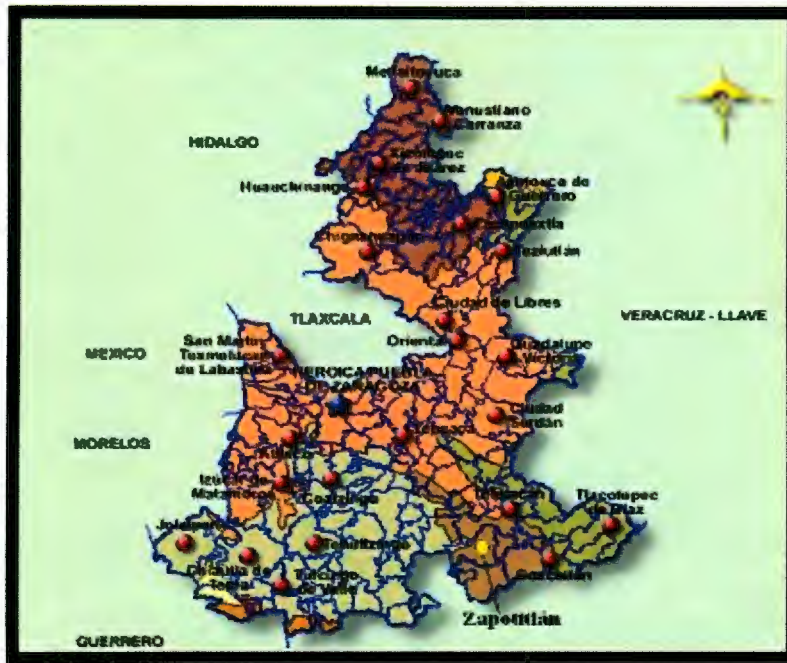


Figura 7.- Mapa del estado de Puebla, en donde el símbolo de un círculo color amarillo señala el municipio de Zapotitlán Salinas. INEGI 2003.



Figura 8.- Área de colecta en la localidad de Zapotitlán Salinas, estado de Puebla. Fotografía Biol. Rosalía Ocampo.

Preparación de las muestras

Se prepararon cuatro concentraciones diferentes para cada muestra de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato. La muestra del estado de Querétaro, que se tomó en cuenta para llevar a cabo este estudio, fue la muestra de la localidad que presentó mayor cantidad de fenoles. Estas concentraciones se prepararon usando como solvente el metanol (MeOH) como se describe a continuación.

Se tomó 10 mg de la muestra (Querétaro, Puebla o Guanajuato) y se le disolvió en 10 ml de MeOH, la solución se llamó P1, Q1, G1 respectivamente. Posteriormente se tomó 1 ml de cada solución y aforó a 10 ml con MeOH, se le llamó concentración 2. Se tomó 1 ml de la solución anterior y se diluyó con 9 ml de MeOH, esta solución corresponde a la concentración 3. Finalmente, se tomó 1 ml de la solución anterior y se aforó a 10 ml con MeOH, se le llamó concentración 4.

Preparación del DPPH, BHT, TROLOX y Naringenina

- ◆ Para el DPPH, se disolvieron 0.0015 g de DPPH en 20.5 ml de MeOH y se aforó con agua a 25 ml.
- ◆ Para el BHT, se disolvieron 0.010 g de BHT en 10 ml de MeOH.
- ◆ Para la Naringenina, se disolvieron 0.010 g de BHT en 10 ml de MeOH
- ◆ Se prepararon ocho concentraciones de TROLOX 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M , 500 μ M, 600 μ M, 700 μ M, y 800 μ M.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Agua											
B	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH	MeOH
C	P1	P1	P1	Q1	Q1	Q1	G1	G1	G1	BHT	BHT	BHT
D	P2	P2	P2	Q2	Q2	Q2	G2	G2	G2	T6	T6	T6
E	P3	P3	P3	Q3	Q3	Q3	G3	G3	G3	T7	T7	T7
F	P4	P4	P4	Q4	Q4	Q4	G4	G4	G4	T8	T8	T8
G	T0.5	T0.5	T0.5	T2	T2	T2	T4	T4	T4	BHT	BHT	BHT
H	T1	T1	T1	T3	T3	T3	T5	T5	T5	Nar	Nar	Nar

Cuadro 4. Diseño experimental para la determinación de la actividad antioxidante. P1= Puebla concentración 1; P2= Puebla concentración 2; P3= Puebla concentración 3; P4= Puebla concentración 4. Q1= Querétaro concentración 1; Q2= Querétaro concentración 2; Q3= Querétaro concentración 3; Q4= Querétaro concentración 4. G1= Guanajuato concentración 1; G2= Guanajuato concentración 2; G3= Guanajuato concentración 3; G4= Guanajuato concentración 4. T0.5 = TROLOX 0.5 μM , T1= TROLOX 100 μM , T2= TROLOX 200 μM , T3= TROLOX 300 μM , T4= TROLOX 400 μM , T5= TROLOX 500 μM , T6= TROLOX 600 μM , T7= TROLOX 700 μM , T8= TROLOX 800 μM . Nar = Naringenina.

VIII. RESULTADOS

A. Estudio fenético

Para éste estudio, de los 39 ejemplares analizados, se obtuvo de cada ejemplar, el estado, municipio, localidad, hábitat, altitud en m.s.n.m y la fecha en la que se colectó el ejemplar (cuadro 5a-f), así como la ubicación geográfica de sólo 34 de los ejemplares analizados, ya que no todos presentaban este dato. Posteriormente, los registros de la ubicación de los 34 ejemplares, se procesaron en el programa Arc View 3.1, en el que se obtuvo un mapa como se muestra en la figura 9. Este mapa nos permite observar la distribución de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth en cuanto a los datos obtenidos a los que éste análisis se refiere.

Con los datos morfológicos de los 39 ejemplares analizados, se obtuvo el primer dendrograma (Figura 10). Cabe mencionar que el ejemplar que tuvo menos del 81% de los datos morfológicos, no fué tomado en cuenta para la obtención del dendrograma.

Número del ejemplar	Estado	Municipio	Localidad
1	Campeche	Hecelchacoán	—————
2	Coahuila	Torreón	Microondas
3	Coahuila	San Pedro	Cuatro Ciénegas
4	Coahuila	Muzquiz	La Peña
5	Coahuila	Saltillo	Las Coloradas
6	Durango	Mezquital	—————
7	Durango	—————	Palmitos
8	Guanajuato	Victoria	Mesas del Tigre
9	Guanajuato	Atarjea	Atarjea
10	Guanajuato	Xichú	El Roblar
11	Guerrero	Apaxtla	Tlatzala

Cuadro 5 a.- Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.

Número del ejemplar	Estado	Municipio	Localidad
12	Guerrero	Taxco de Alarcón	Tepetlapa
13	Hidalgo	San Salvador	Dextlzo
14	Jalisco	Colotlán	Colotlán
15	Michoacán	Zitácuaro	—————
16	Morelos	—————	Cañón de Lobos
17	Oaxaca	Mitia	—————
18	Oaxaca	Juxtlahuaca	Santos Reyes Tepejillo
19	Puebla	Jolalpan	Zacacuautila
20	Puebla	Izúcar de Matamoros	Izúcar de Matamoros
21	Querétaro	Arroyo seco	Trapiche
22	Querétaro	Peñamiller	Tierra Colorada
23	Querétaro	Cadereyta	Cañón del Infiernillo
24	Querétaro	San Joaquín	—————
25	Querétaro	Peñamiller	—————
26	Querétaro	Tequisquiapan	Las Rosas
27	Querétaro	Jalpan	Tanchanaquito
28	Querétaro	Cadereyta	La Mora
29	Querétaro	Villa Corregidora	El Batán
30	Querétaro	Landa	La Vuelta-Tancoyol

Cuadro 5 b.- Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.

Número del ejemplar	Estado	Municipio	Localidad
31	Sinaloa	Mochis	Cerros del Fuerte
32	SLP	San Antonio	Tanjasnec
33	Sonora	Álamos	-----
34	Tamaulipas	Méndez	San Fernando
35	Tamaulipas	San Nicolás	
36	Tamaulipas	San Carlos	San Antonio
37	Tamaulipas	Jaumave	Puente del Río Chihue
38	Veracruz	Huayacocotla	Tejocotes
39	Zacatecas	-----	Pico de Teyra

Cuadro 5c.- Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.

Número del ejemplar	Hábitat	Altitud en m.s.n.m.	Fecha
1	Selva mediana	-----	Julio 27 de 1987
2	-----	44.196 - 457.20	1983
3	-----	740	-----
4	Bosque de pino-encino	2000-3000	Diciembre 5 de 1985
5	-----	-----	Octubre 2 de 1984
6	-----	-----	Agosto 20 1998
7	-----	1700	1985
8	Matorral arbustivo, ladera de cerro	1800	1990
9	Matorral seco, ladera de cerro	1790	1996

Cuadro 5 d.- Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.

