



**Benemérita y Centenaria Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo**



Facultad de Químico Farmacobiología

**Detección de metabolitos secundarios moduladores
de resistencia bacteriana en aceites esenciales de
Tagetes lucida con diferente composición química**

T E S I S

Que para obtener el título de Químico Farmacobiólogo

PRESENTA:

Agustín Moreno León

**Director de tesis: Dr. Francisco J. Espinosa García
Co-Director de tesis: Biol. Yolanda Magdalena García Rodríguez**

COMITÉ DE REVISORES:

**D.C. Guadalupe Torres Gurrola
D.C. Rafael Salgado Garciglia
D.C. Rafael Torres Martínez
D.C. Yesenia Martínez Díaz
M.C. Karla Gabriela Domínguez González**

Morelia, Michoacán, Noviembre 2019

***Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad UNAM, Laboratorio de
Ecología Química y Agroecología, Campus Morelia.***

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mis Padres, Hermana, Abuelos, Tíos por siempre apoyarme en este camino, por que al principio y al final quien siempre esta con Tigo es tu familia

Agradecimientos

Agradezco al Director de Tesis Dr. Francisco J. Espinosa García y al Co-asesor Biol. Yolanda Magdalena García Rodríguez de la comisión revisora D.C. Guadalupe Torres Gurrola, D.C. Rafael Salgado Garciglia, D.C. Rafael Torres Martínez, M.C. Karla Gabriela Domínguez González y a la D.C Yesenia Martínez Díaz para recibir el grado de Químico Farmacobiólogo

Agradezco al Proyecto DGAPA-UNAM PAPIIT (IG200514); IIES-UNAM POFJEG y fondos personales del Dr. Francisco J. Espinosa García que financiaron este trabajo.

Agradecimientos personales

Agradezco a Dios que da vida por el simple hecho de existir y por permitirme llegar a este momento, siempre hay que ser agradecidos y yo lo estoy con él, porque no hay coincidencias sino Diosidencias y él es el que me permitió coincidir en el camino con las personas correctas.

Agradezco de todo corazón a mis Padres Agustín Moreno Paredes y Marisela León García por siempre estar para mí, con sus consejos con su forma de ver el mundo muy diferente a la de muchos padres, por hacerme una persona de bien, los amo y estoy demasiado agradecido por darme la oportunidad que a muchos se les ha facilitado y la menosprecian, pero también para muchos es negada. Gracias por permitirme estudiar y cumplir un sueño que sé que no solo es mío y por el que han luchado como guerreros que son para ayudarme a conseguirlo

Agradezco inmensamente a la Bióloga Yolanda Magdalena García Rodríguez por ayudarme en todo este proceso de titulación desde que inicio hasta este momento que concluye, facilitándome el equipo y materiales así como su tiempo y conocimiento para resolver cualquier duda que tuviera, siempre impulsándome a concluir con este proceso revisando y asesorándome.

Agradezco a mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo desde que inició esta aventura y a los que fui conociendo durante el transcurso de esta, pues sin ustedes este aprender diario no hubiera sido igual gracias, por desvelarse conmigo estudiando, y por acompañarme a disfrutar de esos bonitos eventos que en la facultad se hacen año con año, gracias por tenerme paciencia pues soy muy distraído y a veces eso causa problemas. También doy gracias a los amigos, que ya no están en este plano físico, *Fernando dueñas y Rolando* mientras estuvieron fue ejemplo para mí, los estimo mucho a todos y solo puedo decir que estoy infinitamente agradecido con todos ustedes porque muchos son los que conocí, pero pocos los que en realidad me aprecian.

Agradezco a Rita y Darwin porque soy parte de una familia que ellos han formado, que mientras he estado aquí en Morelia me han enseñado que la familia no solo es tu familia de sangren sino los amigos que elijes, dentro de ellos están Nancy y familia los aprecio de todo corazón muchas gracias.

Índice

Índice de figuras	III
Índice de tablas	V
Glosario	VI
Abreviaturas.....	VIII
Resumen.	IX
Abstract	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Resistencia bacteriana	3
2.2.-Mecanismos de resistencia bacteriana	4
2.3.-Principales bacterias con resistencia a antibióticos en el mundo	6
2.4.-Principales bacterias con resistencia a antibióticos en México	7
2.5.-Tratamientos nuevos para cepas multirresistentes	8
2.6.-En busca de nuevos antibióticos	9
2.7.-Metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana	9
2.8 Variación fitoquímica de MS en plantas	12
2.9 Material vegetal	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	14
4.1 Predicciones	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general.	15
5.2 objetivos específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	16
6.1. Colecta del material vegetal.	16
6.2.- Extracción de aceite esencial.	16
6.3.-Análisis químico del aceite esencial	17
6.4.- Microorganismos usados y condiciones de crecimiento.	18
6.5.- Antimicrobianos usados.	19

6.6.-Ensayos preliminares.....	19
6.6.1- Antibiogramas.....	19
6.6.2- crecimiento de cepas en medios selectivos	20
6.6.3 Bioensayo de bioprospección de inhibición a la resistencia (método de difusión en Agar en disco).....	21
6.6.4 -Bioensayo de bioprospección antimicrobiano con AE por el método de micro dilución en agar.....	22
6.7.- Bioensayo de bioprospección de la inhibición de la resistencia a antibióticos.	25
6.7.1 Método de micro dilución en agar.....	25
6.7.2 Método Bioautografía.	26
7. RESULTADOS	30
7.1 Composición química de los aceites esenciales	30
7.2 Antibiograma	34
7.3 Bioprospección de inhibición a la resistencia a antibióticos con Método de Kirby-Bauer... ..	35
7.4 Bioensayo de bioprospección de la inhibición de la resistencia a antibióticos método de micro diluciones en placa de Elisa (parte 1)	35
7.5 Bioensayo de bioprospección de la inhibición de la resistencia a antibióticos con el método de micro diluciones en placa de Elisa, (parte 2).....	39
7.6 Bioautografía.	49
8.-DISCUSIÓN	52
8.1 Variación en la composición química	52
8.2 Método difusión de Kirby-Bauer.....	52
8.3 Actividad antibacteriana e inhibidora de la resistencia bacteriana.....	53
8.4 Identificación parcial de metabolitos secundarios activos.....	55
9.-CONCLUSIONES	56
10.- RECOMENDACIONES.	56
11.-ANEXOS.....	58
11.1.- Cromatoplasmas de bioautografía.....	58
11.2.- Cromatograma de las fracciones donde se encontraron halos de inhibición bacteriana en cromatoplasmas.....	61
12.-BIBLIOGRAFIA.....	67

Índice de figuras

Figura. 1. Resistencia adquirida 1(conjugación), 2(transducción), 3(transformación).....	4
Figura 2. Mecanismos de defensa bacterianos	6
Figura. 3 <i>T. lucida</i> recolectada en Tacícuaru.....	13
Figura.4 A. Extracción del aceite esencial de <i>T. lucida</i> por arrastre de vapor.....	17
Figura.4 B. Separación de AE fase acuosa de fase orgánica en embudo de separación.....	17
Figura.4 C. Concentración de AE con nitrógeno gaseoso.	17
Figura 5. Antibióticos usados en método de micro diluciones en agar	19
Figura 6 A. <i>S. aureus</i> AVC-19 en gelosa sal y manitol 37 °C de 18 A 24 h.....	20
Figura 6 B. <i>S. aureus</i> ATCC29213 en gelosa sal y manitol 37 °C de 18 A 24 h.....	20
Figura 6 C. <i>P. aeruginosa</i> HIM en gelosa Mac-Conckey 37 °C de 18 A 24 h.....	21
Figura 6 D. <i>E. coli</i> ATCC53228 en gelosa Mac-Conckey 37 °C de 18 A 24 h.....	21
Figura 6 E. <i>K. pneumoniae</i> HIM en gelosa Mac-Conckey 37 °C de 18 A 24 h.....	21
Figura.7 A. Efecto de AE.U.15 contra <i>S. aureus</i> ATCC29213 (B1), <i>P. aeruginosa</i> HIM (B2) Y <i>K. pneumoniae</i> BLEES (+) (B3) en placa de Elisa micro diluciones.....	24
Figura.7 B. Pozo de microplaca sin crecimiento microbiano visto desde estereoscopio.....	24
Figura.7 C. Pozo de microplaca con crecimiento microbiano visto desde estereoscopio.....	24
Figura.8 Tratamientos de microdiluciones en agar.....	25
Figura.9 Cromatografía en placa fina en sistema de elución hexano-acetato de etilo 80%-20%.....	27
Figura.10. Placas reveladas con luz UV de los tres aceites esenciales.....	28
Figura.11. Placa revelada con sulfato sérico amoniaco de AE.U.15.	28
Figura 12. Inoculación e incubación de las placas cromatográficas a 37°C.	28
Figura.13. Raspado de placa cromatográfica muestras preparadas para la inyección en GS-MS.....	29
Figura.14. Cromatogramas de AE de <i>T. lucida</i>	33
Figura.15. Antibiograma de <i>E. coli</i> ATCC53228.	34
Figura.16. Antibiograma de <i>K. pneumoniae</i> con aceites de <i>T. lucida</i> en combinación con VA, C, y CC.....	35
Figura 17.A Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de cinco cepas vs AE.U.15 (AE1), AE.U.16 (AE2) y AE.T.16 (AE3).	37
Figura 17.B Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de cinco cepas vs AE.U.15 (AE1), AE.U.16 (AE2) y AE.T.16 (AE3).	37
Figura 17.C Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de cinco cepas vs AE.U.15 (AE1), AE.U.16 (AE2) y AE.T.16 (AE3).	38

Figura 18. Microdiluciones en placa de Elisa de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 vs AE.U.16 revelada con TTC	39
Figura 19.A Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC29213 vs aceites esenciales.....	40
Figura 19.B Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC29213 vs aceites esenciales.....	41
Figura 19.C Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC29213 vs aceites esenciales.....	42
Figura 19.D Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC29213 vs aceites esenciales.....	42
Figura 19.E Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC29213 vs aceites esenciales.....	43
Figura 19.F Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>S. aureus</i> ATCC29213 vs aceites esenciales.....	43
Figura 20. Microdiluciones en placa de Elisa de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs AE.U.16 revelada con TTC y sus tratamientos	44
Figura 21.A Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs aceites esenciales de T. lucida solos AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16 y en combinación con antibióticos: Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA).....	45
Figura 21.B Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs aceites esenciales de T. lucida solos AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16 y en combinación con antibióticos: Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA).....	46
Figura 21.C Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs aceites esenciales de T. lucida solos AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16 y en combinación con antibióticos: Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA).....	46
Figura 21.D Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs aceites esenciales de T. lucida solos AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16 y en combinación con antibióticos: Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA).....	47
Figura 21.E Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs aceites esenciales de T. lucida solos AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16 y en combinación con antibióticos: Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA).....	47
Figura 21.F Diferencias en el crecimiento bacteriano de <i>P. aeruginosa</i> HIM vs aceites esenciales de T. lucida solos AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16 y en combinación con antibióticos: Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA).....	48

Figura.22. Bioautografía. (a) cromatoplacla revelada en lámpara UV, (b) cromatoplacla revelada con TTC	49
Figura 23. Fracciones identificadas de AE.U.15 (A), AE.U.16 (B), AE.T.16 (C) en cromatografía de gases	50
Figura 24 -32 Cromatoplaclas de bioautografía.....	58-60*
Cromatogramas de las fracciones donde se encontraron halos de inhibición bacteriana en cromatoplaclas.....	55-60

Índice de tablas

Tabla1. Antibióticos utilizados en antibiograma para corroborar la resistencia a antibióticos.....	20
Tabla2. Dosis por pocillo en placa Elisa de 96 pozos.....	23
Tabla 3. Concentración del antibiótico en cada pozo de la microplaca expresado ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	26
Tabla 4. Composición química de aceites esenciales T. lucida	30
Tabla 5. Halos de inhibición (mm) producidos por antibióticos en antibiogramas realizados a las diferentes cepas bacterianas utilizadas.....	34
Tabla 6. CMI en bioensayos de prospección de la inhibición a la resistencia bacteriana por aceites esenciales.....	36
Tabla 7. CMI de AE para <i>S. aureus</i> ATCC29213 en mg/ml; AE Uruapilla 2015(AE.U.15); AE Uruapilla 2016(AE.U.16); AE Tacícuaró 2016(AE.T.16); ampicilina (AMP); vancomicina (VA).....	39
Tabla 8. CMI de AE para <i>P. aeruginosa</i> HIM en mg/mL; AE Uruapilla 2015 (AE.U.15); AE Uruapilla 2016(AE.U.16);.....	42
Tabla 9. Metabolitos secundarios encontrados en halos de inhibición causados por AE Uruapilla 2015 (AE.U.15); AE Uruapilla 2016(AE.U.16).....	42

Glosario

Aceite esencial: Son mezclas complejas de compuestos (MS) principalmente terpenos y alcoholes, se encuentran en flores, hojas, cascara y semillas de algunas plantas, son los responsables del olor característico de estas.

Metabolitos secundarios: Compuesto orgánicos sintetizados en el metabolismo secundario de un organismo vivo.

Cromatografía de gases: Es una técnica cromatográfica de separación donde la muestra se volatiliza por medio de un mechero y pasa a través de una columna cromatográfica, la elución es producida por medio de un gas inerte el cual no interacciona con el analito solo lo transporta a través de la columna.

Espectrometría de masas: es una herramienta enfocada en la separación de especies moleculares y atómicas de acuerdo a su masa, esta técnica es usada para la identificación de unidades elementales hasta compuestos muy complejos como las proteínas

Antibiograma: método que determina la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos.

Bioprospección: Se define como la búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros productos que poseen un valor económico actual o potencial, y que se encuentran en los componentes de la diversidad biológica

Bioensayo: Técnica de valoración biológica basada en el crecimiento de un organismo

Bacteria: organismo unicelular de tipo procarionte los cuales no tienen membrana nuclear los cuales solo se pueden observar al microscopio

Cepa; conjunto de bacterias de la misma especie que se alojan en un mismo lugar

Inocular: viene del latín, que significa infundir inculcar o introducir en este caso es introducir bacterias a un nuevo medio de cultivo

Incubar: mantener a una temperatura de calor constante donde el organismo se pueda desarrollar

Buffer: Es una o varias sustancias químicas que afectan a la concentración de los iones de hidrógeno (o hidronios) en el agua amortiguando el PH de las sustancias

Curva de crecimiento: Resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación

Termo-mezclador: aparato el cual puede mantener a una cierta temperatura una muestra en constante movimiento al mismo tiempo.

Medio selectivo: Es un medio de cultivo en el que sólo puede crecer un tipo de microorganismo.

Medio diferencial: Medio de cultivo que es capaz de distinguir dos microorganismos por su crecimiento diferencial en el mismo, usando las propiedades metabólicas de ambos en presencia de un determinado nutriente y de un indicador que evidencia.

Escala McFarland: es un patrón de turbidez que indica una cierta Concentración de bacterias y que se utiliza para ajustar la turbidez en varios métodos utilizados en microbiología.

Abreviaturas

AE: Aceite Esencial

AE.U.15: Aceite esencial de *Tagetes lucida* colectada en Uruapilla en 2015

AE.U.16: Aceite esencial de *Tagetes lucida* colectada en Uruapilla en 2016

AE.T.16: Aceite esencial de *Tagetes lucida* colectada en Tacúcuaro en 2016

MS: Metabolitos secundarios

AMP: Ampicilina

VA: Vancomicina

C: Cloranfenicol

NA: Ácido Nalidíxico

CG-EM: Cromatógrafo De Gases Acoplado a Espectrómetro De Masas

CG: Cromatógrafo De Gases

EM: Espectrómetro De Masas

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

RF: Factor de retención del analito con respecto al eluyente

Vs: Versus O Contra

UV: Luz Ultravioleta

UFC: Unidades Formadoras De Colonias

HIM: Hospital Infantil De Morelia

:

Resumen.

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios (MS) que las defienden contra sus enemigos naturales (animales y microorganismos), mismos que responden a esos MS empleando contra-defensas. A su vez, las plantas responden a los enemigos naturales con nuevos MS, o mezclas de ellos, sustancias tóxicas o que inhiben dichas contra-defensas. Con estos mecanismos de defensa las plantas proveen los MS que son usados como fármacos o como base para el desarrollo de nuevos medicamentos. *T. lucida* es una maleza empleada en medicina tradicional como antidiarreico, antidisentérico y antibiótico en infecciones respiratorias, sin embargo, su composición química es variable y no se sabe si esa variabilidad afecta su uso antibiótico. Este trabajo es parte de un proyecto donde se predice que dentro de estas defensas de las plantas se encuentran inhibidores de resistencia a antibióticos. Por lo que los estudios estuvieron encaminados a determinar si se cumple esta predicción, evaluando el efecto de aceites esenciales de *T. lucida* en bacterias resistentes a antibióticos, probando los aceites esenciales de *T. lucida* por separado y combinándolos con antibióticos contra bacterias.

Se obtuvieron tres aceites esenciales de *T. lucida* por arrastre de vapor de dos poblaciones de Michoacán, que se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y resultaron diferentes químicamente: Se comprobó la actividad inhibidora del crecimiento de estos aceites sobre *Klebsiella pneumoniae* HIM, *Escherichia coli* ATCC53228, *Staphylococcus aureus* AVC-10 *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y *Pseudomonas aeruginosa* HIM, de igual forma se comprobó la inhibición de estos aceites sobre la resistencia a antibióticos en dos de las cepas bacterianas intrahospitalarias: *Staphylococcus aureus* ATCC29213 y *Pseudomonas aeruginosa* HIM. Los ensayos *in vitro* se realizaron para determinar la concentración mínima inhibitoria por el método de micro diluciones en agar. Además de observar que los tres aceites esenciales inhibieron diferencialmente a las bacterias ensayadas. Se obtuvieron resultados con *S. aureus* ATCC29213 resistente (ampicilina, vancomicina) y *P. aeruginosa* HIM resistente (cloranfenicol y ácido nalidíxico). Para determinar el

metabolito o mezcla de metabolitos responsables de la actividad inhibidora de la resistencia a antibióticos se usó el método de bioautografía acoplada a CG-EM. Se observó la sinergia entre los tres aceites y los antibióticos, en donde el aceite esencial (AE) potencia el efecto del antibiótico en mínimas cantidades.

Con los resultados, se sugiere que los MS actúan en *S. aureus* ATCC29213 inactivando sus β -lactamasas, lo que permite que el antibiótico rompa la pared bacteriana. Posiblemente la respuesta a la resistencia a antibióticos está en la diversidad de MS los aceites esenciales de *T. lucida*, los que pueden utilizarse como una alternativa al grave problema que causan las infecciones bacterianas resistentes a antibióticos en la población humana.