Número del ejemplar	Hábitat	Altitud en m.s.n.m.	Fecha
10	Bosque tropical caducifolio		1991
11	Bosque tropical subcaducifolio	1200	1981
13	Matorral bajo espinoso	2200	Junio 25 de 1981
14	Vegetación secundaria	1700	-----
15	Cultivada en huerto de aguacate y café molido	1900	1995
16	-----	-----	1941
17	-----	-----	1981
18	Bosque <i>quercus-juniperus</i>	1390-1630	1996
19	Bosque tropical caducifolio	1400	1984
20	-----	1463	1976
21	Bosque tropical caducifolio, ladera de un cerro	880- 1000	1991
22	Pastizal perturbado	2200	Septiembre 12 de 1989
23	Matorral desértico, micrófilo y crasicaule	1600	Julio 27 de 1989
24	Bosque tropical caducifolio	1251	Noviembre 27 de 2002
25	Matorral submontaño	1450	1978
26	Matorral xerófilo	2000	1990
27	Bosque tropical caducifolio	350	1991

Cuadro 5 e.- Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.

Número del ejemplar	Hábitat	Altitud en m.s.n.m.	Fecha
28	Matorral submontaño sobre laderas inclinadas de rocas lutitas	1100	Julio 15 de 1997
29	Selva baja caducifolia y matorral crasicaule	1900	Agosto 18 de 1995
30	Sobre la carretera	1270	1987
31	Rocas volcánicas	60.96 - 304.80	1954
32	Bosque tropical pereniforilio	-----	1979
33	-----	660	1993
34	-----	-----	1982
35	Matorral alto subinerma	525	Agosto 15 de 1998
36	Bosque espinoso	330	-----
37	-----	-----	1985
38	-----	2090	1994
39	En una pendiente rocosa	1524	1973

Cuadro 5 f.- Datos obtenidos de los ejemplares registrados para el estudio fenético.



Figura 9.- Distribución de *Lippia graveolens*, tomando los registros para el estudio fenético.

Claramente se observa que hay tres grupos que forman el primer dendrograma (Figura 10). Analizando el primer grupo (A), lo forma el estado de Coahuila, el conglomerado 2 y 3 que se le adiciona, también son en el estado de Coahuila; estos tres grupos, forman un sub-subgrupo *a*.

El grupo 4 se presenta en el estado de Puebla, el conglomerado 5 lo forman los estados de Querétaro, Hidalgo y Tamaulipas. Estos tres grupos forman el sub-subgrupo *b* y estos dos, tanto *a* como *b*, forman un subgrupo *I*. El siguiente sub-grupo (*II*), está formado por seis conglomerados, en donde el grupo 7 incluye a los estados de Guanajuato y Tamaulipas; el grupo 8 es del estado de Guanajuato; el conglomerado 9 está formado por Guerrero y Querétaro; el grupo 10 y 11, son del estado de Querétaro y Tamaulipas respectivamente. Y por último el conglomerado 12, lo forman los estados de Jalisco y Sinaloa. Estos dos subgrupos (*I* y *II*) forman el primer grupo (A) del dendrograma. Este grupo presenta una similitud entre los ejemplares de alrededor de 8.

El segundo grupo (B) está formado por seis conglomerados, donde el grupo 14 esta formado por los estados de Guanajuato y Querétaro, el grupo 15, 16 y 17 pertenecen a los estados de Querétaro, Zacatecas y Tamaulipas respectivamente, el conglomerado 18, está formado por el estado de Querétaro y el grupo 19 es de San Luis Potosí. El grupo B, presenta una similitud ente los ejemplares de alrededor de 4. El tercer grupo (C) está formado por diez conglomerados, en donde el grupo 20 esta formado por los estados de Oaxaca y Querétaro, el grupo 21 es del estado de Querétaro, el 22 lo forman los estados de Puebla y Querétaro, el conglomerado 23 está formado por los estados de Durango y Veracruz, los grupos 25, 26, 27, 28, 29 y 30; lo forman los estados de Durango, Morelia, Oaxaca, Guerrero, Michoacán y Sonora. Este último grupo muestra una similitud entre los ejemplares de alrededor de 2. En la figura 11, se muestran las distancias (similitudes) en el dendrograma de la figura 10, que presentan los ejemplares entre ellos. En esta figura podemos percatarnos que la similitud entre los ejemplares va desde 1.942 a 11.43.

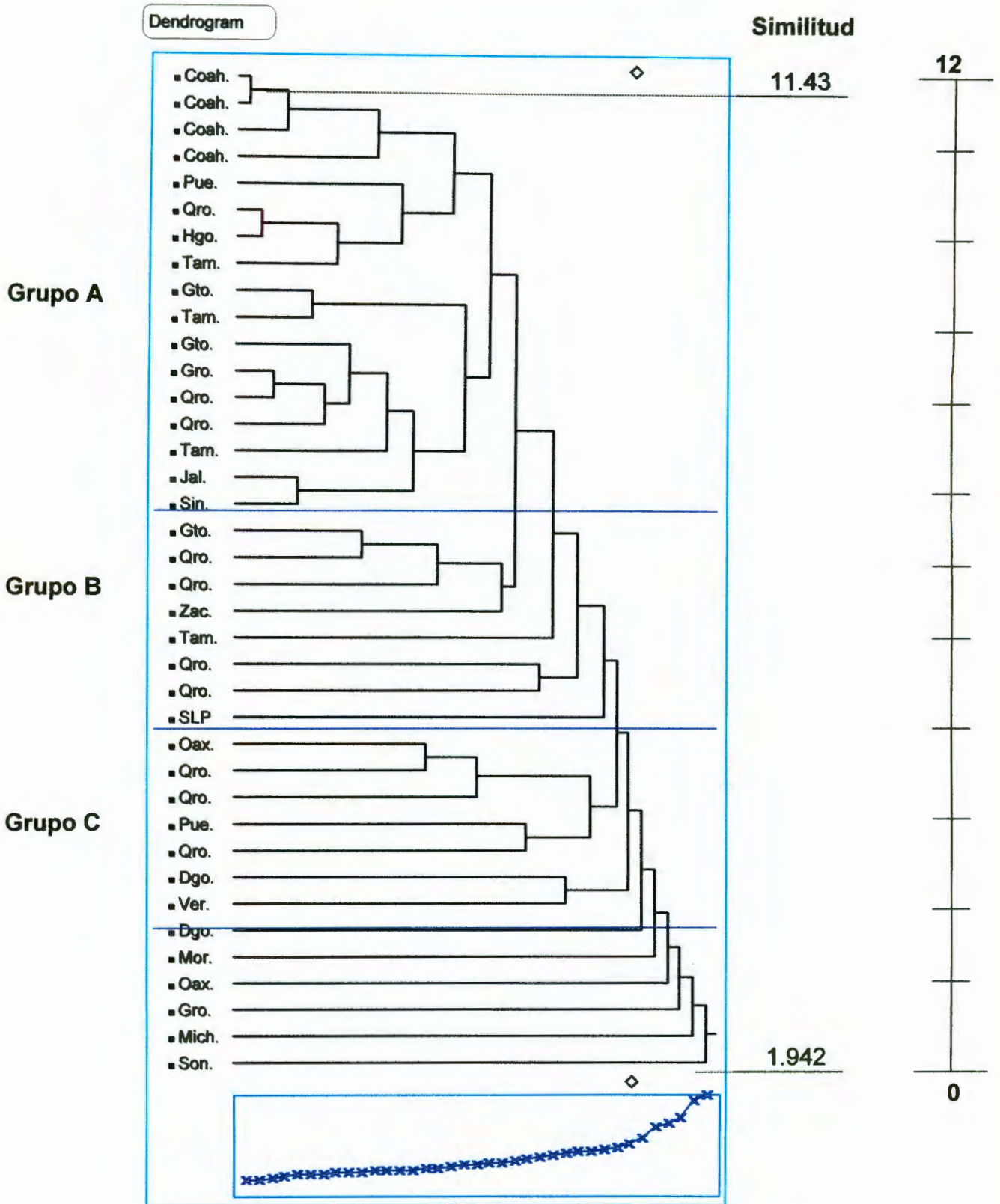


Figura 10. Dendrograma a partir de los datos obtenidos para el estudio fenético, en el que se incluyen todos los estados registrados.

Clustering History			
Number of Clusters	Distance	Leader	Joiner
37	1.9426573871	Coah.	Coah.
36	1.9966577205	Qro.	Hgo.
35	2.2350381619	Gro.	Qro.
34	2.4050509	Coah.	Coah.
33	2.5702263741	Jal.	Sin.
32	2.5724696218	Gto.	Tam.
31	2.6822265405	Gro.	Qro.
30	2.8128432008	Qro.	Tam.
29	2.8145866058	Gto.	Gro.
28	2.9111623124	Gto.	Qro.
27	3.0049376578	Coah.	Coah.
26	3.0348645876	Gto.	Tam.
25	3.1020513557	Pue.	Qro.
24	3.1211132361	Gto.	Jal.
23	3.202917595	Oax.	Qro.
22	3.3831590029	Gto.	Qro.
21	3.5283335571	Coah.	Pue.
20	3.7034720253	Gto.	Gto.
19	3.7137886488	Oax.	Qro.
18	3.8393365516	Coah.	Gto.
17	3.9758301845	Gto.	Zac.
16	4.1400857396	Coah.	Gto.
15	4.3691422855	Pue.	Qro.
14	4.5589369379	Qro.	Qro.
13	4.7023010934	Coah.	Tam.
12	5.0559730208	Dgo.	Ver.
11	5.160889292	Coah.	Qro.
10	5.281500081	Oax.	Pue.
9	5.2994136125	Coah.	SLP
8	5.6929469439	Coah.	Oax.
7	6.0635207838	Coah.	Dgo.
6	6.7159896386	Coah.	Dgo.
5	7.8458345972	Coah.	Mor.
4	8.3522786129	Coah.	Oax.
3	8.9599806462	Coah.	Gro.
2	10.822963644	Coah.	Mich.
1	11.432467718	Coah.	Son.

Figura 11.- Distancia (diferencias) entre los ejemplares, obtenidos en el dendrograma de la figura 10.

De los 39 ejemplares analizados para éste estudio, se tomaron las ubicaciones geográficas de sólo 3 municipios (Victoria, Gto.; Peñamiller, Qro. e Izúcar de Matamoros, Pue.) ya que con estos tres municipios, se trabajaron para los estudios fotoquímicos. Posteriormente se podría comparar directamente los resultados del análisis fenotípico, con los resultados fitoquímicos. Los datos geográficos obtenidos, se procesaron en el programa de Arc View 3.1 para obtener el mapa correspondiente (Figura 12).

Con los datos morfológicos de los ejemplares analizados, se obtuvo el segundo dendrograma, sólo se incluyeron los datos de los estados de Puebla, Querétaro y Guanajuato (Figura 13). A este análisis fenético, se le asignaron claves, las cuales se muestran con su respectiva descripción en el cuadro 6. El dendrograma obtenido en éste análisis, se divide en dos grupos. El primer grupo está formado por tres conglomerados, el primero de ellos está formado por los municipios de Victoria, Gto. y Peñamiller, Qro.; se le agregó el grupo 2 representado por Arteaga, Gto. y el grupo 3, está formado por Cadereyta, Qro. y Villa Corregidora, Qro. Este grupo tiene una similitud entre los ejemplares de alrededor de 6.

El segundo grupo, presenta dos subdivisiones, la primera de estas subdivisiones está formada por cinco grupos. El conglomerado 4 está representado por el municipio de Xichu, Gto, el grupo 5 está formado por Izúcar de Matamoros, Pue. y San Joaquín, Qro.; se le adicionó el grupo 6, la cual está formado por Peñamiller, Qro.; a éste se le adicionó el conglomerado 7, representado por Tequisquiapan, Qro.; el grupo 8 es representado por Jalpan, Qro. El segundo subgrupo, está formado por dos grupos, el conglomerado 9 lo forma Jolalpan, Pue. y Landa, Qro.; y por último los municipios que pertenecen al grupo 10 son: Arroyo Seco, Qro. y Cadereyta, Qro. El segundo grupo tiene como similitud entre los ejemplares alrededor de 2. En la figura 14, se muestran las distancias en el dendrograma de la figura 13, que presentan los ejemplares entre ellos. En esta figura podemos percatarnos que la similitud entre los ejemplares va desde 3.852 a 6.935.

Clave en el Dendrograma	Estado	Municipio	Localidad
Vic.G	Guanajuato	Victoria	Mesa del Tigre
PeÉQ	Querétaro	Peñamiller	-----
Atar.G	Guanajuato	Atarjea	Atarjea
CaÉonCaQ	Querétaro	Cadereyta	Cañón
VillaQ	Querétaro	Villa Corregidora	El Batán
Xich.G	Guanajuato	Xichú	El Roble
Izuc.P	Puebla	Izúcar de Matamoros	Izúcar de Matamoros
SjoaQ	Querétaro	San Joaquín	-----
Tierra.CPQ	Querétaro	Peñamiller	Tierra Colorada
Teq.Q	Querétaro	Tequisquiapan	Las Rosas
Jalp.Q	Querétaro	Jalpan	Tanchanaquito
Jolal.P.	Puebla	Jolalpan	Zacacuautla
LandaQ	Querétaro	Landa	La Vuelta-Tancoyol
Arroyo.Q	Querétaro	Arroyo Seco	Trapiche
MoraCaQ	Querétaro	Cadereyta	La Mora

Cuadro 6.- Descripción de las claves utilizadas, para interpretar el dendrograma de la figura 13.

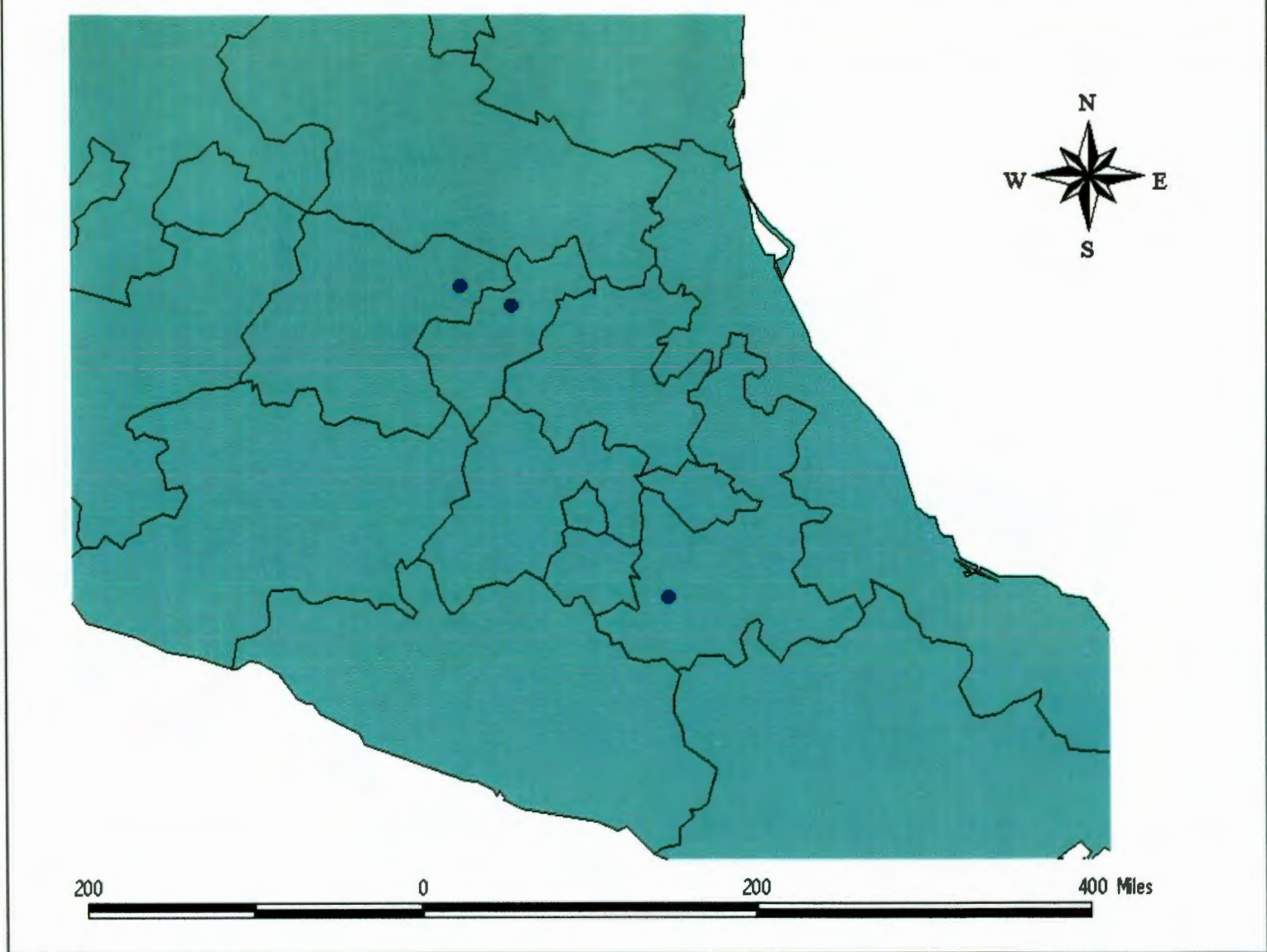


Figura 12 .- Localidades de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato. Datos tomados de los registros para el estudio fenético.