Palabras clave

Tagetes lucida, Aceites esenciales, Metabolitos secundarios, Resistencia bacteriana, Microdiluciones en agar.

Abstract

The plants synthesize secondary metabolites (SM) that defend them against their natural enemies (animals, bacteria, fungi, etc.) that respond to SM using counter-defenses. In turn, the plants respond evolutionarily to natural enemies with new SM or mixtures of them, toxic substances or that inhibit the counter-defenses. That arms race has provided the many SM that are used as drugs or as a basis for the development of new drugs. *T. lucida* is a weed used in traditional medicine as antidiarrheal, antidisenteric and antibiotic in respiratory infections, however, its chemical composition is variable and it is not known if that variability affects its antibiotic use. This work is part of a project where it is predicted that inhibitors of antibiotic resistance are found within the MS of the plants. So the studies were aimed to determine if this prediction is met, evaluating the effect of essential oils of *T. lucida* in bacteria resistant to antibiotics, testing the essential oils of *T. lucida* separately and combining them with antibiotics against bacteria.

Three essential oils were obtained by steam trawling from two populations of *T. lucida* from Michoacán, which were analyzed by gas chromatography coupled to mass

spectrometry (GC-SM) and were chemically different: The growth inhibitory activity of these was checked oils on *Klebsiella pneumoniae* HIM. *Escherichia coli* ATCC53228, *Staphylococcus aureus* AVC-10 *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Pseudomonas aeruginosa* HIM, likewise the inhibition of these oils on antibiotic resistance in two of the intrahospital bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Pseudomonas aeruginosa* HIM. The in vitro tests were carried out to determine the minimum inhibitory concentration by the method of micro dilutions in agar. In addition to observing that the three essential oils inhibited differentially tested bacteria. Results were obtained with resistant *S. aureus* ATCC29213 (ampicillin, vancomycin) and resistant *P. aeruginosa* HIM (chloramphenicol and nalidixic acid). To determine the metabolite or mixture of metabolites responsible for the inhibitory activity of antibiotic resistance, the bioautography method coupled to GC-SM was used. The synergy between the three oils and the antibiotics was observed, where the essential oil (AE) potentiates the effect of the antibiotic in minimal quantities.

With the results, it is suggested that the SM act in *S. aureus* ATCC29213 inactivating their β -lactamases, which allows the antibiotic to break the bacterial wall. Possibly the response to antibiotic resistance lies in the diversity of SM essential oils of *T. lucida*, which can be used as an alternative to the serious problem caused by bacterial infections resistant to antibiotics in the human population.

Keywords

Tagetes lucida, Essential oils, Secondary metabolites, Bacterial resistance, Microdilutions in agar

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos es un tema de estudio constante en las ciencias de la salud; actualmente, toma mayor importancia por el aumento de microorganismos multirresistentes. Este problema pudiera llegar a una nueva era pre-antibiótica, como antes del descubrimiento de las penicilinas, cuando la expectativa de vida era muy baja. La resistencia de bacterias a antibióticos surgió rápidamente debido al mal uso de éstos por parte de la población (Belloso, 2009). Por otra parte, las bacterias tienen diferentes mecanismos de defensa, lo que aumenta el problema de la resistencia a antibióticos. Las bacterias mutan y diversifican sus mecanismos de defensa como las bombas de eflujo, que expulsan las moléculas antibióticas fuera de la célula bacteriana; enzimas que degradan los antibióticos como las β -lactamasas que degradan el anillo β -lactámico de las penicilinas; la replicación de genes de resistencia por medio de plásmidos que se transfieren de una bacteria que tuvo contacto con antibióticos a otra que no los ha tenido, ésta se denomina resistencia adquirida (Cabrera *et al.*, 2007).

El uso correcto de los antibióticos se propuso en 2002 por el Centro de Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos, restringiendo su uso solo en casos necesarios y seleccionando el fármaco, la dosis y el tiempo adecuados (Belloso, 2009). Sin embargo, la multirresistencia a antibióticos es un problema que persiste desde hace varias décadas, por lo que la búsqueda de nuevos antibióticos se ha centrado en la etnobotánica con plantas que tienen actividad antibacteriana, y en los microorganismos. En ambos casos los responsables de esta actividad son sus metabolito secundarios (MS) (Anaya, 2003; Maguna *et al.*, 2006).

Los MS que se encuentran en las plantas son muy diversos; principalmente son fenilpropanoides, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides (Anaya, 2003). Están presentes en diferentes tipos de extracciones vegetales, desde polvos y tinturas por maceración hasta en los aceites esenciales (AE) (Domingo & López-Brea, 2003).

Los AE han sido reportados con actividad bacteriostática y bactericida, por lo que en este trabajo de investigación, específicamente se trabajó con AE de la maleza *Tagetes lucida* Cav. (Lamiaceae) que habita en la región de Morelia, la cual ha sido reportada anteriormente con una actividad antibacteriana, anti-herbívora, antifúngica, antiparasitaria e inhibidora de resistencia bacteriana a antibióticos (Barajas Pérez *et al*, 2011; Méndez Rodríguez, 2011; Omer *et al.*, 2015; Ramírez Ortiz, 2017).

En esta investigación se evaluaron los MS *T. lucida* responsables de la actividad moduladora de la resistencia bacteriana a antibióticos demostrando el efecto de tres AE de *T. lucida* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, solos o en combinación con antibióticos a los que son resistentes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Resistencia bacteriana

“La organización mundial de la salud (OMS) define resistencia microbiana como la resistencia de un microorganismo a un medicamento antimicrobiano al que originalmente era vulnerable”. Dentro de esta definición están las bacterias como parte de los microorganismos que afectan la salud de los seres humanos y de los animales. La resistencia bacteriana se ha vuelto un tema de interés en todo el mundo en los últimos años, puesto que las bacterias han desarrollado diversos mecanismos que evitan la acción de los antibióticos. El fenómeno de la resistencia es más visible en hospitales donde pueden encontrarse bacterias patógenas multirresistentes que causan infecciones en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas degenerativas lo que los hace más difíciles de tratar (Serra Valdés, 2017). Las bacterias adquieren continuamente nuevos mecanismos de defensa que evaden la acción bactericida o bacteriostática de los antibióticos. La producción de nuevos antibióticos bactericidas ha disminuido de forma considerable, debido a la resistencia a estos en poco tiempo por medio de mecanismos defensivos bacterianos que evaden la acción de los antibióticos (De Sá Del Fiol *et al.*, 2000).

En general, hay dos tipos de resistencia, la natural o intrínseca y la adquirida. La resistencia natural es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras especies y pueden sobrevivir en caso de que se emplee ese antibiótico. Esta resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación (San Millan, *et al.*, 2016).

La resistencia adquirida es la aparición de la resistencia en una bacteria producida a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma como integrones y transposones) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias en contacto con los antibióticos usados en el ser humano y animales. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios

antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con éstos (De Sá Del Fiol *et al.*, 2000).

2.2.-Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos que las hacen resistentes a la acción de los antibióticos, ya sea como resultado de mutaciones o por intercambio de material genético mediante el transporte de genes de resistencia a través de varios mecanismos.

La transducción (mediada por bacteriófagos), la conjugación (que implica contacto directo de célula a célula y la transferencia de plásmidos o transposones), la transformación (captación de ADN libre captado tras la lisis bacteriana) y la transposición (Figura 1). Todas estas formas de reproducción parasexual, son inserciones de material genético que genera resistencia contra antibióticos y cualquier otro xenobiótico destructor (San Millan *et al.*, 2016).

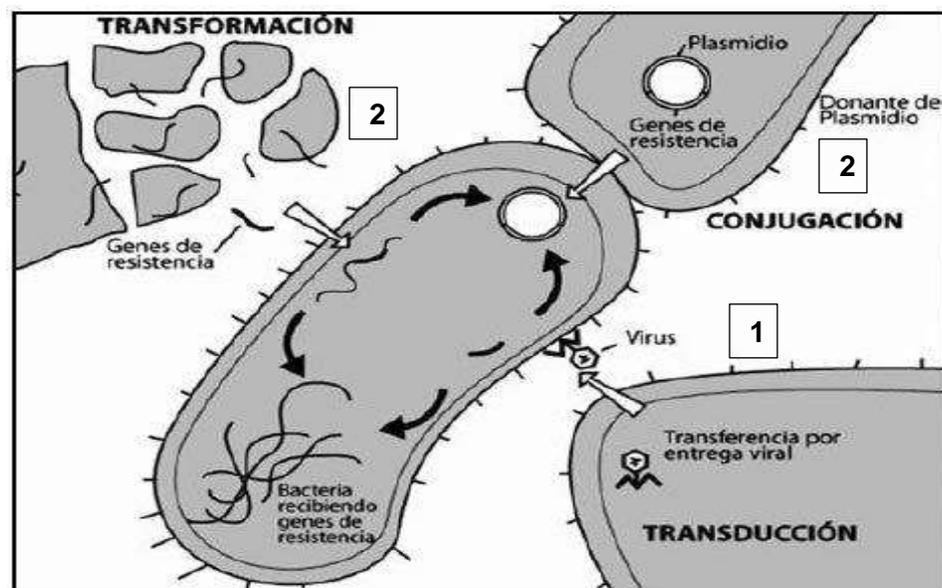


Figura 1. Resistencia adquirida 1(Transducción), 2(Conjugación) y 3(Transformación), tomada de <https://diazrisco.wordpress.com/2010/06/29/resistencia-bacterian>

Existen cinco mecanismos de resistencia a los antibióticos y las bacterias pueden usar más de uno. La modificación enzimática o destrucción del antibiótico es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias contra medicamentos β -lactámico y aminoglucósidos; este consiste en el uso de enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo β -lactámico de la molécula. Este mecanismo lo utilizan principalmente bacterias Gram positivas y se reconocen cuatro clases de enzimas que inactivan a los antibióticos: penicilinasas, β -lactamasas, cefalosporinasas y oxacilinasas. Además de estos cuatro tipos de enzimas bacterianas están las β -lactamasas de espectro extendido (BLEES) que son resistentes a las cefalosporinas de tercera generación (monobactámicos y aminoglucósidos). Después están las enzimas carbapenemasas que hidrolizan a los antibióticos carbapenems y por último, están las enzimas modificadoras metilasas, acetil-transferasas, nucleotidil-transferasas y fosfotransferasas que inactivan especialmente a los aminoglucósidos (Cabrera et al., 2007; Tafur & Villegas, 2008).

La impermeabilidad al antibiótico es otro mecanismo que consiste principalmente en la cantidad de péptidoglicano presente en las células bacterianas el cual es una barrera. Las bacterias Gram negativas, aparte de tener una pequeña capa de peptidoglicano, tienen una estructura de membrana consistente en lipopolisacárido y lipoproteína anclados al peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas. Éstas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico (Figura 2). La alteración o producción de nuevos sitios blanco es otro de los mecanismos más usados por las bacterias, el cual consiste en cambiar o modificar el sitio de acción de la bacteria en la que se une el antibiótico (Tafur & Villegas, 2008).

Finalmente, está el mecanismo de bombas de eflujo o proteínas transportadoras, por el cual se expulsan hacia el exterior de la bacteria, gran cantidad de moléculas como metabolitos (Figura 2), detergentes, solventes orgánicos y antibióticos (Cabrera *et al.*, 2007; Tafur & Villegas, 2008).

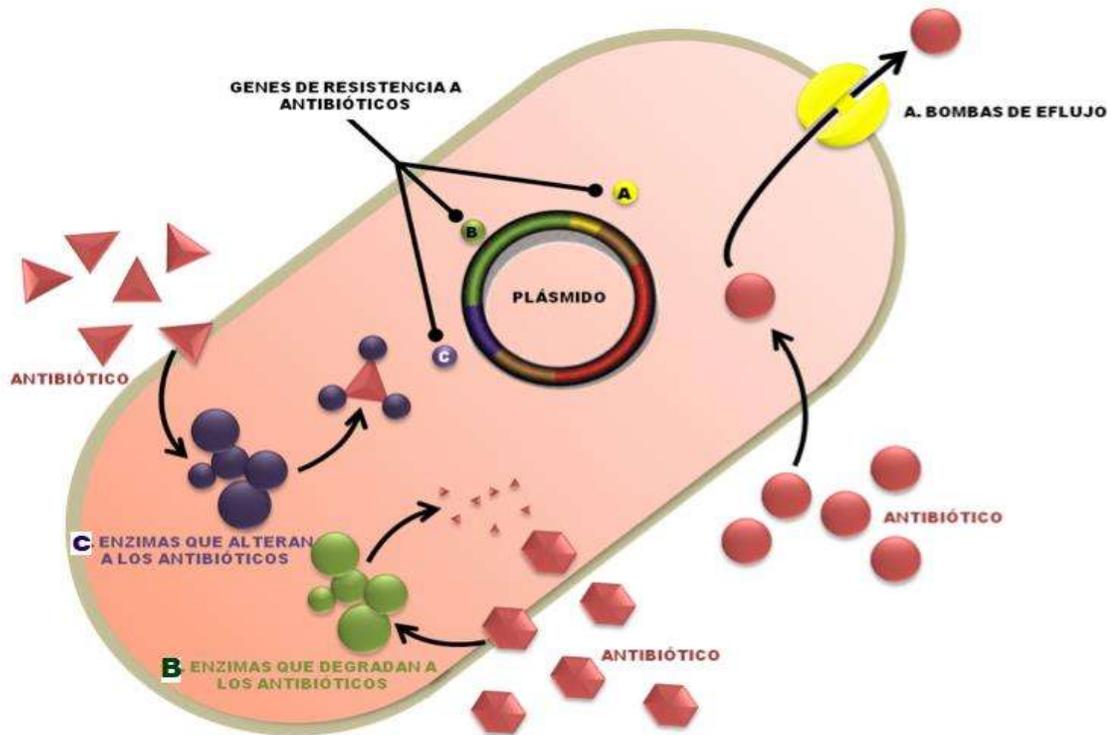


Figura 2. Mecanismos de defensa bacterianos (A) Bomba de eflujo, (B) Enzimas degradadoras de antibióticos, (C) enzimas alteradoras de antibióticos. Tomada de [http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art85/Venenos arácnidos: su sorprendente poder insecticida y su rara capacidad antibiótica](http://www.revista.unam.mx/vol.15/num11/art85/Venenos%20arácnidos:%20su%20sorprendente%20poder%20insecticida%20y%20su%20rara%20capacidad%20antibiótica) Alexis Joavany Rodríguez Solís, Elba C. Villegas Villarreal y Gerardo A. Corzo Burguete.

2.3.-Principales bacterias con resistencia a antibióticos en el mundo

Una de las principales bacterias que desde tiempos antiguos ha dado problemas para el ser humano es *Staphylococcus aureus*, la cual, antes del descubrimiento de los antibióticos, era el agente causal de bacteriemias responsables del 82% de las muertes en los hospitales en el mundo; hoy en día solo causa del 25 al 62 % de las bacteriemias en los hospitales. En años recientes esta bacteria ha causado infecciones con más frecuencia ya que se ha hecho resistente a los antibióticos con los que se trataba normalmente como la penicilina y a la metilcilina (Borges *et al.*, 2016).

Otras bacterias que han creado multirresistencia a antibióticos son *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*

y *Streptococcus pyogenes*; entre otras más, que principalmente se encuentran en ambientes nosocomiales por múltiples factores, entre ellos, el amplio uso de antibióticos en la medicina humana, veterinaria, acuicultura y la agricultura (Cabrera *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2016).

2.4.-Principales bacterias con resistencia a antibióticos en México

En un país en desarrollo como México, la resistencia bacteriana es uno de los retos clínicos más grandes, porque limita la prescripción de antibióticos que hasta hace poco eran eficaces. Las bacterias han creado resistencia a antibióticos causando infecciones con más frecuencia en pacientes intrahospitalarios y ambulatorios. Las infecciones respiratorias más comunes son causadas principalmente por *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Javier *et al.*, 2009).

Las infecciones entéricas son causadas principalmente en infantes de 1 a 4 años, los principales agentes causales que han creado resistencia son *Shigella dysenteriae* tipo I, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* y *Salmonella no Typhi* (Solorzano Santos & Miranda Novales, 1998)

Salmonella Typhi, causante de una epidemia de fiebre tifoidea en 1972, ha mostrado resistencia al cloranfenicol, tetraciclina, estreptomina y sulfas. En *Escherichia coli* enterotoxigénica, un patógeno entérico frecuente en 1987, se encontró resistencia a ampicilina, tetraciclina, estreptomina y kanamicina. En 2007 y 2009 se reportó el surgimiento y diseminación de *Salmonella Typhimurium*, patógeno entérico multiresistente gracias a las betalactamasas que produce de tipo AmpC. En 2011 se reportó a *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina (Rodríguez *et al.*, 2014).

México ha aportado al mundo cepas de bacterias resistentes como las BLEES (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*), bacterias productoras de metalobetalactamasas y carbapenemasas (Rodríguez *et al.*, 2014).

2.5.-Tratamientos nuevos para cepas multirresistentes

La resistencia bacteriana a la terapia antimicrobiana ha aumentado en los últimos años a escala mundial, llegando a “una nueva era pre-antibiótica ” (Rios *et al.*, 2016), donde la sociedad se pone en peligro, por lo que se han desarrollado nuevos tratamientos, algunos de los cuales que se describen a continuación:

Terapia de fagos.- La terapia de fagos se ha puesto como complemento a los antibacterianos convencionales, ya que son altamente específicos para luchar contra cepas bacterianas resistentes. Este método se ha aplicado durante décadas en la República de Georgia y Polonia y hasta ahora sólo unos pocos ensayos se han realizado en seres humanos y son aceptados por las autoridades de salud pública, como la *Food and Drug Administration* (Canchaya, *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 2016). Esta terapia se basa en enzimas de bacteriófagos que digieren la pared celular bacteriana permitiendo la liberación del profago, asegurando que los nuevos ciclos de infección se lleven a cabo. Estas enzimas son efectivas y selectivas para algunas bacterias; algunas han sido ampliamente probadas y aplicadas en diversos modelos animales (Rios *et al.*, 2016).