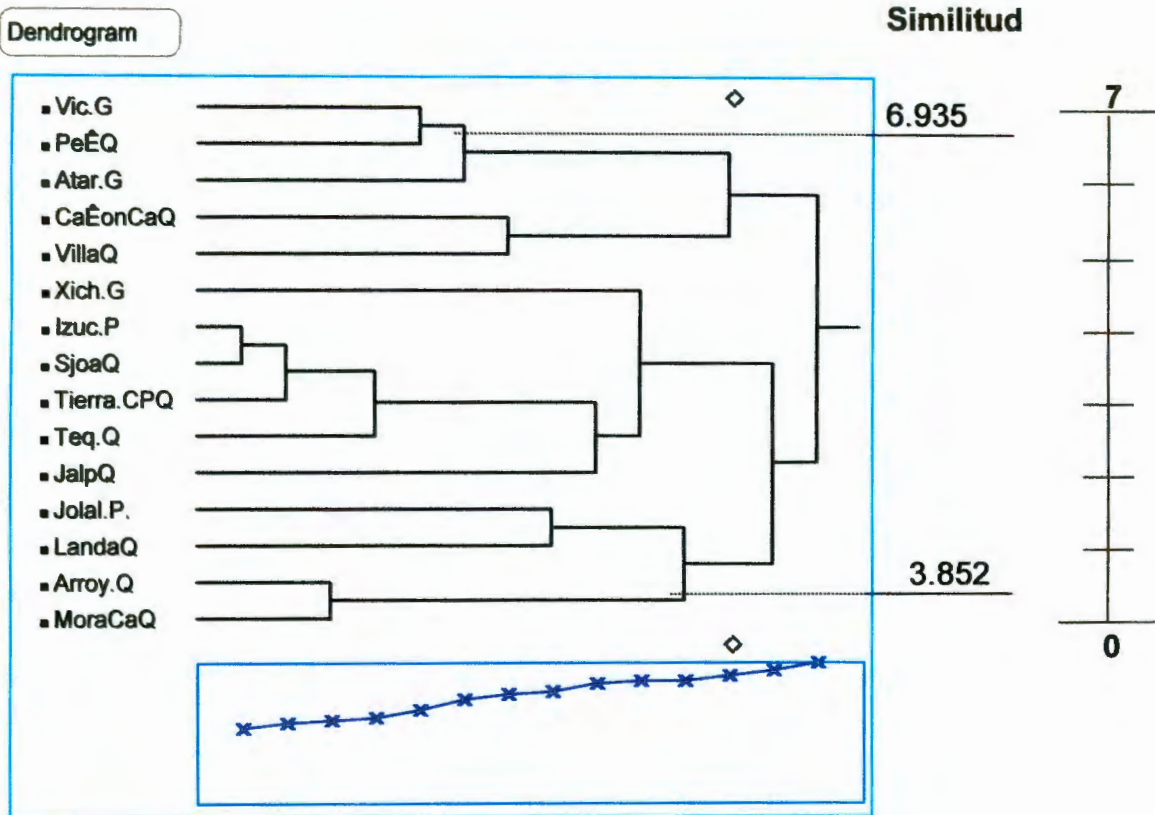


Figura 13.- Dendrograma a partir de los datos obtenidos para el estudio fenético, de los estados de Puebla, Querétaro y Guanajuato.

Clustering History

Number of Clusters	Distance	Leader	Joiner
14	3.8524338237	Izuc.P	SjoaQ
13	4.0792327961	Izuc.P	Tierra.CPQ
12	4.2226427408	Arroy.Q	MoraCaQ
11	4.3102967441	Izuc.P	Teq.Q
10	4.6411012342	Vic.G	PeEQ
9	5.1982054719	Vic.G	Atar.G
8	5.4194814714	CaEQCaQ	VillaQ
7	5.6216235367	Jolal.P.	LandaQ
6	5.9852397162	Izuc.P	JalpQ
5	6.0549441455	Xich.G	Izuc.P
4	6.0722891249	Jolal.P.	Arroy.Q
3	6.3215147864	Vic.G	CaEQCaQ
2	6.5602233126	Xich.G	Jolal.P.
1	6.935437897	Vic.G	Xich.G

Figura 14.- Distancia (diferencias) entre los ejemplares, obtenidos en el dendrograma de la figura 13.

B. Cromatografía de capa fina (CCF)

Para asegurarnos de que los extractos obtenidos de los estados de Querétaro, Puebla y Guanajuato, no tuvieran aceites esenciales, se corrió una placa, en donde se aplicó sobre ella una pequeña muestra de Timol, Ácido rosmarinico, Carvacol y extractos de la planta de cada estado. Para el caso del estado de Querétaro, sólo se utilizó la muestra de una localidad. Como solvente para esta placa, se utilizó diclorometano (Figura 15).

Ya que el ácido rosmarinico no se presentó en la cromatoplaque anterior (Figura 15), se aplicó una pequeña muestra de este compuesto sobre una nueva cromatoplaque, junto con los extractos de cada estado (Figura 16), pero con una polaridad diferente. En este caso el solvente que se utilizó fue el diclorometano / metanol.

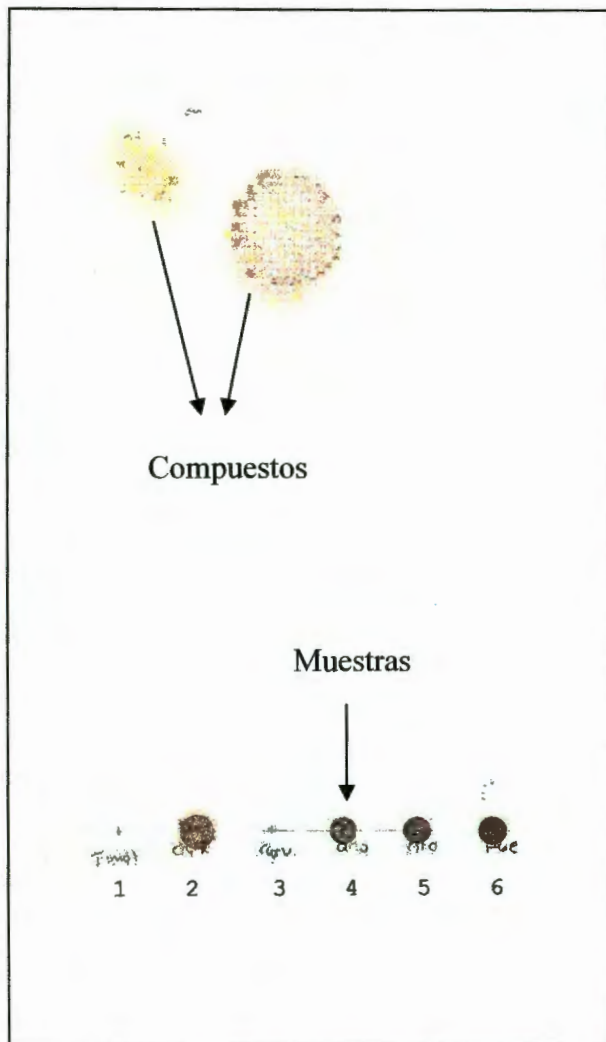


Figura 15.- Cromatografía en capa fina. 1= Timol, 2= Ácido rosmarinico, 3= Carvacol, 4= Extracto de *Lippia graveolens* del estado de Querétaro, 5= Extracto de *L. graveolens* del estado de Guanajuato, 6= Extracto de *L. graveolens* del estado de Puebla. El solvente utilizado para ésta cromatoplaca fue el diclorometano.

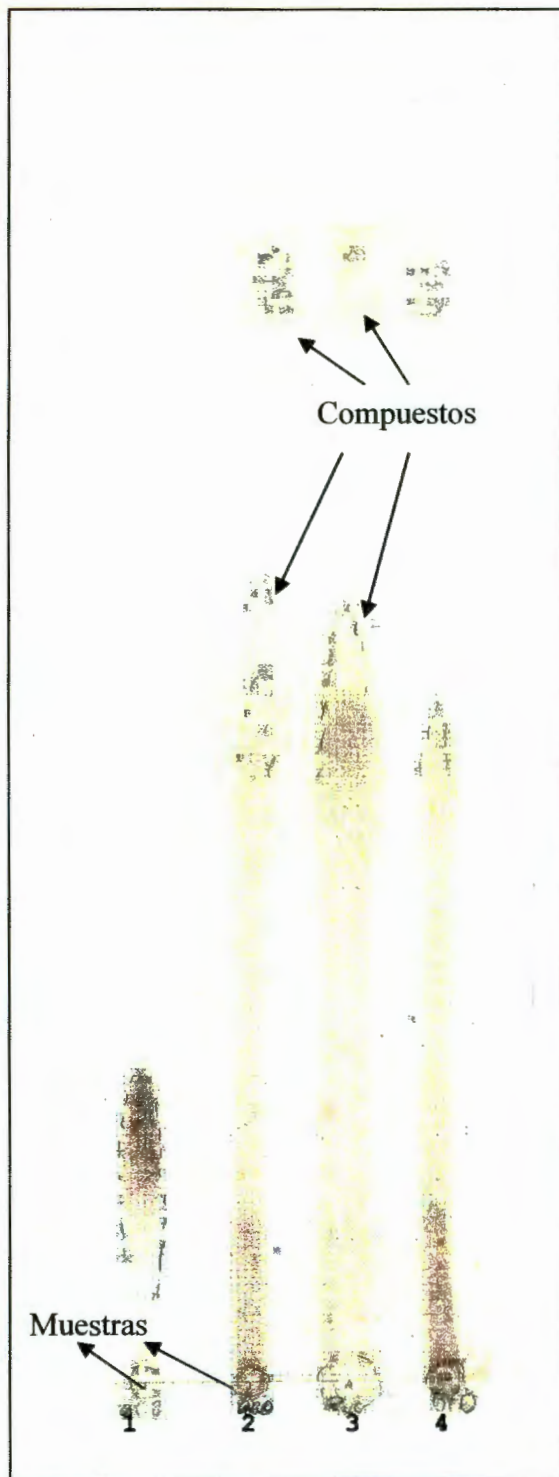


Figura 16.- Cromatografía en capa fina. 1= Ácido rosmarinico, 2= Extracto de *Lippia graveolens* del estado de Querétaro, 3= Extracto de *L. graveolens* del estado Puebla, 4= Extracto de *L. graveolens* del estado de Guanajuato. El solvente utilizado para ésta cromatoplaca fue el diclorometano / metanol.

C. Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles, se analizaron los extractos de las plantas de todas las localidades en estudio. Los resultados obtenidos de la determinación de fenoles totales se muestran en la figura 17.

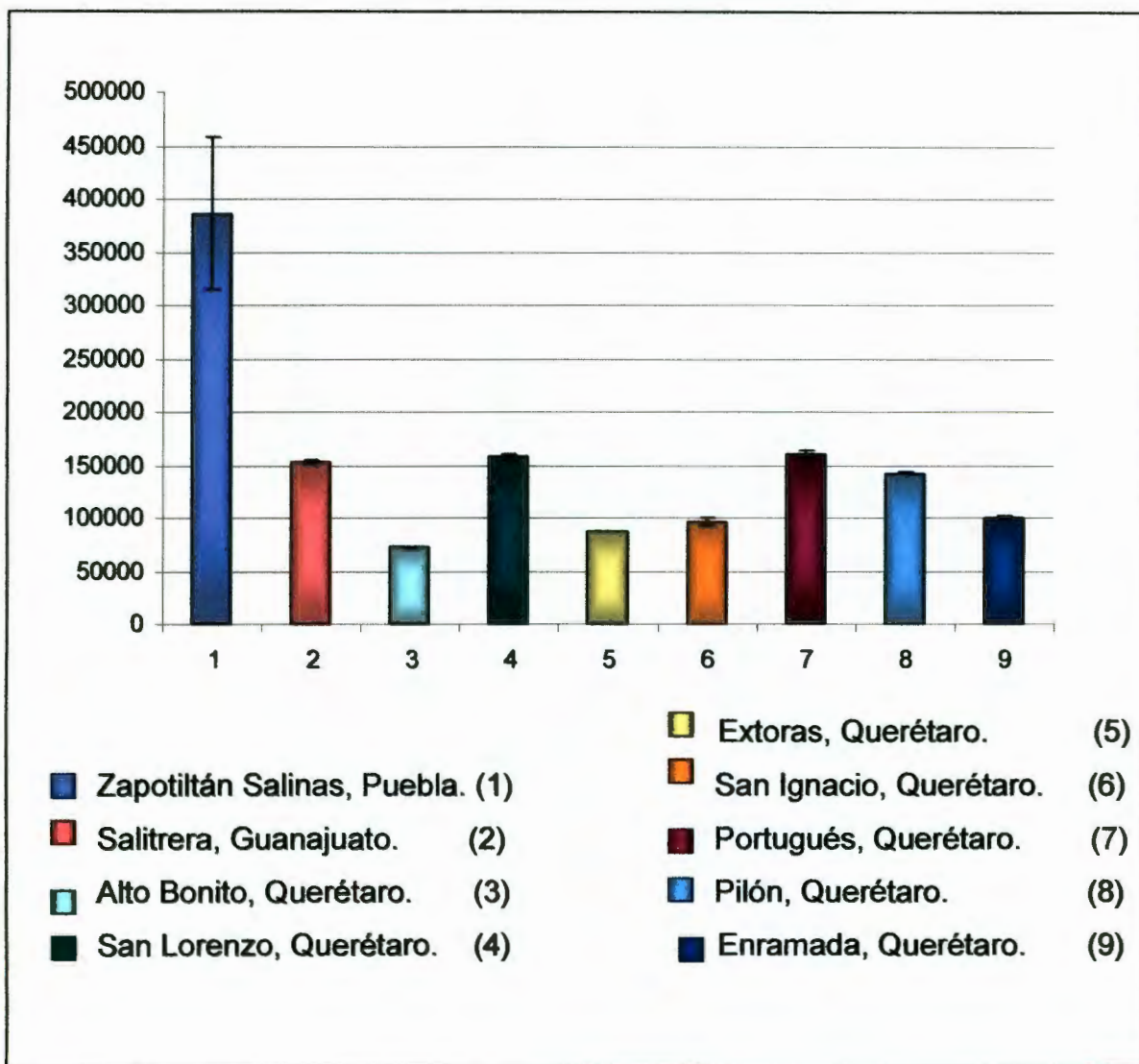


Figura 17.- Gráfica de los resultados de la cuantificación de los fenoles totales.

Al analizar los resultados de la gráfica anterior, se decidió convertirlos en porcentajes para tener una perspectiva diferente en cuanto al comportamiento de los datos obtenidos en este estudio, en el caso del estado de Querétaro se tomó en cuenta sólo el que contenía mayor y menor cantidad de fenoles, para llevar a cabo los diferentes análisis (Figura 18). Para ello, se asignó el 100% a la localidad que presentó mayor cantidad de fenoles y a partir de este se obtuvo el resto de los porcentajes.

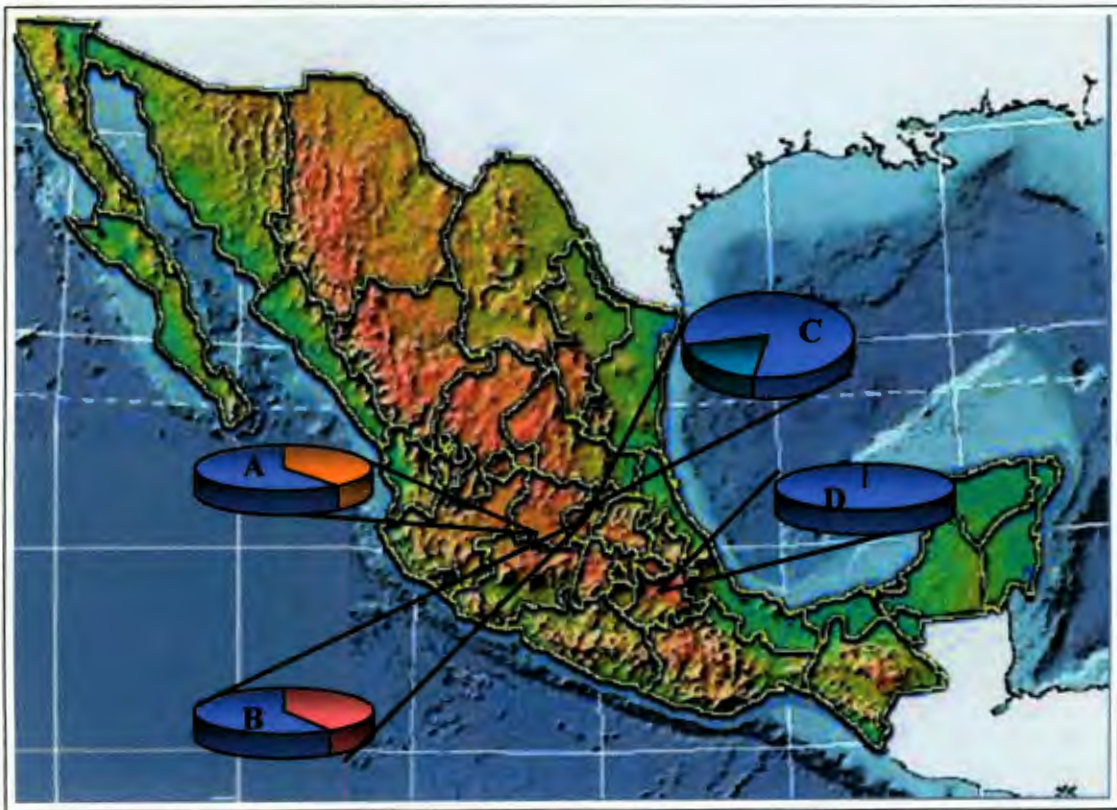


Figura 18.- Porcentajes de Fenoles totales por estado. A) Salitrera, Gto. 39.5%, B) Portugués, Qro. 41.4%, C) Alto Bonito, Qro.18.7%, D) San Juan Raya, Pue. 100%.

INEGI.

D. Determinación de flavonoides y ácido rosmarinico

Para la determinación de flavonoides y de ácido rosmarinico, se analizaron tres muestras de orégano, la de Guanajuato, Puebla y en el caso del estado de Querétaro, sólo se analizó la muestra de la localidad que presentó mayor cantidad de fenoles. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 7. En este cuadro también se muestran los resultados obtenidos de fenoles totales, esto con el fin de comparar dichos resultados, con la cantidad de flavonoides y ácido rosmarinico de cada localidad.

EXTRACTO	Contenido de fenoles Totales (mg de ácido gálico/100 g de extracto)	Flavonoides totales (mg de catequina / 100 g de extracto)	Ácido rosmarinico (mg de ácido rosmarinico / 100 g de extracto)
Zapotitlán Salinas, Puebla	21,206.4	16,747.43	2,236.00
Salitrera, Guanajuato	17,402.0	11,331.28	853.00
Portugués, Querétaro	18,249.6	16,554.85	5,791.00

Cuadro 7. Resultados de los fenoles, flavonoides y ácido rosmarinico.

E. Determinación de la actividad antioxidante

En cuanto al análisis de la actividad antioxidantes, sólo se muestran tres concentraciones de las 4 que se estudiaron (Figura 19), esto con el fin de facilitar la interpretación de los resultados.

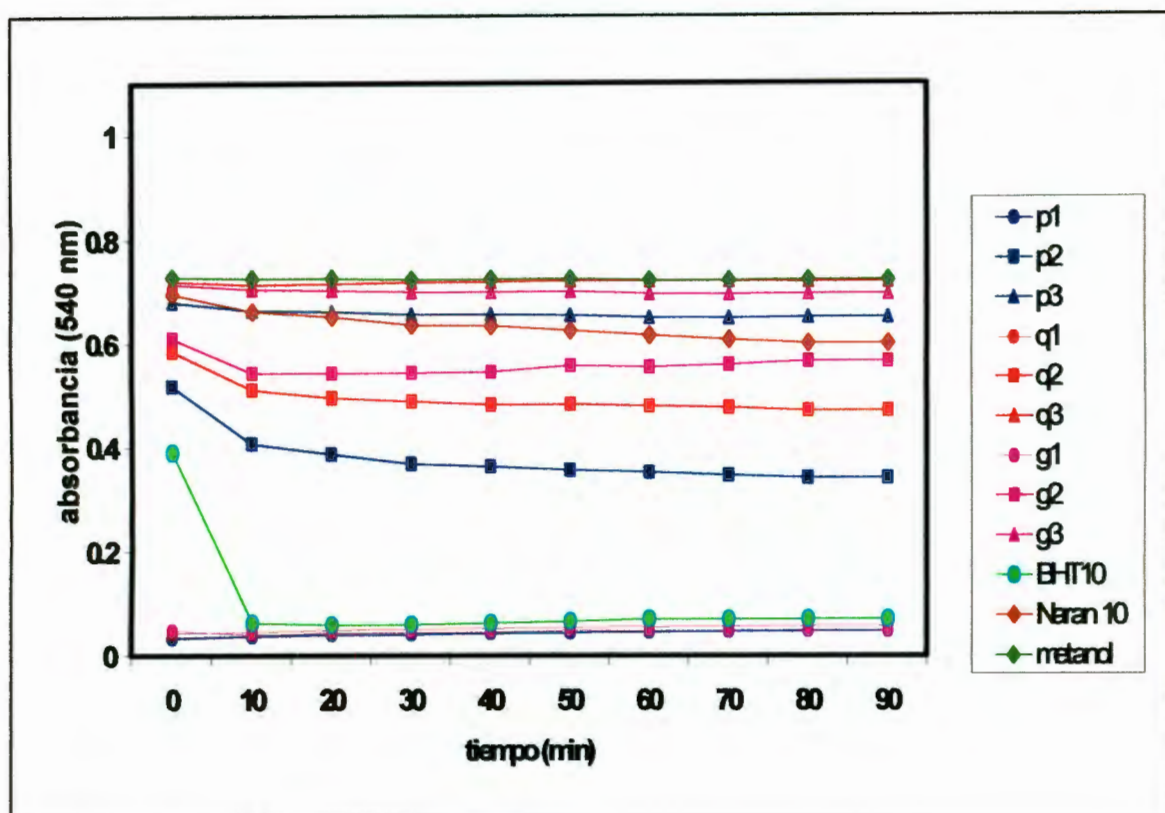


Figura 19. Actividad antirradical de extractos metanólicos, libres de aceite esencial, de orégano. Extracto de Puebla (P), extracto de Guanajuato (G), extracto de Querétaro (Q), p1,g1,q1= 1 mg/ml, p2,g2,q2 = 100 µg/ml, p3,g3,q3= 10 µg/ml, Naran= naringenina 1 mg/ml, BHT10 = 1 mg/ml.

IX. DISCUSIÓN

A. Estudio fenético

Así como Skoula y Harborne (2000), llevaron a cabo un estudio morfológico que les permitió clasificar infragenéricamente a *Origanum*, organizaron en tres grupos diferentes a este género, también clasificaron de una manera geográfica los diferentes grupos en los que se pueden observar las diversas especies del género *Origanum* en el Mediterráneo, y el comportamiento de este género a nivel geográfico e intrafamiliar. En contraste con este estudio, la investigación de las especies morfológicas que se llevó a cabo con *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth, determinó el comportamiento de esta especie a nivel geográfico e infraespecífico

Como podemos observar en los cuadros 5a-f, se obtuvieron datos de 18 estados diferentes, teniendo un total de 39 ejemplares analizados. Los ejemplares registrados para este estudio muestran una gran variedad de hábitats: el bosque tropical caducifolio, siendo éste el más común, el matorral xerófilo; selva mediana; bosque pino-encino; vegetación secundaria; sobre carreteras; matorral crasicaule y micrófilo; sobre rocas volcánicas y cultivadas en huertos.

También podemos observar que *Lippia graveolens* se presenta en diferentes altitudes que van desde los 50 m.s.n.m. aproximadamente, pasando por diferentes gradientes altitudinales, hasta 3000 m.s.n.m. Por lo que podemos inferir que esta especie, es una planta que se puede acoplar a diferentes hábitat así como a diferentes altitudes sin mayor problema, a pesar de los climas tan cambiantes que podemos encontrar en los hábitat ya mencionados anteriormente.

Probablemente esta diversidad tanto de hábitat como de nivel altitudinal en el que se encuentra el orégano, se deba a una alta diversidad genética o a una plasticidad fenotípica. Entendiendo como plasticidad fenotípica el concepto manejado por Stace (1980), en el que menciona que la plasticidad es el grado al cual un genotipo dado puede variar fenotípicamente bajo diferentes ambientes, esto es, la variación total (fenotípica y genotípica) de una especie o población. La plasticidad fenotípica, es decir la habilidad de un genotipo para expresarse como diferentes fenotipos de acuerdo a las condiciones ambientales, es muy común en plantas. Las respuestas plásticas no están confinadas a la morfología externa de las plantas, pues los caracteres químicos y anatómicos también son afectados.

En cuanto al dendrograma obtenido (Figura10), podemos ver claramente que se divide en 3 grupos. Dentro del primer grupo, se observan tres pequeñas subdivisiones. En donde la primera de ellas, esta compuesta por el estado de Coahuila, la segunda subdivisión esta conformada por los estados de Puebla, Querétaro, Hidalgo y Tamaulipas y la última subdivisión de este primer grupo incluye a los estados de Guanajuato, Guerrero, Querétaro, Tamaulipas, Jalisco y Sinaloa. Si analizamos la segunda subdivisión podríamos pensar que se trata de un arreglo geográfico, sin embargo, la tercera subdivisión y el grupo en su totalidad nos muestra que no es un arreglo geográfico, ya que presentan estados muy separados entre sí.

El segundo grupo está conformado por los estados de Guanajuato, Querétaro, Zacatecas, Tamaulipas y San Luis Potosí. Por último, el tercer grupo, está formado por los estados de Oaxaca, Querétaro, Puebla, Durango, Veracruz, Morelos, Guerrero, Michoacán y Sonora.

Como podemos observar hay dos estados en el centro del país que se presentan en los tres grupos dentro de este dendrograma, estos dos estados son: Guanajuato y Querétaro. Los estados de Puebla y Tamaulipas, aparecen en dos de los tres grupos. Por lo que, analizando este dendrograma, nos queda claro que

el arreglo no es a nivel geográfico, suponiendo que se trata de una variación a nivel genético.

Para poder analizar los datos desde otro punto de vista, decidimos obtener un nuevo dendrograma (figura 13), en el que sólo se incluyeron los estados de Puebla, Querétaro y Guanajuato. Esto con el fin de llevar a cabo un análisis que nos permitiera comparar los estados con los que se están trabajando directamente y los resultados obtenidos en los estudios químicos. En el segundo dendrograma (Figura 13), podemos observar un comportamiento similar al dendrograma anterior (Figura 10), ya que nuevamente se divide en dos grupos. Hay estados que se encuentran en diferentes conglomerados, como es el caso de Querétaro, en el que también, podemos observar el mismo comportamiento a nivel municipio, por ejemplo, Peñamiller, Qro.; que lo encontramos en diferentes grupos, este comportamiento, apoya la idea de que podría existir una variación a nivel genético y no geográfico como se esperaba observar.