Terapia péptidos tóxicos.- Los antimicrobianos presentes en lágrimas y orina de seres humanos son polipéptidos que consisten en una cadena endógena de 12-50 aminoácidos sintetizada de forma ribosomal. Tienen bastantes funciones, pero una de las principales es la de concentrar células del sistema inmune (Rios *et al.*, 2016).La antibioterapia con péptidos tóxicos llamados bacteriocinas, puede ser utilizada por las bacterias como defensa contra otras bacterias muy específicas y comunes, eliminando oponentes potenciales y aumentar el número de los nutrientes disponibles en el entorno de su propio crecimiento (Sanches de Rivas, 2006). Las bacteriocinas han sido utilizadas como conservadores y para tratar mastitis causada por *S. aureus*; por ejemplo la administración de nisina en pacientes con mastitis bacteriana, causa la desaparición de los síntomas de mastitis a los 14 días (Rios *et al.*, 2016).

2.6.-En busca de nuevos antibióticos

En los últimos años los científicos de las áreas de la salud de todo el mundo se han dedicado a buscar nuevas formas de curar las enfermedades, entre éstas, las infecciosas. Algunos se han enfocado en desarmar a las bacterias inhibiendo la actividad o producción de factores de virulencia permitiendo al sistema inmune del huésped acabar con la infección. Una segunda nueva estrategia es la de inhibir directamente los procesos que causan que fallen los antibióticos. Con esto lo que se quiere es encontrar compuestos que pueden ser utilizados como co-terapias para mejorar y preservar la eficacia de los antibióticos tradicionales (Smith & Romesberg, 2007). Algunos otros se han vuelto a los orígenes de la medicina tradicionalista para verificar y descubrir los componentes de las plantas capaces de tener efectos antimicrobianos, algunos de los cuales tienen efectos sinérgicos o adyuvantes de los antibióticos convencionales a los cuales las bacterias ya son resistentes, efectos que inhiben o inhabilitan la resistencia a los antibióticos (Yap *et al* 2014; Borges *et al.*, 2015).

Tal es el caso de la investigación de la sinergia de oxacilina con α -mangostin obtenido de la cáscara de fruta seca de *Garcinia mangostana*, una planta originaria de Tailandia, probada contra *Staphylococcus saprophyticus*, afectó *in vitro* a la membrana citoplasmática (interrupción y aumento en la permeabilidad), inhibió la actividad de β -lactamasa y causó daños en la estructura de peptidoglicano (Phitaktim *et al.*, 2016).

2.7.-Metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana

Desde tiempos inmemoriales se ha sabido que las plantas tienen propiedades curativa, una prueba de esto son los escritos como el papiro de Ebers y el código de Cruz-Badiano, que son recopilaciones de información sobre las funciones curativas de las plantas de la época antigua. Hoy en día se sabe que las plantas tienen sustancias denominadas metabolitos secundarios (MS), algunos de los cuales son principios activos o precursores de principios activos responsables de acción terapéutica de medicamentos; en nuestro

caso nos enfocaremos en los MS de plantas que tienen actividad antimicrobiana (Vega, 2013).

Globalmente las plantas producen más de 100,000 compuestos de bajo peso molecular llamados metabolitos secundarios (MS) de los cuales 12,000 aproximadamente tienen actividad antimicrobiana (Domingo & López-Brea, 2003). Estos metabolitos se denominan secundarios porque no son esenciales para la vida de la planta, la gran diversidad o variedad de éstos es debido a un proceso evolutivo que induce la selección natural, adquiriendo una defensa mejorada contra microorganismos insectos y otros animales (Domingo & López-Brea, 2003).

De acuerdo a su función en la planta los MS se pueden dividir en compuestos de protección, atracción y defensa este último grupo se divide en dos, los que están de manera constitutiva en la planta (primer defensa contra agentes extraños a la planta o fitoanticipinas) y los MS inducidos (fitoalexinas), son compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas sintetizados por las plantas al ser atacadas por patógenos (González & Castro, 2008; García-Rodríguez *et al.*, 2012).

Las plantas con mutaciones que causan la pérdida de la capacidad de producir MS inducidos, muestran una sensibilidad muy alta a las infecciones producidas por microorganismos (Domingo & López-Brea, 2003). La definición de fitoalexinas y fitoanticipinas no está bien clara en todas las ocasiones, pues las mismas moléculas en algunas plantas pueden ser fitoalexinas y en otras fitoanticipinas (Anaya, 2003); todo depende de la cantidad producida por la planta y si es producida a la hora que la planta es atacada *in vivo* por un agente patógeno (Domingo & López-Brea, 2003).

Los grupos de MS más importantes por el número de estructuras son los compuestos fenólicos, los alcaloides y terpenos. Los compuestos fenólicos, son fenoles, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas entre otros más (Anaya, 2003).

Los terpenos son compuestos formados por unidades de isopreno, se clasifican principalmente en monoterpenos, diterpenos, triterpenos dependiendo del número de moléculas de isopreno que las formen son los principales componentes de los aceites esenciales, estos compuestos por lo general son los que le dan un olor característico a las flores,

tiene diferentes funciones dentro de las que se encuentra la de defensa de la planta, un ejemplo es su actividad antibacteriana que se ha asociado con alteraciones en la membrana citoplasmática de la bacteria (Domingo & López-Brea, 2003;Ávalos & Elena, 2009;García-Rodríguez *et al.*, 2012)

Los fenoles simples son los compuestos fitoquímicos más simples constan de un anillo fenólico (Marina, *et al*, 2008). El mecanismo de acción parece estar relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados de este grupo de metabolitos (Domingo & López-Brea, 2003).

Las quinonas, también compuestos fenólicos, son anillos aromáticos con dos grupos ceto o cetónicos. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas bacterianas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Domingo & López-Brea, 2003).

Se define a los taninos como sustancias fenólicas poliméricas, se pueden dividir en hidrolizables y condensados(Hassanpour, *et al*, 2011). Estos precipitan las proteínas en la membrana citoplasmática bacteriana alterando la permeabilidad de está provocando, el intercambio de sustancias nutritivas y de desecho llevando finalmente a la muerte celular (Domingo & López-Brea, 2003).

Las cumarinas son derivados de la benzo- α -pirona. Su mecanismo de acción puede estar ligado a su interacción con el ADN eucariota. Por lo que se les atribuyen propiedades anti virales (Domingo & López-Brea, 2003) .

Las flavonas son compuestos fenólicos que contienen un grupo carbonilo. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, además de presentar actividad sobre la pared celular de forma similar a las quinonas (Domingo & López-Brea, 2003).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterocíclicos. El mecanismo de acción antibacteriano parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo & López-Brea, 2003).

Las plantas como se ha visto potencial mente a son una de las grandes soluciones al problema de la resistencia bacteriana, en la que, a medida que los patógenos desarrollan nuevas maneras de propagarse y atacar a los organismos, éstos crean nuevas defensas, enfrentándose unos y otros en una continua batalla por superar al enemigo (Borges et al., 2016).

2.8 Variación fitoquímica de MS en plantas

Las plantas producen una gran variedad inmensa de MS los cuales difieren dentro de las especies, entre géneros y familias de plantas. Esta variación se clasifica en tres categorías alfa, beta y gamma. La categoría alfa es la que caracteriza el fenotipo químico del tejido vegetal de una planta, la beta se divide en dos, individual y poblacional. La individual diferencia los fenotipos químicos que componen los diferentes tejidos vegetales de una planta y la poblacional se definen como el recambio de los fenotipos químicos de una especie. Por último, la gamma es el grado de diferenciación (producción de MS) entre especies que conforman una comunidad (García-Rodríguez *et al.*, 2012).

Esta variación química de múltiples metabolitos secundarios en las plantas permite una mayor ventaja selectiva en respuesta a sus diversos enemigos naturales. Abriéndonos una pauta de sinergia entre metabolitos secundarios que se da en mezclas más que cuando se prueban solos (Richards *et al.*, 2016). Esta variación fitoquímica de metabolitos secundarios puede ser favorable o no para las malezas pues los MS que son efectivos en una zona pueden ser no tan efectivos en otra, por lo que la actividad terapéutica de la maleza puede variar, maleza que comúnmente se utiliza como remedio herbolario.

2.9 Material vegetal

Tagetes lucida Cav. (Asteraceae) se conoce en México como hierba de Santa María, hierba anís, pericón, yerbañil, periquillo, Tzitziqui Nana uarhi (purépecha) y yiauhtli

(náhuatl) (Roldán, 2009). Es una planta herbácea perenne, erecta con un tamaño de 30 cm hasta 1 m de alto, ramificada desde la base y con varios tallos secundarios; hojas simples, opuestas, indivisas, sésiles, lineares a oblongas, elípticas a oblanceoladas, de 2 a 10 cm de largo, de 0.5 a 2 cm de ancho. Sus flores liguladas son amarillas, con sus láminas flabeladas (Figura 3), de 3 a 6 mm de largo. Aquenios de 5 a 8 mm de largo, negruzcos y con olor a anís al estrujarse (Roldán, 2009).



Figura. 3 *T. lucida* recolectada en Tacícuaró, fotografía tomada por Agustín Moreno León

En este trabajo se utilizó como objeto de estudio a *T. lucida*, cuyo aceite esencial ha mostrado actividad antibacteriana, el material vegetal fue colectado en dos diferentes zonas de Michoacán (Uruapilla y Tacícuaro) en la época de floración durante los años 2015 y 2016 en Uruapilla; y 2016 en Tacícuaro (Ramírez Ortiz, 2017). Esto para comprobar si la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de esta planta difiere debido a la diversidad fitoquímica presente entre sitios y fechas de recolección.

3. JUSTIFICACIÓN.

La variación en los perfiles defensivos de las plantas puede verse afectada por factores ambientales, factores genéticos y diferentes consumidores, mismos que pueden tener respuestas a la variación en las defensas (Anaya, 2003).

La variación fitoquímica está ligada con la distribución de las plantas y los enemigos naturales que las atacan, por lo que en cada región la composición química es más efectiva con los enemigos locales que con los de otras localidades (García-Rodríguez *et al.*, 2012; Bravo-Monzón, 2015; Bravo-Monzón, *et al.*, 2016) Por lo que se quiere verificar si la variación química de una planta afecta diferencialmente a las especies de bacterias en cuanto a su actividad antibacteriana y posible actividad inhibitoria de la resistencia bacteriana a antibióticos.

4. HIPÓTESIS.

La composición de los aceites esenciales de *Tagetes lucida* contiene metabolitos secundarios que determinan la inhibición de los mecanismos bioquímicos que habilitan la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales.

4.1 Predicciones.

La combinación de aceite esencial de *T. lucida* con antibióticos a los que las bacterias son resistentes, anulará la resistencia.

Los aceites esenciales de *T. lucida* tendrán una diferente actividad inhibidora de la resistencia bacteriana a antibióticos que dependerá de la variación en la composición química de los aceites.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Detectar los metabolitos secundarios en aceites esenciales de *Tagetes lucida* con diferente composición química, que modulen la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales.

5.2 objetivos específicos

Determinar la dosis mínima inhibitoria de la resistencia bacteriana de tres aceites esenciales de *T. lucida* con diferente composición química, por el método de microdiluciones.

Determinar el metabolito o mezcla de metabolitos secundarios responsables de la actividad inhibitoria de la resistencia bacteriana de tres aceites esenciales de *T. lucida* por el método de bioautografía.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1. Colecta del material vegetal.

Se colectó entre los meses de septiembre y octubre las partes aéreas de *T. lucida* en dos años consecutivos (2015 y 2016) en Uruapilla y Tacícuaró en (2016), siendo estas localidades pertenecientes a Morelia Michoacán. Se colectaron 19.5 Kg de planta fresca cerca de la carretera Morelia-Guadalajara, entrada a Tacícuaró, (19°40'42.6"N 101°21'17.4"W); y 11.9 Kg en Uruapilla (19°31'19,31"N 101°16'48,84"W). En ambas colectas se tomó un ejemplar de referencia, que se depositó en el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH. Los números de herbario son 27487 y 27488, para la primera y segunda colecta respectivamente.

6.2.- Extracción de aceite esencial.

La extracción del aceite esencial se realizó por el método de destilación con arrastre de vapor de agua (Figura 4A): una combinación de inflorescencias, tallos y hojas con un peso total de 5 Kg de planta fresca, se introdujo envuelta en manta dentro de una autoclave modificada sobre una rejilla colocada por arriba del nivel del agua, evitando que el material vegetal tocara la resistencia del autoclave. El tiempo de destilación fue de una hora a partir del primer líquido destilado, el cual se colectó en vasos de precipitado de un litro. La fase orgánica se separó con un embudo de separación que contenía 20 mL de hexano (Figura 4B), repitiendo este proceso tres veces consecutivas. Esta fase orgánica se filtró en un embudo con papel filtro y sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar el agua residual. La muestra se recolectó en un vial y se evaporó bajo una corriente suave de nitrógeno gaseoso hasta eliminar el hexano (Figura 4C). Obteniendo un rendimiento de aceite puro de 15 mL para la colecta de Tacícuaró (19.5 Kg) y 12 mL para la colecta de Uruapilla (2016) y 11.5 mL para Uruapilla (2015) (11.9 Kg). Estos viales de aceite puro fueron sellados, etiquetados y guardados en refrigeración a -20°C hasta su análisis químico.



Figura.4 A. Extracción del aceite esencial de *T. lucida* por arrastre de vapor.



Figura.4 B. Separación de AE fase acuosa de fase orgánica en embudo de separación



Figura.4 C. Concentración de AE con nitrógeno gaseoso.

6.3.-Análisis químico del aceite esencial

La muestra del aceite se diluyó 1:100 en hexano (1 parte de AE por 99 partes de hexano) para cada uno de los aceites extraídos, previamente a su análisis químico. La identificación de la composición química de los aceites se llevó a cabo mediante una inyección en el cromatógrafo de gases *Agilent 6890* acoplado a un Detector Selectivo de Masas *Agilent 5973*, con el método reportado por Ramírez (2017). Se inyectó 0.5 μL de muestra con división de flujo (60:1) a una temperatura de 220 $^{\circ}\text{C}$ con helio como gas acarreador con un flujo en columna de 1 mL/ min en una columna no polar *HP5 Agilent* (30m x 0.25 mm x 0.25 μm). El programa de la temperatura en el horno inició a 60 $^{\circ}\text{C}$ por

5 minutos, aumentando a 5 °C/min llegando a 200 °C y aumentó a 25 °C/min hasta 300 °C. Las condiciones usadas en el detector selectivo de masas fueron: voltaje de ionización por impacto electrónico a 69.9 eV; temperatura de la interface a 280 °C, modo FULL SCAN y en un rango de masas de 35-550m/z. La señal del detector fue procesada en el programa Enviromental ChemStation (Agilent Technologies), este programa nos ayudó a la identificación automática de los compuestos analizados comparándolos con la Biblioteca Nacional Institute of Standards and Technology (NIST05). Aceptamos solo la identificación de los espectros que concordaban por arriba del 90% y su pureza de pico era de 1 compuesto. Los compuestos mayoritarios se identificaron por inyección de estándares comerciales (Sigma-Aldrich). Para la identificación de compuestos también se calcularon Índices Kovats experimentales, inyectando 1 µL de una serie de alcanos puros (Sigma-Aldrich) C₈-C₂₀ en el cromatógrafo de gases, en las mismas condiciones en las que se analizaron las muestras.

6.4.- Microorganismos usados y condiciones de crecimiento.

Los microorganismos usados fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *S. aureus* AVC-10, *Escherichia coli* ATCC53228, *Klebsiella pneumoniae* BLEES (+) HIM, y *Pseudomonas aeruginosa* HIM; cuyas cepas fueron donadas por el Hospital Infantil de Morelia (HIM) a través de la QFB Guadalupe Bolaños Monroy., el QFB, Juan Manuel Barajas Magallón del laboratorio Dipromi y por la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM a través de la Dra. Tzasná Hernández Delgado. Las cepas se reactivaron sembrándolas en medio Agar Mueller-Hinton a 36°C en condiciones de oscuridad 24h antes de cada bioensayo (Golus *et al.*, 2016).

6.5.- Antimicrobianos usados.

Los antibióticos utilizados para realizar los antibiogramas fueron: ácido nalidíxico, carbenicilina, cloranfenicol, clindamicina, imipenem, vancomicina y penicilina, de la marca BBL© en la presentación de sensidisco (Tabla 1). Los antibióticos utilizados para realizar los bioensayos de Microdilución en placa de Elisa y Bioautografía, fueron: ácido nalidíxico con fenazopiridina, imipenem con cilastatina, vancomicina y cloranfenicol (Tabla 2) en presentación genérica comercial. El cloranfenicol fue adquirido grado reactivo en Sigma Aldrich ©

6.6.-Ensayos preliminares.

6.6.1- Antibiogramas.

A cada cepa bacteriana se realizó un antibiograma para comprobar su resistencia a los antibióticos comerciales por el método de Kirby-Bauer, este método consiste en la inoculación de placas de Agar Mueller-Hinton con cepas bacterianas a una concentración de 0.5 en la escala de McFarland correspondiente a 1×10^8 mL⁻¹ unidades formadoras de colonias (UFC). Se tomó con un asa bacteriológica 1 o 2 colonias del inóculo de las cepas previamente sembradas de 18 a 24 h en agar Mueller-Hinton y suspendiendo en caldo Mueller-Hinton en tubo de cultivo. Se ajustó la turbidez a 0.5 McFarland, en una placa con agar Mueller-Hinton, se realizó un estriado masivo con hisopo, se colocaron sensidiscos de los antibióticos a ensayar en la placa inoculada y se incubó de 18 a 24 h a una temperatura de 37 °C (Tabla 1).

Tabla1. Antibióticos utilizados en antibiograma para corroborar la resistencia a antibióticos.

Antibiótico	Clave	Concentración en sensidisco (µg)
Ácido Nalidíxico	NA	30

Clindamicina	CC	2
Cloranfenicol	C	30
Imipenem	IPM	10
Penicilina	P10	6.25
Vancomicina	VA	5
Carbenicilina	CB	100

6.6.2- crecimiento de cepas en medios selectivos

Las cepas se resembraron en medio selectivo de Agar-Sal-Manitol y agar Mac-Conckey para corroborar que no hubiera cambios durante su manipulación en el laboratorio, ya que se estaban previamente identificadas (Figuras 6 A-6 E).



Figura 6 A. *S. aureus* AVC-10 en gelosa sal y manitol 37 °C de 18 A 24 h.



Figura 6 B. *S. aureus* ATCC29213 en gelosa sal y manitol 37 °C de 18 A 24 h.



Figura 6 C. *P. aeruginosa* HIM en gelosa Mac-Conckey 37 °C de 18 A 24 h.



Figura 6 D. *E. coli* ATCC53228 en gelosa Mac-Conckey 37 °C de 18 A 24 h.



Figura 6 E. *K. pneumoniae* HIM en gelosa Mac-Conckey 37 °C de 18 A 24 h.