Si llevamos a cabo una comparación entre los dendrogramas y los resultados de la determinación de fenoles totales, podríamos entender con mayor claridad, que a pesar de que las localidades se encuentren, ya no en el mismo estado, sino en el mismo municipio, hay una variación significativa, por lo que podemos llegar a la conclusión, de que probablemente estas diferencias sean por que existe un flujo genético importante a nivel especie.

Para asegurar que estas variaciones que observamos, se deben a que existe una gran diversidad genética o una plasticidad fenotípica, sería recomendable llevar a cabo diversos estudios, entre ellos un análisis a nivel genético. Dichos estudios serían con el fin de afirmar que las variaciones que observamos son un efecto a nivel fenético y no un efecto ambiental, ya que probablemente podría tomarse como un factor importante que estuviera involucrado con los resultados obtenidos.

B. Cromatografía en capa fina.

El análisis de la cromatografía en capa fina en cloroformo usando estándares de carvacol, timol y *p*-cumeno reveló la ausencia de estos componentes en los extractos metanólicos. El perfil cromatográfico en capa fina de los extractos metanólicos sugiere que el contenido de metabolitos secundarios no es idéntico (Figura 15 y 16). Por lo que nos da la pauta, para iniciar el análisis de la determinación de fenoles y flavonoides totales, utilizando los extractos de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth, teniendo la seguridad que no se encontraran compuestos de aceites esenciales.

C. Determinación de fenoles.

Se colectaron muestras en las localidades de San Juan Raya, Pue.; Salitrera, Gto.; Alto Bonito, Qro.; San Lorenzo, Qro.; Extoras, Qro.; San Ignacio, Qro.; Portugés, Qro.; Pílon, Qro.; Enramada, Qro. (todas las localidades del estado de Querétaro se encuentran en el municipio de Peñamiller). De las nueve muestras, la que contiene mayor cantidad de compuestos fenólicos es la muestra de la localidad de San Juan Raya, Pue. (Figura 17); orégano que de acuerdo a una investigación paralela contiene la mayor cantidad de aceites esenciales.

Analizando la cantidad de estos compuestos en las diferentes localidades del estado de Querétaro, podemos percatarnos que una de ellas (Portugués) ocupa el segundo lugar en cuanto a contenido de fenoles; por el contrario, la localidad de Alto Bonito contiene la menor cantidad de compuestos fenólicos. Entre las demás localidades del estado de Querétaro y a pesar de que se encuentran dentro del mismo municipio, la cantidad de compuestos fenólicos varía significativamente entre ellas.

Para tener otro punto de vista analítico, se decidió convertir los valores de la cantidad de fenoles a porcentajes (Figura. 18), así podemos observar que los estados que están más al norte de la República Mexicana presentan un porcentaje menor de fenoles en comparación al estado que se encuentra hacia el sur. Por lo que el realizar estudios más amplios nos podría ofrecer una visión más completa en relación al comportamiento de los compuestos químicos del orégano con respecto a su localización geográfica.

La importancia de haber determinado la cantidad de compuestos fenólicos en *Lippia graveolens* y haber encontrado una cantidad significativa en algunas de las localidades en estudio, es que estos resultados nos dan la pauta para realizar diferentes investigaciones, en cuanto a la composición química del orégano. Como ya ha sido mencionado dentro de este trabajo, los compuestos fenólicos presentan actividades farmacológicas importantes como es la actividad antioxidante y actividades anticarcinogénicas, como el caso del ácido rosmarinico (Salisbury y Ross, 1994).

Una forma de enriquecer la información obtenida, a partir de los resultados reportados dentro de este proyecto, sería determinar el tipo de fenoles de los que se componen los extractos de *Lippia graveolens*, y con la ayuda de estos resultados se podría analizar desde el punto de vista taxonómico, esto con el fin de obtener una mayor información sobre el orégano.

D. Determinación de flavonoides y ácido rosmarinico

A las tres muestras de orégano con mayor contenido de fenoles se les determinó el contenido de flavonoides y ácido rosmarinico (Cuadro 7). En el caso del contenido de flavonoides, nuevamente observamos que el orégano que presenta mayor cantidad de estos compuestos, es el de la localidad de Zapotitlán Salinas, Puebla; seguido por la localidad de Portugués, Querétaro. Por el contrario, la localidad de Salitrera, Guanajuato, comparada con las otras dos

localidades presenta una cantidad mucho menor de flavonoides, pero aun así están presentes estos compuestos en esta localidad.

Debido a que la información de flavonoides en *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth es escasa, estos datos son una aportación importante para estudios posteriores sobre esta especie, ya que tienen una actividad farmacológica importante. Por lo que consideramos que se deberían realizarse estudios más específicos sobre estos compuestos para obtener una información completa sobre las propiedades de *Lippia graveolens*.

Exarchou *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio con *Origanum vulgare*. Como resultado obtuvieron 1271 (mg ácido rosmarinico /100 g de extracto). Cabe mencionar que para determinar la cantidad de ácido rosmarinico, utilizamos la misma metodología que llevaron a cabo Exarchou *et al.* (2002) en dicho estudio. Comparándolo los resultados obtenidos para dicho estudio, con los resultados que obtuvimos para *Lippia graveolens*, sólo las localidades de Querétaro y Puebla superan en cantidad de éste compuesto a *Origanum vulgare*. Por lo que podemos concluir de manera preliminar, que *Lippia graveolens* presenta una mejor calidad en cuanto a compuestos fenólicos que *Origanum vulgare*.

Para los resultados del ácido rosmarinico, la muestra de la localidad que presenta mayor cantidad de éste compuesto es Querétaro, posteriormente la muestra de la localidad de Puebla y por último la muestra de la localidad de Guanajuato. Indiscutiblemente, el extracto de la planta de la localidad de Guanajuato; en los dos caso, tanto en la determinación de flavonoides como en el de ácido rosmarinico; presenta la menor cantidad de estos compuestos.

Ya que los flavonoides que se presentan en especies relacionadas de un género dan a los taxónomos información que puede utilizarse para clasificar y determinar las líneas de evolución vegetal (Salisbury y Ross, 1994). Se podría determinar con mayor especificidad los flavonoides presentes en *Lippia*

graveolens para utilizarlos como marcadores fitoquímicos y realizar mayores estudios a nivel taxonómico.

E. Determinación de la actividad antioxidante

Exarchou *et al.*, (2002) determinaron la actividad antioxidante de *Origanum vulgare*, utilizando el ensayo de DPPH, mismo que se utilizó para determinar la actividad antioxidante de *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth. Los resultados que se obtuvieron en ese estudio, fueron que, efectivamente *Origanum vulgare* presenta actividad antioxidante importante. Aunque no podemos comparar las cantidades obtenidas de esta actividad entre *Origanum vulgare* y *Lippia graveolens*, ya que las unidades en que están medidas son diferentes, si podríamos inferir que las dos especies tanto *Origanum vulgare* como *Lippia graveolens*, presentan actividad antioxidante importante.

El potencial antioxidante de los tres extractos metanólicos fue evaluado de manera preliminar a través de su capacidad para secuestrar los radicales libres mediante el ensayo de DPPH. Se utilizó BHT, Trolox y naringenina como controles. A una concentración de 1 mg/mL, los tres extractos de orégano y el BHT presentan una actividad antirradical equivalente. A la misma concentración la naringenina, flavonoide aislado de la especie, presentó una actividad mucho menor. La actividad antirradical es dependiente de la concentración. A concentraciones mayores se observa que el extracto de la localidad del estado de Puebla demuestra mayor actividad que la observada para los extractos de Guanajuato y Querétaro.

Se esperaría que en estudios próximos, ésta actividad antioxidante podría determinarse de manera *in vivo*, y algunos otros estudios que nos permitiera observar el comportamiento de ésta actividad en ausencia o presencia de otros compuestos, ya que podría darse el caso que en presencia de algún compuesto tenga esta actividad pero en ausencia del mismo se inhiba la actividad

antioxidante, pero eso sólo se podría determinar con estudios mucho más específicos.

X. CONCLUSIONES

Analizando el comportamiento de los resultados obtenidos en el estudio fenético, se concluye, que hay una variación genética o fenotípicamente, que afecta significativamente a *Lippia graveolens* Humb.; Bompl. & Kunth tanto en su morfología como en su composición química. Gracias a los análisis llevados a cabo a partir de los resultados obtenidos, la metodología utilizada para llevar a cabo la extracción de compuestos, es específica para eliminar los compuestos del aceite esencial. Los resultados obtenidos en la determinación de fenoles, muestran que a pesar de que las plantas en estudio son de la misma especie, éstas presentan diferentes cantidades de compuestos fenólicos, aún estando en el mismo municipio. Realizando una comparación de la proporción de la cantidad de flavonoides y ácido rosmarinico, de cada localidad, con respecto a la cantidad de fenoles, se observa que para la localidad de Zapotitlán Salinas, Pue., el 78.97% de los compuestos fenólicos son flavonoides y 10.54% ácido rosmarinico. Para la localidad de Salitrera, Gto. 65.11% pertenecen a los flavonoides y sólo el 4.9% al ácido rosmarinico. Por último, en el caso de Portugués, Qro., el 90.71% de los compuestos fenólicos reportados, son flavonoides y el 31.73% ácido rosmarinico. Por lo que se concluye que la mayoría de los compuestos fenólicos encontrados en *Lippia graveolens*, son flavonoides y en cuanto al ácido rosmarinico, lo podemos encontrar en diferente proporciones pero no mayor a los flavonoides.