6.6.3 Bioensayo de bioprospección de inhibición a la resistencia (método de difusión en Agar en disco)

Este método conocido en el área clínica como Método de Kirby-Bauer, consiste en la inoculación de placas de Agar Mueller-Hinton con cepas bacterianas a una concentración de 0.5 escala de McFarland correspondiente a 1×10^8 UFC/mL. Se tomaron con un asa bacteriológica 1 o 2 colonias del inóculo de las cepas previamente sembradas de 18 a 24 h en agar Mueller-Hinton y se suspendieron en tubo del cultivo con caldo Mueller-Hinton, ajustando la turbidez a 0.5 McFarland. En una placa con agar Mueller-Hinton se realizó un estriado masivo con hisopo, se pusieron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 5 μ L de aceite esencial de *T. lucida* y sensidiscos de diferentes agentes antimicrobianos a los que es resistente la bacteria de AE en

concentraciones específicas en este caso en particular. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se observó la aparición de una zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco que contenía el agente antimicrobiano al cual es susceptible el microorganismo (Vega, 2013).

6.6.4 -Bioensayo de bioprospección antimicrobiano con AE por el método de micro dilución en agar.

Se preparó un inóculo de cada cepa bacteriana previamente resembrada 18 a 24 horas antes y se suspendió en caldo Mueller-Hinton ajustando la turbidez a 0.5 de la escala de McFarland, correspondiente a 1×10^8 UFC /mL unidades formadoras de colonias (UFC). De este inóculo se hizo una dilución 1:10 en caldo Mueller-Hinton en tubo Eppendorf para una concentración de 1×10^7 UFC/mL, de esta dilución se tomaron 6 μ L del inóculo para cada pocillo de una microplaca de 96 pozos, dándonos una concentración final de 1×10^4 UFC/mL por pozo. Esta suspensión bacteriana se usó antes de 15 min después de que se preparó para mantener las condiciones antes establecidas (Golus et al., 2016).

Los ensayos se realizaron en una microplaca estéril de 96 pocillos de fondo plano con volúmenes de 360 μ L por pocillo. El aceite esencial disuelto con DMSO se añadió al agar Mueller-Hinton BBL® antes de solidificar en diferentes concentraciones en tubos Eppendorf (Tabla 2).

Tabla2. Volumen de agar, DMSO y aceite esencial (AE), por pocillo en la placa Elisa de 96 pozos. Concentración de los tres AE de *T. lucida* expresadas en miligramos por mililitro de AE de acuerdo con su densidad (AE.U.15=658.5mg/ml, AE.U.16=704.135mg/ml y AE.T.16=868.63mg/ml).

AGAR μ L	DMSO μ L	Volumen Aceites esencial (μ L)	AE.U.15 (mg/mL)	AE.U.16 (mg/mL)	AE.T.16 (mg/mL)
273	6	24	15.8	16.90	20.89
278	6	16	10.54	11.27	13.89
28	6	12	7.9	8.44	10.42
288	6	6	3.95	4.22	5.21
291	6	3	1.97	2.11	2.60
292.5	6	1.5	0.99	1.05	1.3
293.25	6	0.75	0.49	0.53	0.65
293.63	6	0.37	24	0.26	0.32
293.85	6	0.15	0.1	0.10	0.13

Los tubos se homogeneizaron en un agitador de vibración *vórtex V1 plus* y se mantuvieron a 50° C en un termo-mezclador hasta dispensar el volumen correspondiente para cada pocillo en la microplaca de 96 pocillos. La dilución en serie se ensayó por cuadruplicado con tres controles (esterilidad, crecimiento y para DMSO) y los diferentes tratamientos para cada cepa ensayada. La placa se mantuvo a temperatura ambiente hasta que el agar se solidificó. Al solidificar el agar en la microplaca, se inoculó con 6 μ L de inóculo usando una micropipeta de 10 μ L (Golus et al., 2016).

Las placas inoculadas se incubaron a temperatura ambiente hasta que el inóculo fue absorbido por el agar, se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 36 °C durante 18-24 horas.

Los resultados se determinaron sobre una base oscura y no reflectante bajo un estereoscopio como apoyo visual. La CMI fue registrada como la concentración más baja del agente ensayado que inhibió parcialmente el crecimiento bacteriano, la presencia de

una débil neblina causada por el inóculo fue ignorada (Figuras 7A 7B y 7C). El experimento se repitió por cuadruplicado (Golus et al., 2016).

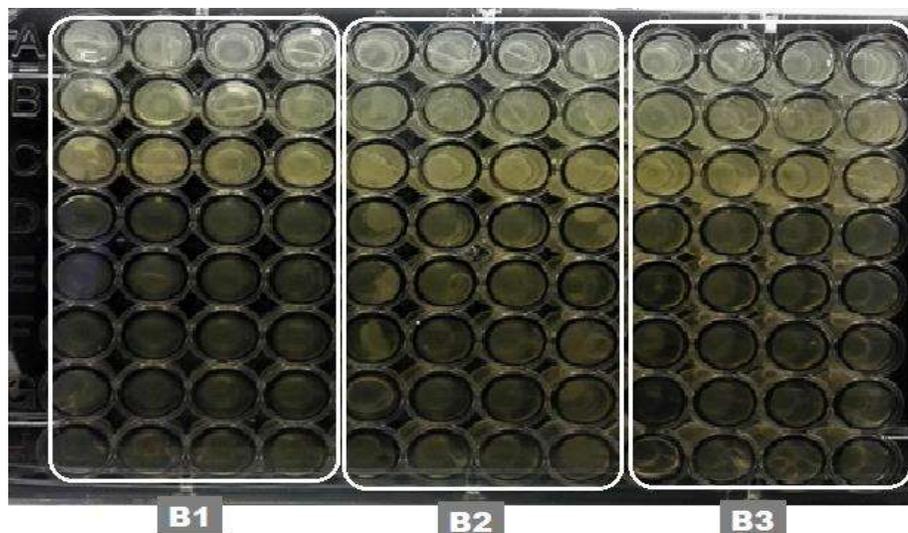


Figura.7 A. Efecto de *AE.U.15* contra *S. aureus* ATCC29213 (B1), *P. aeruginosa* HIM (B2) Y *K. pneumoniae* BLEES (+) (B3) en placa de Elisa micro diluciones.



Figura.7 B. Pozo de microplaca sin crecimiento microbiano visto desde estereoscopio Leica zoom 2000 (20x).



Figura.7 C. Pozo de microplaca con crecimiento microbiano visto desde estereoscopio Leica zoom 2000 (20x).

6.7.- Bioensayo de bioprospección de la inhibición de la resistencia a antibióticos.

6.7.1 Método de micro dilución en agar.

Este bioensayo fue realizado solamente con *S. aureus* ATCC29213 y *P. aeruginosa* HIM. Siguiendo el procedimiento igual que el descrito en el punto 6.6.4 de esta tesis. A este ensayo sumamos un tratamiento: la mezcla de antibiótico con AE vs estas bacterias (Figura 8). Después de 18-24 h de incubación se agregaron 50 µL de cloruro de tetrazolio (TTC) en solución (0.8mg/mL) a cada pozo, se tapó la caja y se dejó reposar en la campana de flujo laminar durante 30 minutos.

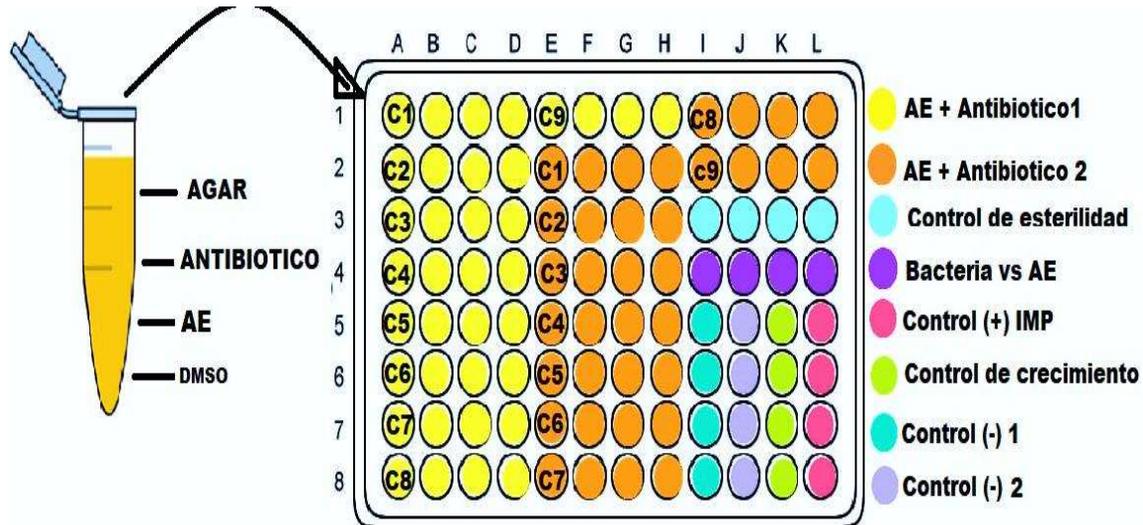


Figura.8 Tratamientos de microdiluciones en agar. Donde C1 a C9 son concentraciones diferentes de aceite esencial.

Se observó una coloración rosada en los pozos donde hubo respiración celular ya que las bacterias redujeron el cloruro de tetrazolio a formazán (Figura 8), en este caso en específico se tomó como CMI la concentración del tratamiento a la cual se formó un botón rosado muy tenue donde casi no se ve la coloración y la CMB se tomó como la concentración donde hubo ausencia total de coloración (Golus et al., 2016; Vega, 2013). Los resultados se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis, estableciendo categorías

de crecimiento bacteriano: donde 0 corresponde al 0% de crecimiento bacteriano, 1 a 12.5% 2 a 25%, 3 a 50%, 4 a 75% y 5 es 100% de crecimiento bacteriano.

Tabla 3. Concentración del antibiótico en cada pozo de la microplaca expresado ($\mu\text{g/mL}$).

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido Nalidíxico (NA)	3.3
Cloranfenicol (C)	3.3
Imipenem (IPM)	1.1
Ampicilina (AMP)	1.1
Vancomicina (VA)	0.5

6.7.2 Método Bioautografía.

6.7.2.1 Curva de crecimiento bacteriano.

Previo a la cromatografía en capa fina se realizó una curva de crecimiento para cada bacteria usada en el bioensayo. Se preparó una escala de concentración de BaCl_2 en un intervalo de concentración de 0.1 a 1.0 conocida como escala Mac-Farland y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro. Posteriormente se prepararon tubos con caldo Mueller-Hinton BBL® a una concentración de 0.1 Mac-Farland y se inocularon con cada bacteria utilizada en el bioensayo, y se midió su absorbancia a 540 nm. Esta absorbancia (Abs) se tomó como tiempo cero, la Abs se midió cada 3 horas durante un período de 24 horas y después una última lectura hasta las 48 horas con el motivo de encontrar la fase exponencial bacteriana. Cada tubo se inoculó por cuadruplicado obteniendo cuatro lecturas para cada bacteria (UNAM, 2010).

6.7.2.2 Cromatografía en capa fina (CCF).

Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel (60W Merck) de 4cm x 10 cm una por muestra de aceite esencial (AE.U.15, AE.U.16, AE.T.16). Las cromatoplasmas se llevaron a esterilizar por exposición a luz ultravioleta durante 30 min. Después se les agregó 5 µL para el AE.U.15, 10 µL para el AE.U.16 y 15 µL para el AE.T.16. Esta aplicación fue hecha en banda de 1cm de ancho, una placa para cada aceite esencial. Las cromatoplasmas se dejaron secar no más de 30 segundos y se introdujeron en una solución de 80:20 hexano-acetato de etilo dentro de cámara cromatográfica (Figura 9).



Figura.9 Cromatografía en placa fina en sistema de elución hexano-acetato de etilo 80%-20%.

Estas cromatoplasmas se revelaron en una cabina *Spectroline® Model CX-20 Ultraviolet* de luz UV a 365 nm (Figura.10). La cromatoplasmas de los AE.U.15, AE.U.16 y AE.T.16 se revelaron asperjando una solución de sulfato sérico amoniacal y calentando ligeramente a 100°C en una plancha para revelar los compuestos incoloros bajo luz UV (Figura 11). Una vez reveladas las placas, se calcularon los RF de los compuestos separados y se identificaron corriendo cromatoplasmas con estándares de β-pineno, estragol y metil-eugenol. Se dejó evaporar el disolvente de la cromatoplasma todo un día en campana de seguridad. Una de las cromatoplasmas con bandas ya identificadas se dejó como referencia.(Vega, 2013).

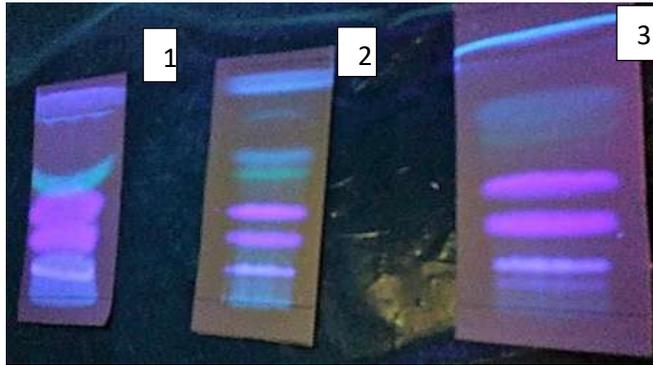


Figura.10. Placas reveladas con luz UV de los tres aceites esenciales 1 (AE.U.15), 2 (AE.U.16) y (3) AE.T.16.



Figura.11. Placa revelada con sulfato sérico amoniacal de AE.U.15.

6.7.2.3 Fase de inoculación de placa cromatográfica.

Las cromatoplasmas se sumergieron en caldo Mueller-Hinton durante 7 minutos colocándolas en recipientes de plástico herméticos previamente estériles con una capa de agar-agar aproximadamente de 0.5cm de espesor. El control de crecimiento fue una cromatoplasma impregnada con la mezcla de disolventes e inoculada con el mismo microorganismo. Todas las cromatoplasmas en cajas se incubaron a 37°C por 24 h (Figura 12).



Figura 12. Inoculación e incubación de las placas cromatográficas a 37°C.

Después de la incubación las placas inoculadas fueron asperjadas con una solución de Cloruro de tetrazolio (TTC) disuelto en buffer fosfato salino (BPS) (100 mg para 100 mL) e incubadas nuevamente dentro de su correspondiente recipiente a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, hasta la completa asimilación del sustrato enzimático por el microorganismo. Este proceso tardó aproximadamente de 16 a 20 horas. La zona de inhibición del crecimiento de los microorganismos en la cromatoplaque se comparó con la cromatoplaque que se dejó de referencia. A esta cromatoplaque se le midió los RF de los compuestos separados, RF que se correlacionaron con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente (Vega, 2013).

6.7.2.4 Identificación de compuestos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Las bandas de las cromatoplaques se rasparon con una espátula y la sílica se depositó en tubos Eppendorf de 1.5 y 2 mL, uno para cada fracción identificada. Esta sílica se lavó con una mezcla de 200 μL de metanol y 500 μL de hexano y se agitó durante 15 min en un sonicador.



Figura.13. Raspado de placa cromatográfica muestras preparadas para la inyección en GS-MS.

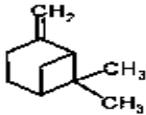
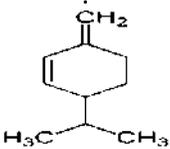
Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 10min (Figura 13). Separando la fase líquida que se concentró con nitrógeno gaseoso hasta un volumen de 50 μL . Posteriormente, se inyectaron 3 μL en el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas con el mismo método que se analizaron los aceites esenciales, anteriormente descrito.

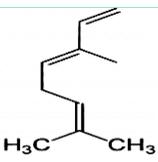
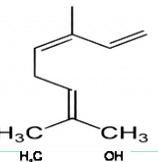
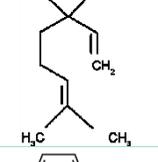
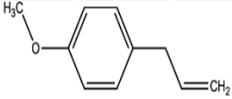
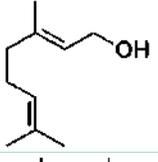
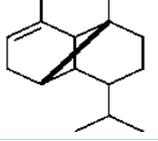
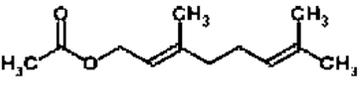
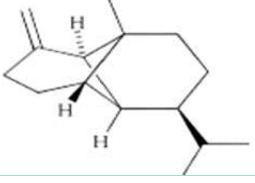
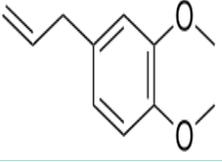
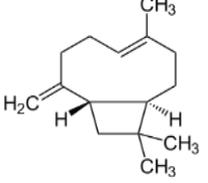
7. RESULTADOS

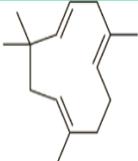
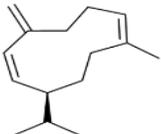
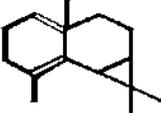
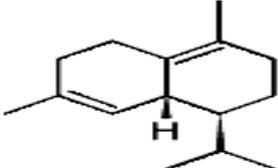
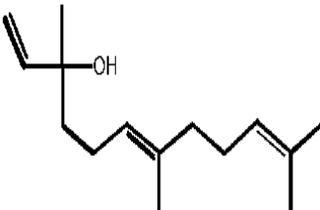
7.1 Composición química de los aceites esenciales

La cuantificación de los compuestos fue por el método de área bajo la curva expresando los resultados en porcentaje. Los tres aceites esenciales de *T. lucida* analizados tienen una composición abundante en monoterpenos y fenil-propanoides. El AE.U.15, colectado en Uruapilla 2015, tiene 16 compuestos volátiles, cuyos mayoritarios son: metil-eugenol 46.1%, estragol 32.9%, β -pineno 9.01% y β -E-ocimeno 5.3%. Estos cuatro compuestos representan 93.4% del total de la muestra. En el AE.U.16, colectado en Uruapilla 2016 se encontraron 16 compuestos, de los cuales son: β -pineno 37.3% y β -E-ocimeno 19.4%, estragol 13.3% y metil-eugenol 9.5 %; los mayoritarios representan más del 79.6% del total de la muestra. En el AE.T.16, colectado en Tacícuaru, se encontraron 17 compuestos los mayoritarios son: β -pineno 27.1% y β -E-ocimeno 23.4%, geranil acetato 15.5%, D-germacreno 8.9% y cariofileno 7.7%. Estos compuestos representan más del 82.89% del total de la muestra (tabla 4).

Tabla 4. Composición química de aceites esenciales *T. lucida* Uruapilla 2015 (AE.U.15) *T. lucida* Uruapilla 2016 (AE.U.16) y *T. lucida* Tacícuaru 2016 (AE.T.16). Los compuestos volátiles y sus estructuras están ordenados según su índice Kovats determinado experimentalmente (IKE) y sus índices Kovats teóricos (IKT).

Compuestos	Estructuras	IKE	IKT	AE.U.15 (%) Abundancia relativa	AE.U.16 (%) Abundancia relativa	AE.T.16 (%) abundancia relativa
β -Pineno		994	974	9.01	37.35	27.17
β -felandreno		1031	1025	0.18	0.23	0

β-Z-Ocimeno		1037	1032	0.26	0.94	1.21
β-E-Ocimeno		1050	1044	5.33	19.42	23.50
Linalool		1101	1095	2.48	4.04	2.46
Estragol		1200	1194	32.93	13.29	0.35
Geraniol		1255	1249	0.33	0.31	1.16
α-Copaeno		1380	1374	0.53	2.78	0.32
Geraniil-acetato		1388	1351	0	0	15.55
β-copaeno		1394	1430	0	0	0.34
Metileugenol		1406	1403	46.15	9.5	0.86
Cariofileno		1427	1464	0.83	3.36	7.76

Humuleno		1459	1452	0.19	0.69	1.85
Germacreno D		1488	1485	0.70	4.48	8.90
Biciclo germacreno		1502	1495	0.50	1.47	3.04
α-Farneseno		1510	1505	0.17	0.5	1.68
d-Cadineno		1528	1522	0.18	0.48	0.93
E-Nerolidol		1566	1561	0.24	1.16	2.91

En los siguientes cromatogramas se presentan los resultados de la abundancia relativa de cada uno de los compuestos que constituyen los aceites esenciales; el que tiene mayor abundancia relativa es AE.T.16 siguiendo el AE.U.15 y por último el AE.U.16 (figura 14).

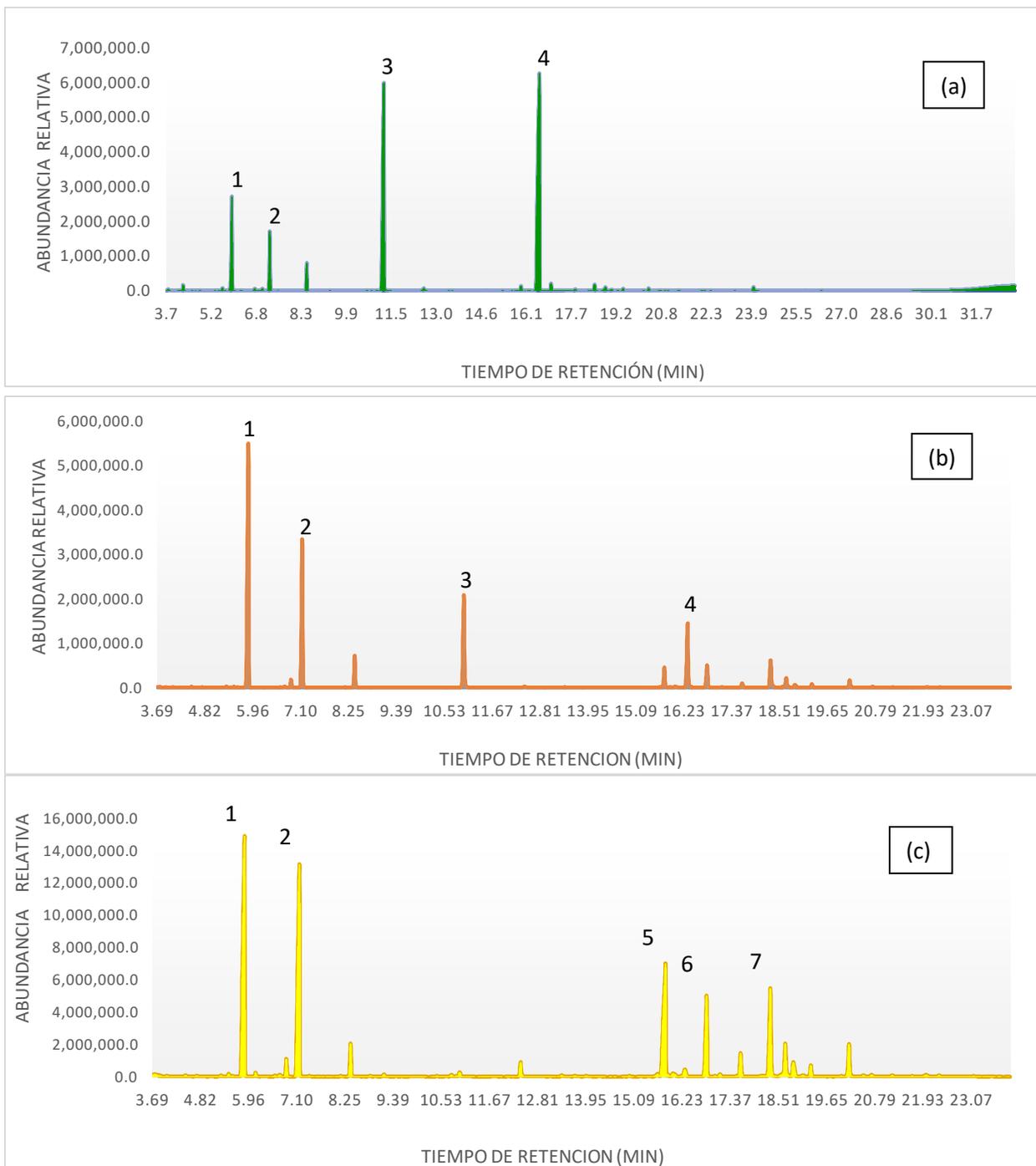


Figura.14. Cromatogramas de AE.U.15 (a) y AE.U.16 (b) colectados en Uruapilla en los años 2015 y 2016, el AE.T.16 (c) fue colectado en Tacícuaru en 2016 los MS principales son 1.- β -Pineno, 2.- β -trans-Ocimeno, 3.- Estragol, 4.- Metileugenol, 5.- Geranil acetato, 6.- Cariofileno y 7.-D-Germacreno, Nótese que los intervalos cubiertos por escalas de la concentración relativa son diferentes para una mejor apreciación de los picos que identifican a cada uno de los compuestos mayoritarios.

7.2 Antibiograma

Con este método se realizaron varios ensayos para determinar la resistencia a antibióticos que tienen las cepas bacterianas seleccionadas para el experimento (Tabla 5). Las cepas *S. aureus* ATCC29213, *K. pneumoniae* HIM y *P. aeruginosa* HIM fueron resistentes a varios antibióticos en estos ensayos (Figura 15).



Figura.15. Antibiograma de *E. coli* ATCC53228.

Tabla.5. (S) Sensibilidad reportada por el fabricante BBL© y (E) resultado experimental, en negritas se encuentran los resultados de resistente al antibiótico (N/A) no aplica debido a que la bacteria tiene una resistencia natural al antibiótico.

	Vancomicina		Clindamicina		Cloranfenicol		Ácido Nalidixico		Imipenem		carbenicilina		Penicilina	
CEPAS	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	≥15	12	≥21	22	≥18	15	N/A	14	≥16	40	N/A	16	≥ 29	7
<i>E. coli</i> ATCC 53228	N/A	N/A	N/A	N/A	≥18	19	≥19	23	≥16	23	≥23	24	N/A	N/A
<i>P. aeruginosa</i> VHIM	N/A	N/A	N/A	N/A	≥18	0	≥19	11	≥16	22	≥17	0	N/A	N/A
<i>S. aureus</i> AVC-10	≥15	18	≥21	25	≥18	29	N/A	N/A	≥16	38	N/A	39	≥29	27
<i>K.pneumoniae</i> HIM	N/A	N/A	N/A	N/A	≥18	20	≥19	14	≥16	27	≥23	0	N/A	N/A

7.3 Bioprospección de inhibición a la resistencia a antibióticos con Método de Kirby-Bauer

En este bioensayo, los aceites Uruapilla 2016 y Tacicuaro.2016 no mostraron efecto de inhibición en estas cepas. El AE.U.15 mostró un halo de inhibición de 10mm para *P. aeruginosa* HIM ,12mm para *K. pneumoniae* HIM y 13 mm para *S. aureus* ATCC29213 respectivamente para cada bacteria al comparar los halos de inhibición de los aceites y los antibióticos a los que las bacterias son resistentes (Figura 16) se encontró que AE.U.15 tiene un halo mayor en el caso de *S. aureus* ATCC29213, con respecto a *K. pneumoniae* HIM y *P. aeruginosa* VHIM los halos de los AE son menores que los de los antibióticos. Se utilizó el método de Kirby-Bauer ya que esta reportado en el trabajo de Ramírez Ortiz (2017) ,el cual es un trabajo que antecede a esta tesis. En los bioensayos realizados con el método de Kirby-Bauer se encontró una diferencia en la actividad de los tres aceites contra las bacterias seleccionadas; Uruapilla 2015 mostró un efecto mayor que los otros AE contra *S. aureus* ATCC29213. Comprobamos la actividad antibacteriana de *T. lucida* contra *K. pneumoniae* reportada en el trabajo de Ramírez Ortiz (2017).



Figura.16.Antibiograma de *K .pneumoniae* con aceites de *T. lucida* en combinación con Vancomicina, Cloranfenicol, y clindamicina.

7.4 Bioensayo de bioprospección de la inhibición de la resistencia a antibióticos método de micro diluciones en placa de Elisa (parte 1)

Los bioensayos realizados con los aceites de *T. lucida* en bacterias resistentes a antibióticos mostraron que los AE tienen actividad antibacteriana; el aceite de Uruapilla 2015 fue el más eficaz ya que inhibió el crecimiento de todas las bacterias en las que se probó, obteniendo un mejor resultado con las Gram positivas. Los aceites de Uruapilla 2016 y Tacícuaro 2016 solo tuvieron actividad antibacteriana con las Gram positivas (Tabla 6). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de aceite esencial AE.U.15 contra *K. pneumoniae* HIM fue de 3.95 mg/ml en el 75% de los casos; los AE.U.16 y AE.T.16 no inhibieron el crecimiento bacteriano de esta cepa. Para *S. aureus* ATCC 29213 la CMI de AE.U.15 fue de 0.49 mg/ml en todos los bioensayos; los AE.U. 16 y AE.T.16 mostraron una CMI de 16.90 mg/ml y 20.42 mg/ml respectivamente, para *E. coli* ATCC 53228 y *P. aeruginosa* HIM, el AE.U.15 mostró una CMI de 7.9 mg/ml para las dos bacterias, en el 100% de los casos. AE.U.16 y AE.T.16 no inhibieron el crecimiento bacteriano de estas dos cepas. Por último, para *S. aureus* AVC-10 el AE.U.15 mostró una CMI de 0.99 mg/ml el AE.U.16 de 0.26 mg/ml y el AE.T.16 de 2.60 mg/ml (Tabla 6, Figura 17).

Tabla 6. CMI en bioensayos de prospección de la inhibición a la resistencia bacteriana por aceites esenciales AE.U.15 (Uruapilla 2015), AE.U.16 (Uruapilla 2016) y AE.T.16 (Tacícuaro 2016).

Cepas Bacterianas	AE.U.15 mg/mL	AE.U.16 mg/mL	AE.T.16 mg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 53228	7.9	no inhibió	no inhibió
<i>K. pneumoniae</i> HIM	3.95	no inhibió	no inhibió
<i>P. aeruginosa</i> HIM	7.9	no inhibió	no inhibió
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.49	16.90	20.42
<i>S. aureus</i> AVC-19	0.99	0.26	2.60

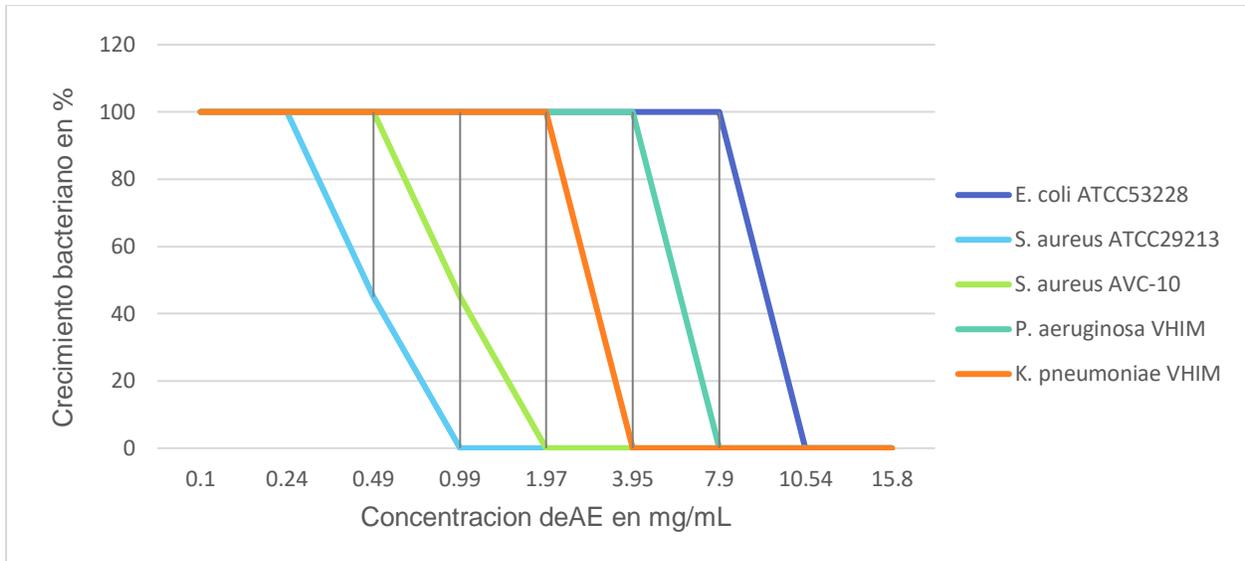


Figura 17. A Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de AE.U.15 (AE1) vs cinco cepas bacterianas

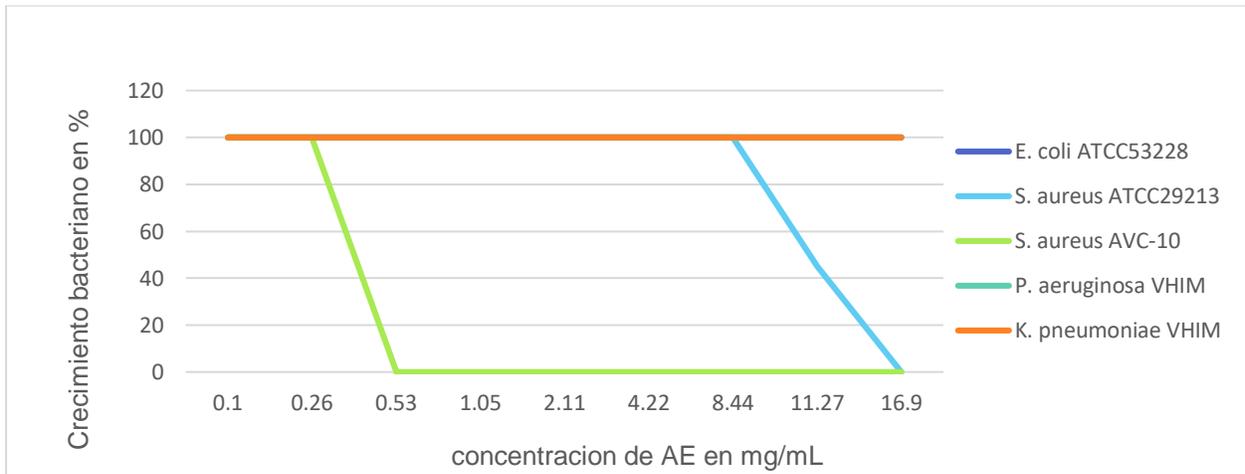


Figura 17. B Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de AE.U.16 (AE2) vs cinco cepas bacterianas

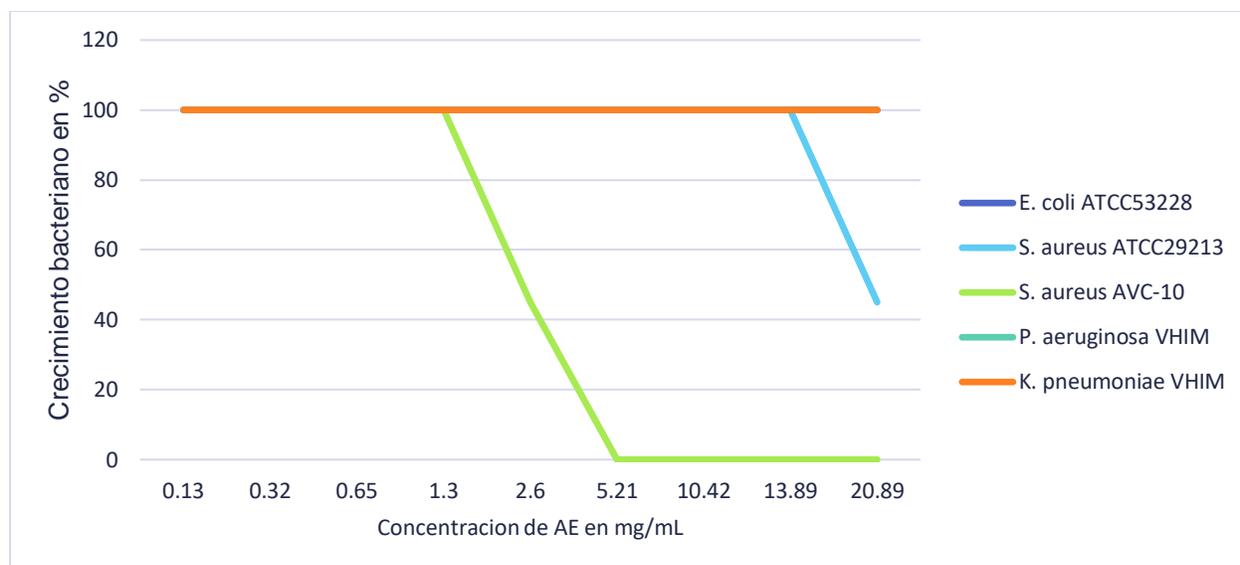


Figura 17. C Efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de AE.T.16 (AE3) vs cinco cepas bacterianas

Comparando las tres figuras de la **17 A - 17 C** a simple vista se puede ver que el aceite de Uruapilla 2015 es el mejor de los 3, inhibiendo el crecimiento de una cantidad mayor de bacterias. En los siguientes bioensayos se corroborará si los AE tienen actividad inhibitoria de la resistencia bacteriana combinando con antibióticos los cuales las bacterias a ensayar son resistentes. Se escogieron dos cepas bacterianas para la fase 2 de los bioensayos: una Gram positiva, *S. aureus* ATCC 29213 resistente a vancomicina y penicilina; y una Gram negativa, *P. aeruginosa* HIM resistente a cloranfenicol, ácido nalidíxico y carbenicilina. Estas bacterias son algunas de las que más comúnmente causan infecciones intrahospitalarias en México en la actualidad (PUIS UNAM, 2018).