Analizando la cantidad de fenoles, flavonoides y ácido rosmarinico, se concluye que el orégano de la localidad de Puebla contiene mayor cantidad de compuestos de naturaleza fenólica. La cuantificación de flavonoides totales indica que prácticamente el orégano de Puebla y el de Querétaro contienen la misma cantidad. En cuanto al contenido de ácido rosmarinico (componente del orégano europeo), el orégano de Querétaro es el de mayor contenido.

Con respecto a la determinación de la actividad antioxidante, se puede observar que efectivamente todas las poblaciones presentan dicha actividad. Como era de esperarse, el que muestra mayor actividad, fue la localidad del estado de Puebla, ya que esta localidad, fue el que presentó la mayor cantidad de fenoles y flavonoides. Otro punto importante que se puede observar en estos resultados, es que a mayor concentración de extracto, mayor fue la actividad antioxidante que muestra dicha localidad. Por lo que se concluye, que la localidad de Zapotitlán Salinas, Puebla; es la que presenta una mayor calidad de compuestos fenólicos, ya que es la localidad que muestra mayor cantidad de fenoles, flavonoides y presenta una actividad antioxidante importante, comparada con las otras dos localidades en estudio.

Como conclusión final, debido a que existe una relación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, con los aspectos morfológicos de *Lippia graveolens*, se puede determinar que hay un flujo genético o plasticidad fenotípica importante dentro de ésta especie y esto da como resultado una variación taxonómica a nivel infraespecífico.

XI. Bibliografía

Almeida Martínez R. 1991. CENID-RASPA-INIFAP-Comarca Lagunera “Los oréganos de México como especia según se reportan en la literatura mundial”. Estado actual del conocimiento sobre El Orégano en México. Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Academia Nacional de Ciencias Forestales. Documentos presentados en la Primera Reunión Nacional sobre Orégano. Bermejillo, Dgo., México. Ed. Meléndez González R., Ortega Rodríguez S. A. y Peña Resendiz R. Pp. 41-42.

Arroyo Frías H., 1985. Verbenaceae in “Flora Fanerogámica del Valle de México”. Tomo II. Rzedowski J. C de Rzedowski G. (eds) Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional, para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán) 1406pp. pp. 279 – 283.

Cáceres, A., Fletes, L., Aguilar, L., Ramírez, O., Figueroa, L., Teracena, A. M., Samayoa, B., 1993. “Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorder”, Journal of Ethnopharmacology, 38, 31-38.

Catalan C. A. N. and Lampasona M. E. P. 2002. “The chemistry of the genus Lippia (Verbenaceae)”. Orégano, the genera Origanum and Lippia. Por: Taylor and Francis: Ed. Spiridon E. Kitzios. Pp. 127 – 149.

Cavazos Doria J. R. 1991. INFAP-CIFAP-B.C.S. “Características ecológicas y producción de orégano (Lippia berlandieri Schauer en poblaciones naturales”. Estado actual del conocimiento sobre El Orégano en México. Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Academia Nacional de Ciencias Forestales. Documentos presentados en la Primera Reunión Nacional

sobre Orégano. Bermejillo, Dgo., México. Ed. Meléndez González R., Ortega Rodríguez S. A. y Peña Resendiz R. Pp. 41-42.

Compadre, C. M., Robins, E. F., Kinghorn, D., 1986. "The intensely sweet herb, *Lippia graveolens* H.B.K. Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents", *Journal of Ethnopharmacology*, 15, 89-106.

Del Baño, M. J., Lorente, J., Castillo, J.; Benavente-García, O., Del Río, J. A., Ortuño, A., Quirin, K-W., Gerard, D. 2003. " Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant activity" *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4247-4253.

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Lui, R. H. J. 2002. "Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity" *Agric. Food Chem.*, 50, 3010-3014.

Domínguez X. A., Sánchez, H., Suárez, M., Baldas, J. H., González M. R., 1998. "Chemical constituents of *Lippia graveolens* H.B.K.", *Planta Medica*, 55, 208-209.

Exarchou V.; Nenadis N.; Tsimidou M.; Gerothanassis I. P.; Troganis A.; and Boskou D. 2002. "Antioxidant activities and Phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory". *Journal of agricultural and food chemistry*. 50, 5294-5299.

Forestieri, A. M., Monforte, M. T., Ragusa, S., Trovato, A., Iauk, L., 1996. "Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in Africa medicine" *Phytotherapy Research*, 10, 100-106.

Fukumoto L. R. and Mazza, 2000. "Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds". Journal of agricultural and food chemistry. Canadá Vol. 48, No. 8 pp. 3597 – 3604.

Jadhav, S. J.; Nimbalkar, S. S.; Kulkarni, A. D.; Madhavi, D. L. 1996. "Lipid oxidation in biological and food systems". In Food Antioxidants; Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., Salunkhe, D. K., Eds.; Dekker: New York, pp 5 – 53..

Kintzios S. E. 2002. "*Profile of the multifaceted prince of the herbs*". Oregano, the genera Origanum and Lippia. Por: Taylor and Francis: Ed. Spiridon E. Kitzios. Pp. 2 – 8.

Maldonado Aguirre L. J. 1991. INIFAP-CIFAP-Nuevo León. "*Descripción botánica, distribución y usos del orégano en México*". Estado actual del conocimiento sobre El Orégano en México. Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Academia Nacional de Ciencias Forestales. Documentos presentados en la Primera Reunión Nacional sobre Orégano. Bermejillo, Dgo., México. Ed. Meléndez González R., Ortega Rodríguez S. A. y Peña Resendiz R. Pp. 41-42.

Marco, G. J. 1968. "A rapid method for evaluation of antioxidants". J. Am. Oil Chem. Soc. 45, pp 594-598.

Morton, 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America, vol. I Springfield, Illinois, USA, 745-750.

Nash D. L. y Nee M. 1984. "Flora de Veracruz" Verbenaceae. Fascículo 41. Xalpa, Veracruz .pp. 88-89.

Orellana R.; Escamilla J. A. y Larqué Saavedra A. 1999. "Ecofisiología Vegetal y Conservación de recursos genéticos" Ed. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., México. Pp. 187-205.

Platnick N. I. And Funk V. A. (Eds) 1983. "The logical basis of phylogenetic analysis" Advances in cladistics, vol. 2 Columbia u. Press. Pp. 27-30.

Quicke D. L. J., 1993. Principles and techniques of contemporary taxonomy, Blackie academic and professional, first edition, EUA, Pp. 85 – 97.

Rastrelli L., Caceres A., Morales C., De Simone F. y Aquino R., 1998. "Iridoides de *Lippia graveolens* H.B.K.". Phytochemistry. Gran Bretaña Vol. 49, No. 6 pp. 1829-1832.

Rzedowski J. y Calderón de R. G., 2002. "Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes" Fascículo 100. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán. México. Pp.78-79.

Salgueiro L. R.; Cavaleiro C.; Gonçalves M. J.; 2003. Proença de Cunha A. "Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oil of *Lippia graveolens* H.B.K. from Guatemala". New York. Planta Medica 69:80-83.

Salisbury F. B. Y Ross C. W., 1994. "Fisiología vegetal". México. Ed. Iberoamérica. Pp. 351-358.

Shahidi, F. ; Wanasundara, P. K. J. P. D. 1992. "Phenolic antioxidants" Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 32, Pp. 67 – 103.

Skoula M. and Harborne J. B., 2002. "The taxonomy and chemistry of *Origanum*". Oregano, the genera *Origanum* and *Lippia*. Por: Taylor and Francis Ed. Spiridon E. Kitzios. Pp. 67 – 78.

Stace, C.A. 1980. "Plant taxonomy and biosystematics. Edward Arnold Publishers. London.

Stuessy T. F., 1990 . "Plant Taxonomy", University press, New York.

Vázquez Cota J. 1991. INIFAP-CIFAP-Baja California Sur. "*Propagación vegetativa de orégano (Lippia palmeri s. wats) por medio de enraizamiento de estacas* Estado actual del conocimiento sobre El Orégano en México. Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Academia Nacional de Ciencias Forestales. Documentos presentados en la Primera Reunión Nacional sobre Orégano. Bermejillo, Dgo., México. Ed. Meléndez González R., Ortega Rodríguez S. A. y Peña Resendiz R. Pp. 41-42.