7.5 Bioensayo de bioprospección de la inhibición de la resistencia a antibióticos con el método de micro diluciones en placa de Elisa, (parte 2)

La combinación de los aceites con vancomicina y ampicilina contra *S. aureus* ATCC 29213, dio un mejor resultado que con los aceites solos, en la figura 18 se puede ver una muestra de lo que se está hablando, la flecha en la figura indica el gradiente de concentración que va de mayor a menor concentración con cuatro repeticiones por tratamiento, se puede ver el color rojo en algunos de los pocillos de la placa esto indica que la bacteria convirtió el cloruro de tetrazolio a formazan el cual es un compuesto de color rojizo que indica que hubo crecimiento bacteriano, la ausencia de esta coloración por parte del indicador (TTC) se entiende como ausencia de metabolismo en el pocillo de la placa por lo que no hubo crecimiento bacteriano. (Figura 18).

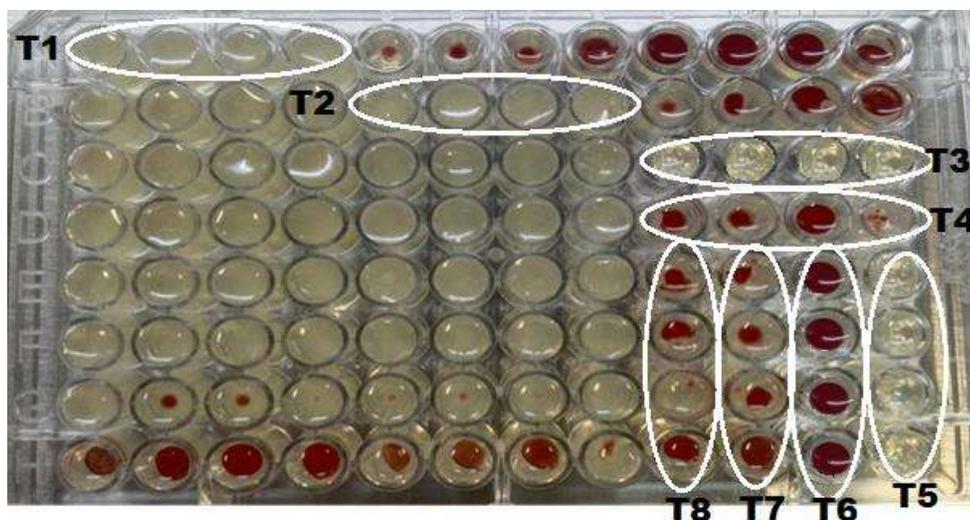


Figura 18. Microdiluciones en placa de Elisa de *S. aureus* ATCC 29213 vs AE.U.16 revelada con TTC y sus tratamientos T1 (bacteria + AE.U.16+ VA), T2 (bacteria + AE.U.16 +AMP), T3 (control de esterilidad), T4 (bacteria + AE.U.16), T5 (control positivo IMP) y T6 (control de crecimiento bacteriano), T7 (bacteria + AMP control negativo), T8 (bacteria + VA control negativo).

En la tabla 7 se encuentran las concentraciones mínimas de cada uno de los tratamientos con AE que inhibieron el crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213, el mejor resultado fue con el aceite de Uruapilla 2015 con las concentraciones mínimas inhibitorias más pequeñas de los tres aceites utilizados

Tabla 7. CMI de AE para *S. aureus* ATCC29213 en mg/ml; AE Uruapilla 2015 (AE 1); AE Uruapilla 2016 (AE 2); AE Tacícuaró 2016 (AE 3); ampicilina (AMP); vancomicina (VA).

Tratamientos	CMI mg/mL
AE1	0.49
AE2	16.9
AE3	20.84
AE1 AMP	0.49
AE2 AMP	2.1
AE3 AMP	1.3
AE1 VA	0.24
AE2 VA	0.53
AE3 VA	1.3

El en la parte estadística el crecimiento está representado por seis valores o categorías que van de 0 a 5, donde cero es igual a 0% y cinco es igual a 100% de crecimiento

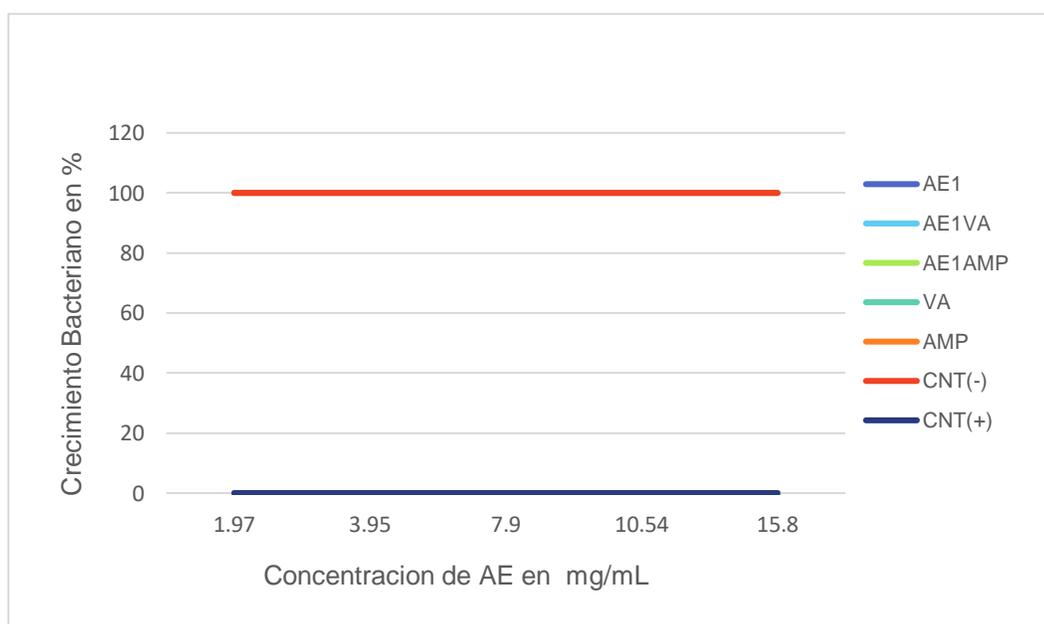


Figura 19 A. Diferencias en el efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.15 (AE1) en el crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213; concentración de AE (0.1 a 1.97 mg/mL); control de crecimiento positivo CNT (+); control de crecimiento negativo imipenem CNT (-).

bacteriano. En la figura 19.A se puede ver los diferentes tratamientos con AE, que van de una concentración de 1.97 a 15.8 mg/mL en el que es constante la inhibición del

crecimiento lo cual nos indica que, por sí solo y con antibióticos, el AE1 tiene actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano en estas concentraciones

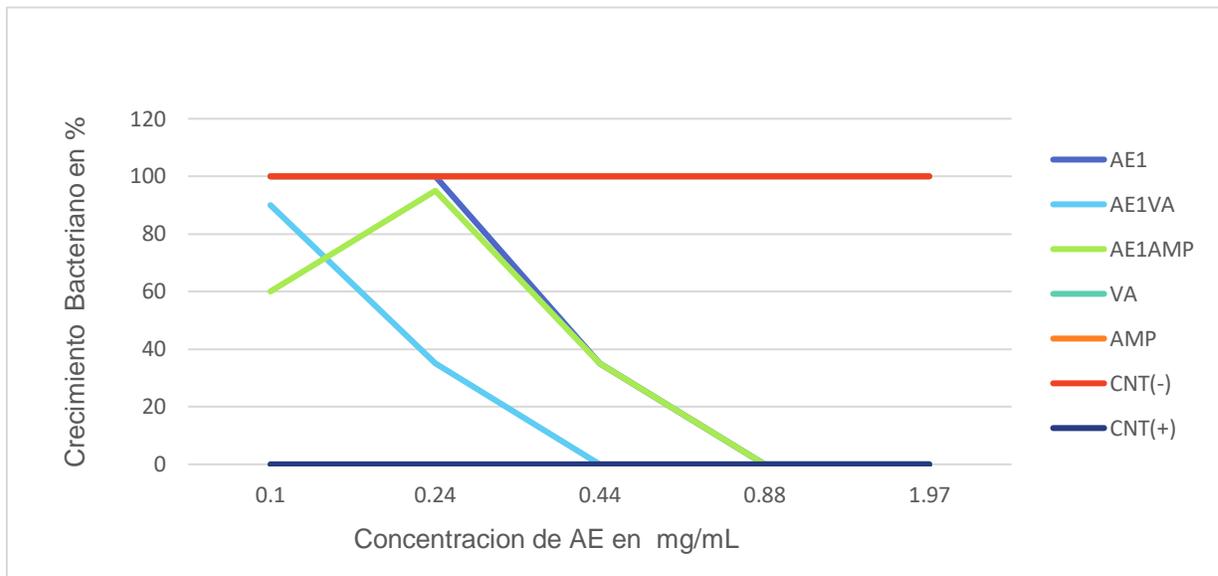


Figura 19 B. Diferencias en el efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.15 (AE1) en el crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213; concentración de AE (0.1 a 1.97 mg/mL); vancomicina (VA); control de crecimiento positivo CNT (+); control de crecimiento negativo, imipenem CNT (-).

En la gráfica de la figura 19 B se puede ver la diferencia en el crecimiento bacteriano, cuando baja la concentración de AE el que contiene antibiótico inhibe el crecimiento a una concentración más baja de AE, esto es un indicio de que hay una sinergia entre aceite esencial y antibiótico teniendo un mejor resultado con vancomicina que con ampicilina esto se puede ver también en las gráficas de las figuras 19 D Y 19 F.

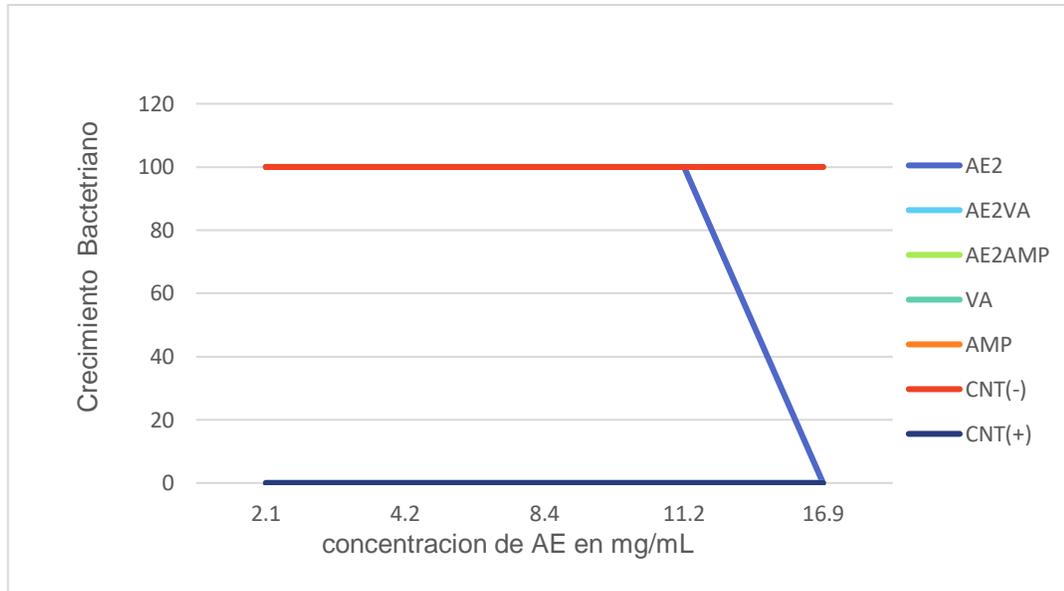


Figura 19 C. Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.16 (AE2) en el Crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213; concentración de AE (2.1 a 16.9 mg/mL); control de crecimiento positivo CNT (+); control de crecimiento negativo imipenem CNT (-).

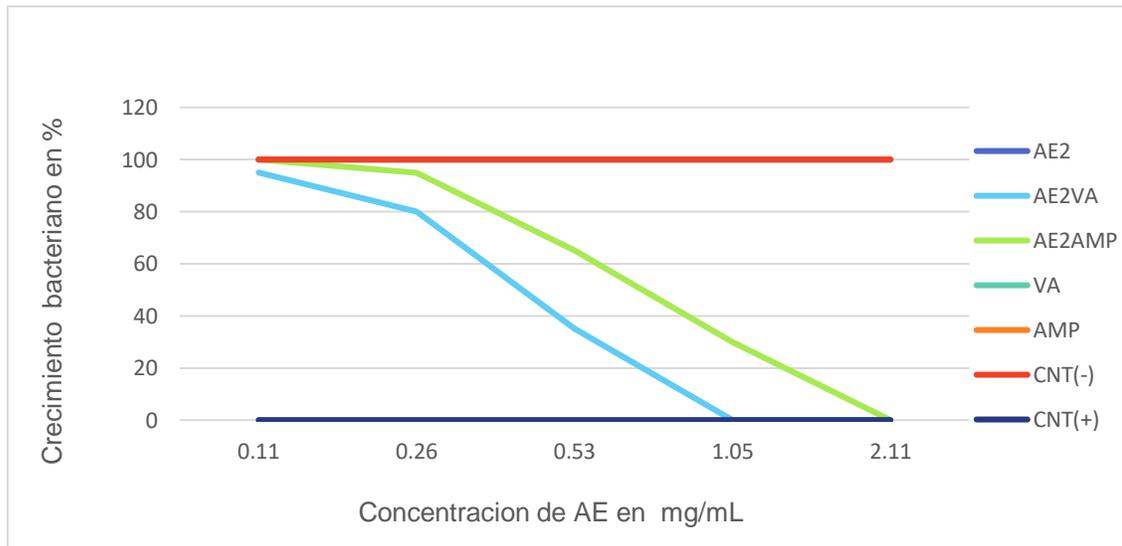


Figura 19. D Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.16 (AE2) en el Crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213; concentración de AE (0.11 a 2.11 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-).

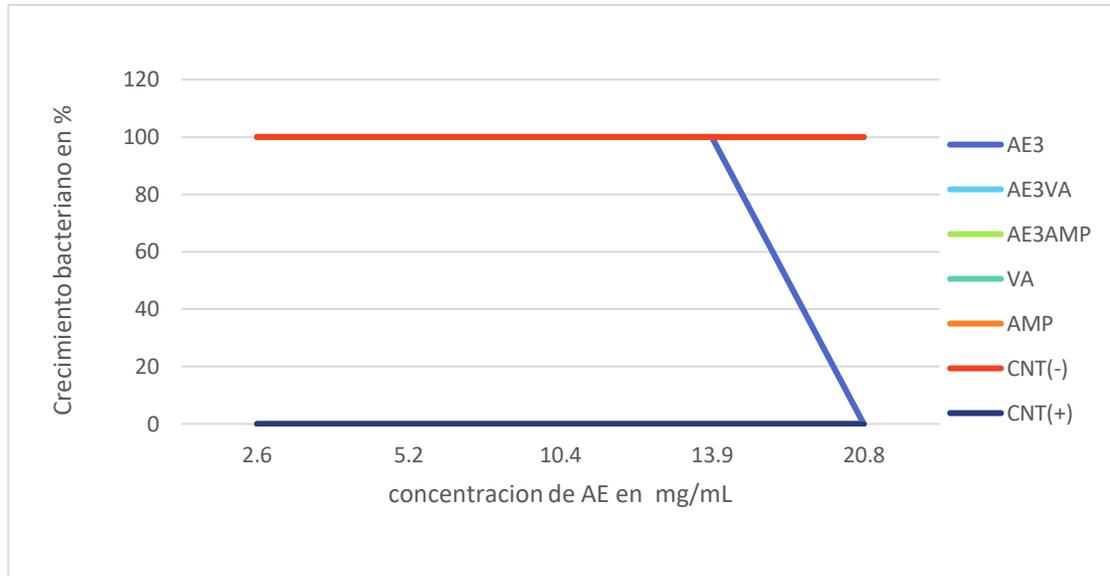


Figura 19. E Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.T.16 (AE3) en el Crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213; concentración de AE (2.6 a 20.8 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-).

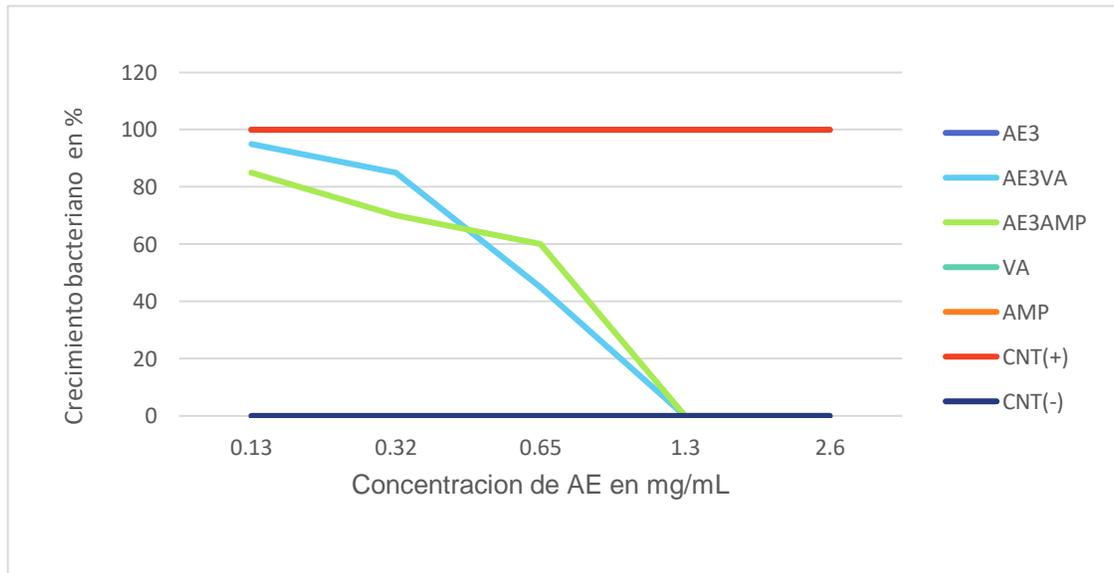


Figura 19.F Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.T.16 (AE3) en el Crecimiento bacteriano de *S. aureus* ATCC29213; concentración de AE (0.13 a 2.6 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-).

Al tratar *P. aeruginosa* HIM con los aceites en combinación con los antibióticos la CMI de AE.U.15 y AE.T.16, fue de 3.9 y 10.4 mg/ml respectivamente en combinación con cloranfenicol y una CMI de 10.5 y 10.4 mg/ml en combinación con ácido nalidíxico. Con respecto al AE.U.16 en combinación con los dos antibióticos la CMI fue de 152.1mg/ml en combinación con cloranfenicol y 168.9 mg/ml para ácido nalidíxico (Figura 20 tabla 8).

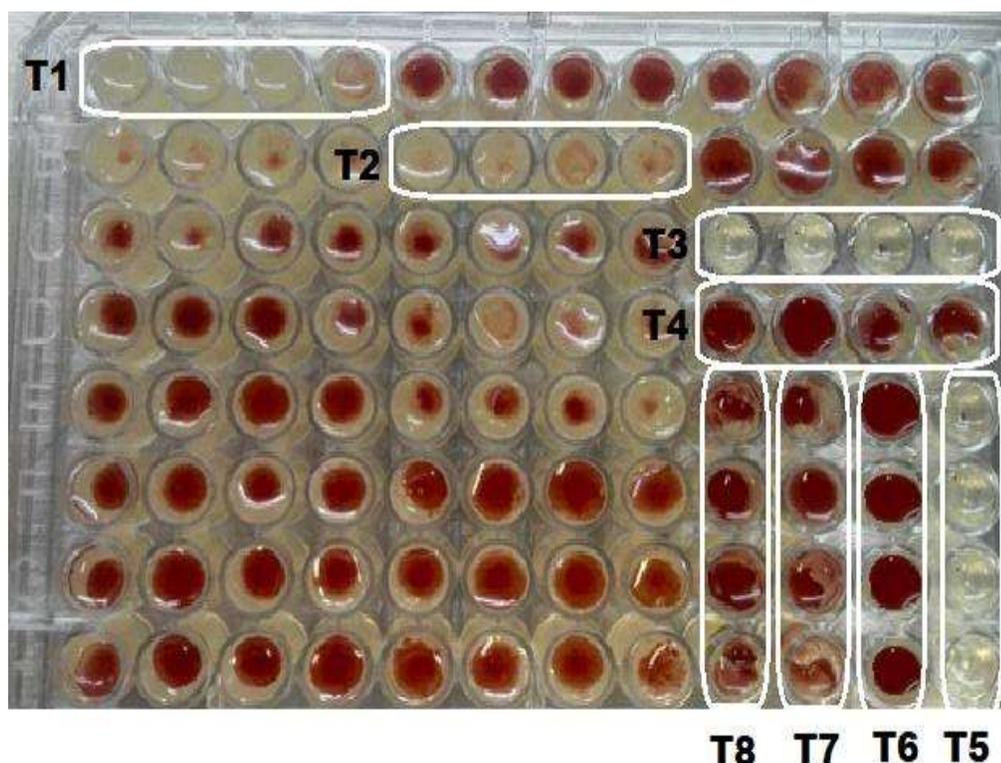


Figura 20. Microdiluciones en placa de Elisa de *P. aeruginosa* HIM vs AE.U.16 revelada con TTC y sus tratamientos T1 (bacteria + AE.U.16+ VA), T2 (bacteria + AE.U.16 +AMP), T3 (control de esterilidad), T4 (bacteria + AE.U.16), T5 (bacteria + IMP control positivo) y T6 (control de crecimiento bacteriano), T7 (bacteria + C control negativo), T8 (bacteria + NA control negativo).

Se observó que AE.U.15 Y AE.T.16. En combinación con antibióticos son similares estadísticamente y tienen un efecto similar en contra del crecimiento de *P. aeruginosa* VHIM (Figura 21 A, 21 B, 21 E Y 21 F). Aunque sabemos que en concentración de sus metabolitos varían, lo cual los hace diferentes.

Tabla 8. CMI de AE para *P. aeruginosa* HIM en mg/mL; AE Uruapilla 2015 (AE.U.15); AE Uruapilla 2016 (AE.U.16); AE Tacúcuaro 2016 (AE.T.16); Acido Nalidíxico (NA); Cloranfenicol (C). En negritas se indican los AE donde hubo una diferencia significativa en la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Tratamientos	CMI mg/mL
AE.U.15	7.9
AE.U.16	no inhibió
AE.T.16	no inhibió
AE.U.15 C	3.9
AE.U.16 C	152.1
AE.T.16 C	10.4
AE.U.15 NA	10.5
AE.U.16 NA	168.9
AE.T.16 NA	10.4

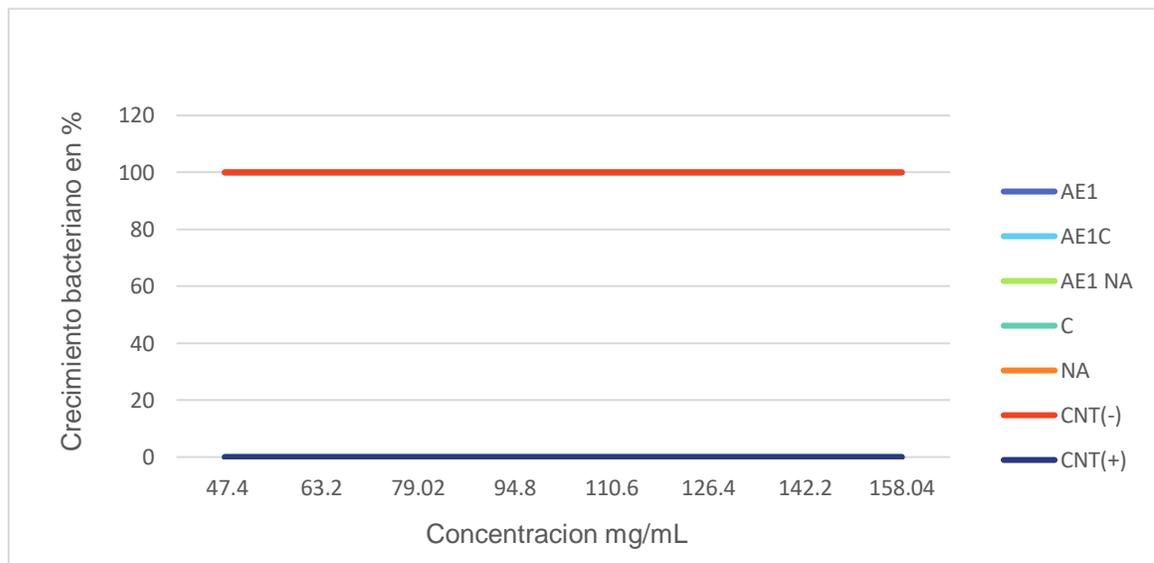


Figura 21.A Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.15 (AE1) en el Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* HIM; concentración de AE (47.4 a 158.04 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-) Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA)

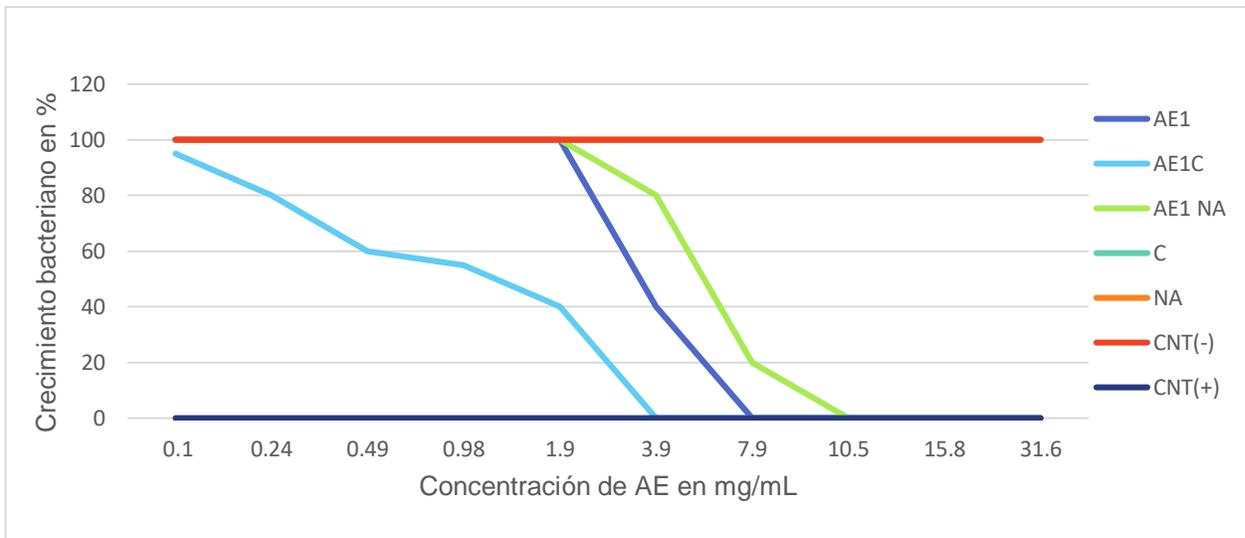


Figura 21.B Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.15 (AE1) en el Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* HIM; concentración de AE (0.13 a 2.6 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-) Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA)

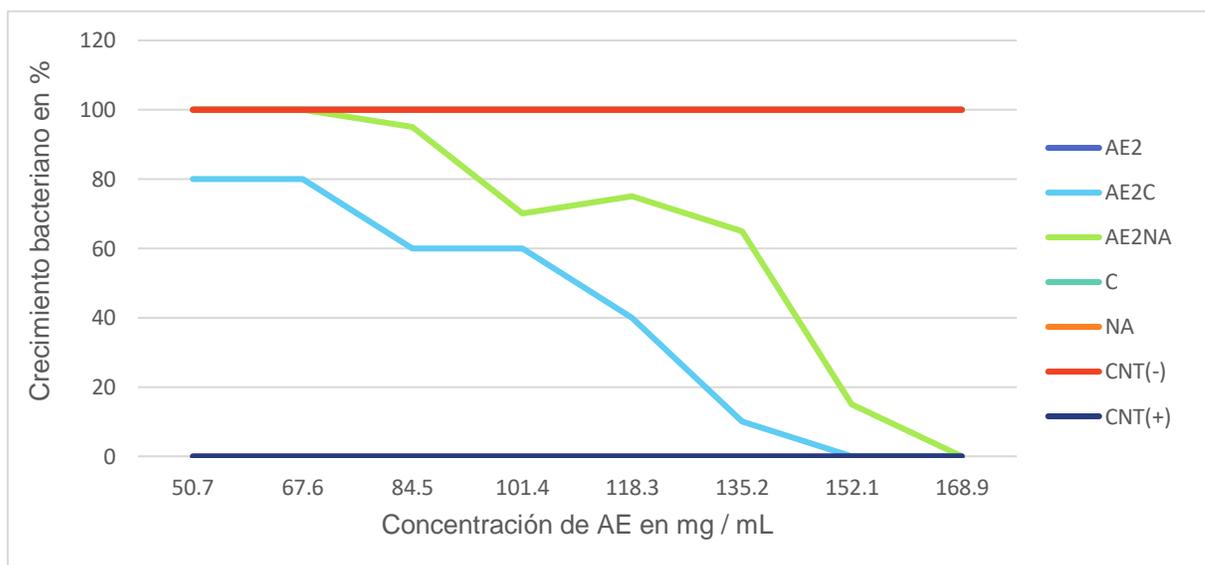


Figura 21.C Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.16 (AE2) en el Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* HIM; concentración de AE (0.13 a 2.6 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-) Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA)

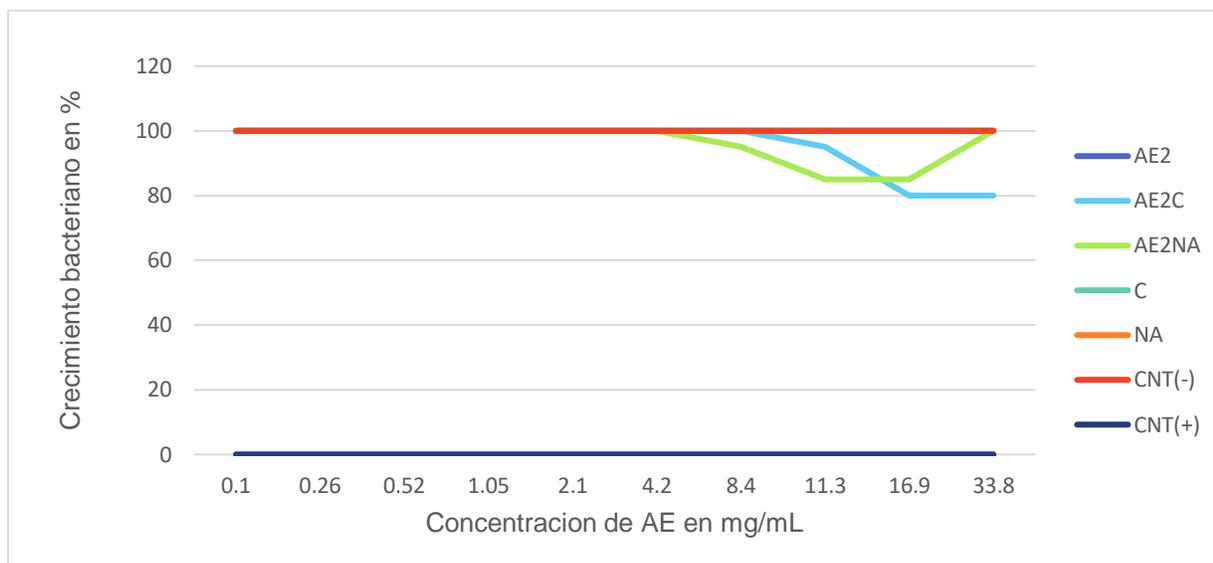


Figura 21.D Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.U.16 (AE2) en el Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* HIM; concentración de AE (0.13 a 2.6 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-) Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA)

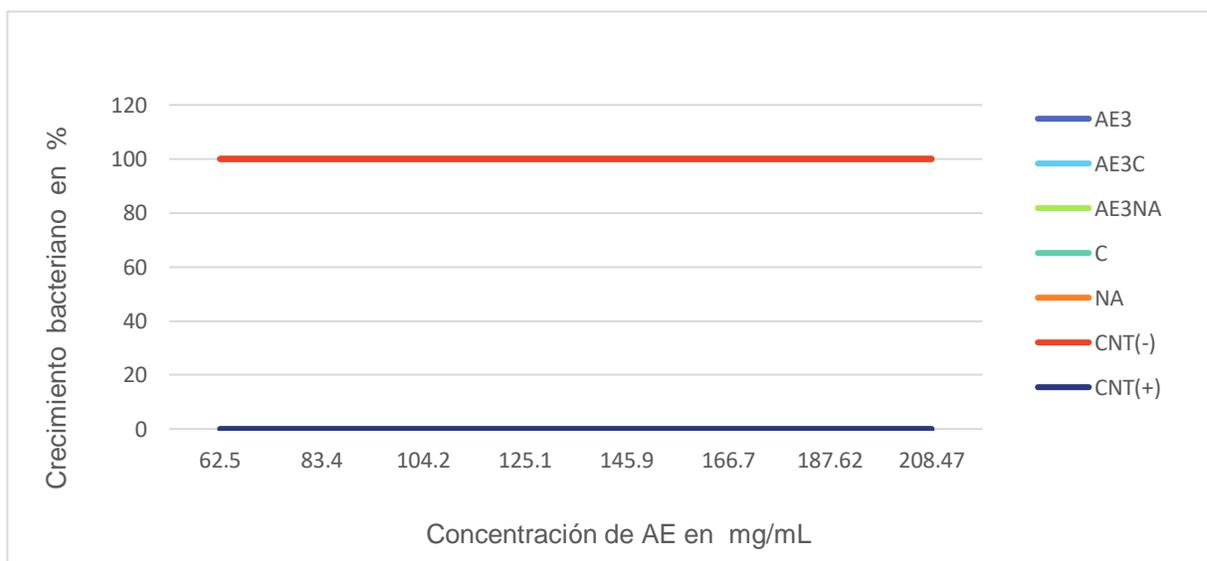


Figura 21.E Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.T.16 (AE3) en el Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* HIM; concentración de AE (0.13 a 2.6 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-) Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA)

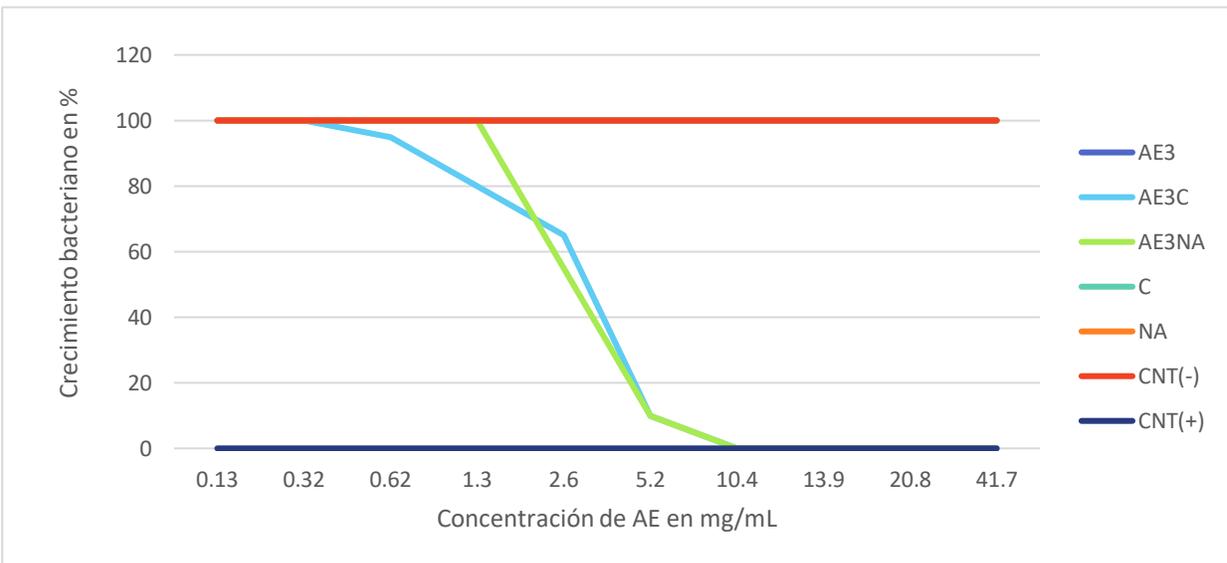


Figura 21.F Diferencias en el Efecto inhibitorio del aceite esencial AE.T.16 (AE3) en el Crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* HIM; concentración de AE (0.13 a 2.6 mg/mL), Control de crecimiento positivo CNT (+), control de crecimiento negativo imipenem CNT (-) Cloranfenicol (C) Ac. Nalidíxico (NA)

Se pudo observar que Para las dos bacterias utilizadas en esta segunda parte del bioensayo con el método de microdiluciones en placa, los AE tuvieron un mejor desempeño combinándolos con los antibióticos a los que las bacterias ensayadas son resistentes, disminuyendo la concentración en la que se puede observar la CMI la cual es menor que la de los AE solos.

Después de corroborar que efectivamente los AE de *T. lucida* si tiene una actividad antibacteriana y que inhiben la resistencia de algunos de los antibióticos se procedió al siguiente bioensayo en el cual se identificaron estos metabolitos.

7.6 Bioautografía.

En el método de bioautografía se separaron los componentes de los AE, en la cromatoplaaca se observó que no están del todo puros. La cromatoplaaca se dividió en 10 fracciones al revelarlas en luz UV (Figura 23), se inoculo con el agente patógeno como esta descrito en la parte de materiales y métodos esta se revelo con TTC que vira a rojo cuando hay respiración celular, los halos de inhibición identificados en la cromatoplaaca (Figura 22). Se rasparon en una cromatoplaaca que se corrió simultáneamente con la que se inoculo, se suspendieron en hexano y se inyectaron en CG-EM para una correcta identificación. Los MS que inhibieron el crecimiento bacteriano se encontraron en las fracciones puras o en mezclas de dos o más compuestos, los MS que coincidieron en la inhibición del crecimiento con dos de los antibióticos (VA, C) en los tres AE son geraniol, linalool y metil-eugenol Los otros compuestos que inhibieron a las bacterias, pero no en los tres AE, son estragol, geranil-acetato, cariofileno, nerolidol y ocimeno (Tabla 9).

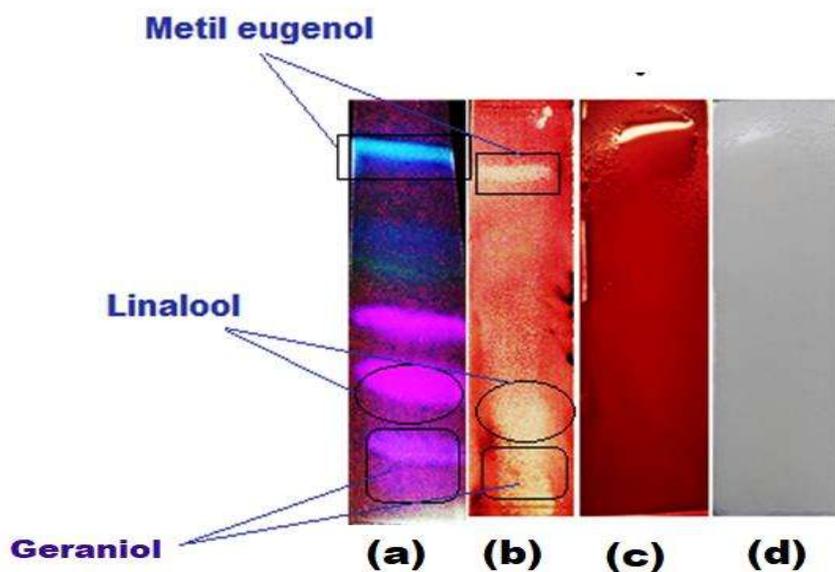
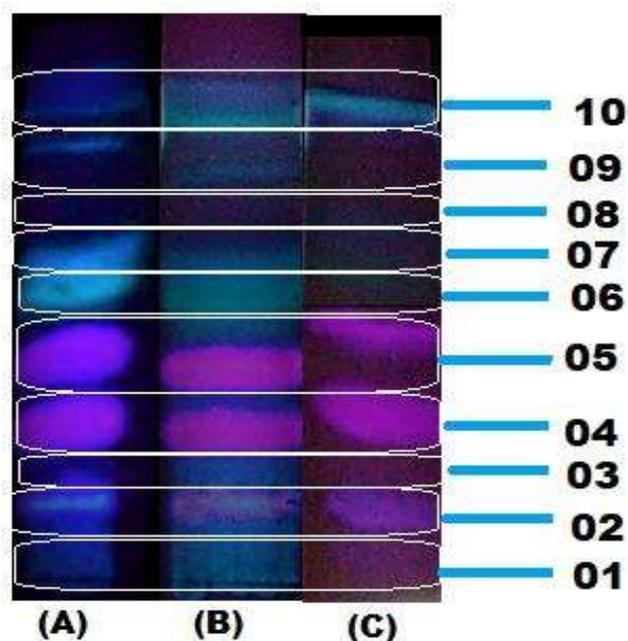


Figura.22. Bioautografía. (a) cromatoplaaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control positivo.



Fracción	AE.U.15	AE.U.16	AE.T.16
01	Geraniol	Geraniol	Geraniol
02	Geraniol	Geraniol	Geraniol
03	Geraniol	Geraniol	Geraniol
04	Geraniol, linalool	Geraniol	Geraniol
05	Geraniol, linalool	Geraniol	Geraniol
06	Geraniol linalool, estragol	Geraniol	Linalool
07	Geraniol linalool, estragol	Geraniol, linalool, estragol	Linalool, metil-eugenol
08	linalool, estragol	linalool, estragol, metil-eugenol	Linalool, metil-eugenol
09	linalool, estragol, , metil-eugenol	linalool, estragol, metil-eugenol, geranil-acetato	Linalool, metil-eugenol geranil-acetato
10	linalool, estragol,, metil-eugenol	linalool, estragol, metil-eugenol, geranil-acetato nerolidol cariofileno	Geranil-acetato cariofileno

Figura.23. Fracciones identificadas de AE.U.15 (A), AE.U.16 (B), AE.T.16 (C) en cromatografía de gases

Tabla 9. Metabolitos secundarios encontrados en halos de inhibición causados por AE Uruapilla 2015 (AE.U.15); AE Uruapilla 2016(AE.U.16) AE Tacúcuaro

2016(AE.T.16) más Vancomicina, Ampicilina y Cloranfenicol en las placas cromatográficas inoculadas con *P. aeruginosa* VHIM y *S. aureus* ATCC29213. Los MS en negritas se encontraron en halos de inhibición en los tres aceites.

Bacterias	Antibiótico	AE.U.15	AE.U.16	AE.T.16
<i>S. aureus</i> ATCC29213	AMP	Estragol Geraniol Linalool Metil-eugenol	Estragol Nerolidol Metil-eugenol	Geranil-acetato
	VA	Estragol Geraniol Linalool Metil-eugenol	Estragol Geranil-acetato Geraniol Linalool Metil-eugenol Nerolidol	Cariofileno Geranil-acetato Geraniol Linalool Metil-eugenol Nerolidol β-Ocimeno
<i>P. aeruginosa</i> HIM	C	Estragol Geraniol Linalool Metil-eugenol	Cariofileno Estragol Geraniol Linalool Metil-eugenol	Cariofileno Geranil-acetato Geraniol Linalool Metil-eugenol Nerolidol β-Ocimeno

8.-DISCUSIÓN

8.1 Variación en la composición química

En este trabajo se identificaron los MS del AE de *T. lucida* y se comprobó que la composición química puede variar entre año y sitio de colecta en la misma especie. Esta composición varía tanto en los MS mayoritarios como en los minoritarios. Dos de los aceites tienen una composición parecida en MS mayoritarios: Uruapilla 2015 (estragol 31.9%, metil eugenol 34.7%) y Uruapilla 2016 (estragol 13.3%, metil eugenol 9.5%), recolectados en el mismo lugar. Sin embargo, para Tacícuaró 2016 (estragol 0.4%, metil eugenol 0.9%), la composición de sus mayoritarios es completamente diferente. Está reportado que estragol y metil eugenol son componentes mayoritarios en aceites esenciales de *T. lucida* colectados en Uruapilla y en zonas cercanas a Capula en Michoacán (Méndez Rodríguez, 2011; Ramírez Ortiz, 2017) también se ha reportado que la composición química de aceites esenciales varía dependiendo de las condiciones de crecimiento de la planta (Méndez Rodríguez, 2011), esta variación puede afectar en la actividad terapéutica de los remedios herbolarios basados en aceites esenciales, causando que tengan una mayor o menor eficacia (García-Rodríguez et al., 2012).

8.2 Método difusión de Kirby-Bauer

El método de Kirby-Bauer utilizado en laboratorios clínicos, en el que se miden los halos de inhibición, no es el más adecuado para encontrar actividad antibacteriana o CMI en aceites esenciales ya que la difusión del aceite en el agar no es muy buena, dificultando la visibilidad de los halos de inhibición. (Ramírez & Marin Castaño, 2009). En contraste, el método de micro diluciones en agar es un método específico para aceites esenciales donde el AE se encuentra inmerso homogéneamente en el sustrato (Golus et al., 2016). Las microdiluciones permiten el uso de emulsificantes como el DMSO en bajas concentraciones. Se sabe que el DMSO tiene actividad antibacteriana en altas concentraciones, por lo que no se podría utilizar en el método de Kirby-Bauer debido a los volúmenes de sustrato que se utilizan. El uso de volúmenes muy pequeños es ideal cuando se trabaja con productos naturales, por lo que actualmente se está optando por

el método de microdiluciones en agar (Ramírez & Marin Castaño, 2009; Golus et al., 2016).

8.3 Actividad antibacteriana e inhibidora de la resistencia bacteriana

En la fase de actividad antibacteriana con el método de micro diluciones, se observó de una manera más fácil la actividad antibacteriana de Uruapilla 2015 en concentraciones más bajas que las usadas con el método Kirby-Bauer. Así se seleccionaron dos bacterias resistentes a antibióticos: *S. aureus* ATCC29213 y *P. aeruginosa* VHIM para estudiar con más precisión la inhibición de la resistencia bacteriana.

En los bioensayos de inhibición de la resistencia bacteriana, el AE de Uruapilla 2015 inhibió el crecimiento de *S. aureus* ATCC29213 y *P. aeruginosa* HIM, esta actividad no cambia mucho cuando el AE se combina con antibióticos. Con el AE de Tacícuaro 2016 por el contrario, se obtuvo un mejor resultado combinándolo con ampicilina, vancomicina, ácido nalidíxico y cloranfenicol, ya que Inhibieron el crecimiento de *S. aureus* ATCC29213 y *P. aeruginosa* HIM en concentraciones menores del AE. Esto indica que hay una sinergia entre los antibióticos y MS de estos aceites esenciales, lo que coincide con Yap *et al.* (2014), que comentan que los aceites esenciales pueden no tener actividad antibacteriana por sí solos pero que combinados con antibióticos pueden crear sinergia potenciando la actividad de los dos.

Con estos resultados se cumple una de las hipótesis de este trabajo, en la que se postula que los aceites esenciales de *T. lucida* contienen metabolitos secundarios inhibidores de mecanismos bioquímicos que habilitan la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales. Richards et al., (2016) mencionan que los MS actúan rompiendo la membrana bacteriana e inhiben enzimas, uniéndose a ellas. Los resultados sugieren que los MS de *T. lucida* inhiben algún mecanismo de resistencia bacteriana relacionados con los antibióticos probados (Yap *et al.*, 2014).

La concentración fue determinante para ver este efecto con el AE Uruapilla 2016 contra *P. aeruginosa* HIM utilizando una concentración mayor que los otros AE. Esto tal vez se deba a que la abundancia relativa de los componentes de los AE difiere entre las fechas y sitios donde se recolectaron. Por ejemplo, en el AE Uruapilla 2015 el componente mayoritario fue estragol con una concentración relativa de 36%, mientras que en Uruapilla 2016 fue de 13.3% y en Tacícuaro 2016 de 0.4 %; en los dos últimos AE, el componente mayoritario no fue estragol, Posiblemente algunos de estos MS estén funcionando como inhibidores del crecimiento bacteriano, requiriendo de concentraciones mayores para mostrar esta actividad (Senthilkumar & Venkatesalu, 2009). Así, estos resultados apoyan la segunda hipótesis que postula que la composición de los aceites esenciales determina actividad antibacteriana y modulación de la resistencia.

El AE de *Tagetes lucida* tiene actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y contra insectos plaga de varias frutas y verduras (Omer et al., 2015). Se ha comprobado que los AE de *T. lucida* tienen propiedades antibacterianas contra bacterias patógenas para seres humanos (Cano Perez, 2007; Rojas et al., 2012, Ramírez Ortiz, 2017). Se ha descrito la actividad antibacteriana en aceites esenciales de especies de plantas con estragol, linalool, geraniol y metil eugenol como MS mayoritarios (Regalado, et al, 2011; Pombo Ospina et al., 2016 Avetisyan et al., 2017; Ramírez Ortiz, 2017).

Así, el estragol y metil-eugenol, que fueron los compuestos mayoritarios en el AE de Uruapilla 2015, posiblemente son los causantes de los efectos antibiótico que se observó en esta investigación. También esto se confirmó con los bioensayos de la bioautografía, en los que se observó que las bandas cromatográficas que contenían estos compuestos inhibieron el crecimiento bacteriano.

Lo que no se sabía, es que la variación en la composición en los aceites esenciales de *Tagetes lucida* podría cambiar esta actividad, mostrando que los compuestos pueden ser menos eficaces que otros, por lo que se sugiere investigar con compuestos puros.

8.4 Identificación parcial de metabolitos secundarios activos.

Con en el método de bioautografía se identificaron varios MS que inhibieron el crecimiento bacteriano, en combinación con cloranfenicol, ampicilina y vancomicina contra *P. aeruginosa* HIM y *S. aureus* ATCC29213 respectivamente.

Los ensayos por este método mostraron que los MS mayoritarios (estragol, metil eugenol y geranil acetato) inhibieron el crecimiento bacteriano (Vega, 2013). Sin embargo, los MS minoritarios (geraniol, E-nerolidol, cariofileno, linalool) también están relacionados con esta actividad. Sorprendentemente, las manchas cromatográficas donde estaban metil eugenol, geraniol y linalool estaban en los tres aceites inhibiendo el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa* con vancomicina y con cloranfenicol.

En cromatografía de capa fina se detectó la mezcla de dos o tres metabolitos en una sola mancha cromatográfica que inhibió a las bacterias. Los monoterpenos geraniol, geranilacetato, linalool, y el fenilpropanoide estragol, tienen oxígeno en su estructura e inhiben el crecimiento bacteriano. Los compuestos con oxígeno o grupos hidroxilo en su estructura tienen más probabilidad a tener actividad antiséptica y antimicrobiana (Domingo & López-Brea, 2003; Maguna *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2012).

En trabajos realizados con *Ocimum basilicum* y *Pelargonium odoratissimum* se ha reportado actividad antibacteriana de sus AE en los que se encontraron geraniol, geranilacetato, linalool estragol y metil eugenol como MS mayoritarios (Pombo Ospina *et al.*, 2016). Estos compuestos están presentes en los AE de *T. lucida* como MS mayoritarios y minoritarios, lo que sugiere que dentro de la misma planta los MS podrían actuar aditivamente o sinérgicamente potenciando el efecto unos de otros. Esto podría favorecer al tratamiento con antibióticos convencionales pues se atacaría a más de un mecanismo de resistencia bacteriana en contraste con los antibióticos convencionales que solamente atacan un mecanismo de acción específico.

Los AE de la mayoría de las plantas se han aprobado como aditivos para alimentos como conservadores en la categoría de GRAS (Por sus siglas en inglés Generally Recognized as Safe) por lo que se consideran inofensivos para el consumo humano. (Kim, Marshall, & Wei, 1995) Se espera que en un futuro se puedan utilizar como coadyuvantes en la

terapéutica junto a antibióticos convencionales para resolver el problema de la resistencia a antibióticos.

9.-CONCLUSIONES

La composición del aceite esencial de *T. lucida* varía de acuerdo a la época y sitio de colecta, en la proporción de sus compuestos mayoritarios y minoritarios. Esta variación química afecta la actividad antimicrobiana del aceite solo y en combinación con antibióticos comerciales contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Los aceites esenciales de *T. lucida*, por si solos inhiben el crecimiento bacteriano siendo Uruapilla 2015 el más eficaz inhibiendo bacterias Gram positivas y Gram negativas. Mostrando una mayor actividad contra Gram positivas solos y en combinación con antibióticos comerciales.

Los compuestos detectados con actividad inhibitoria *in vitro* son geranil acetato, estragol, geraniol, linalool, metil eugenol, cariofileno y E-nerolidol. Los metabolitos secundarios a los que se les atribuye la actividad inhibitoria de la resistencia son: linalool, metil eugenol y geraniol ya que se encuentran en bandas cromatográficas con halos de inhibición presentes en las fracciones de los tres aceites.

10.- RECOMENDACIONES.

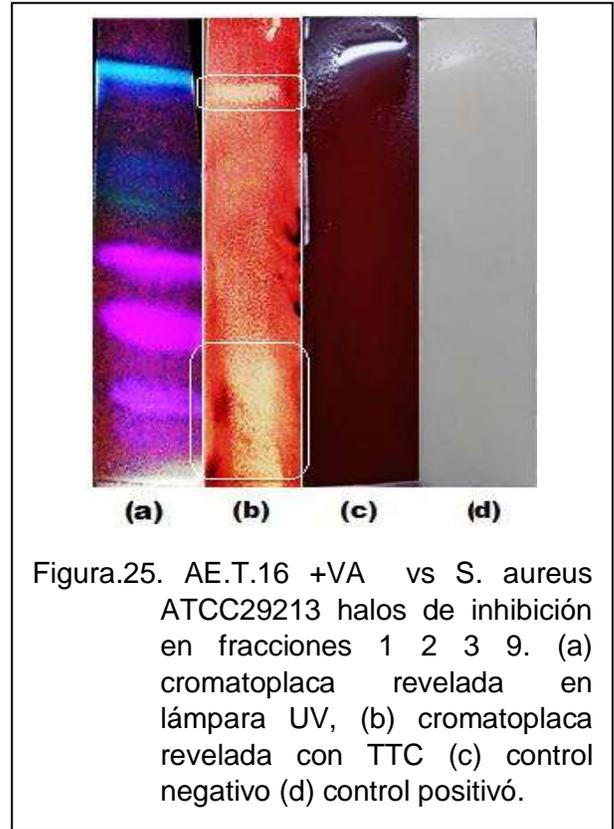
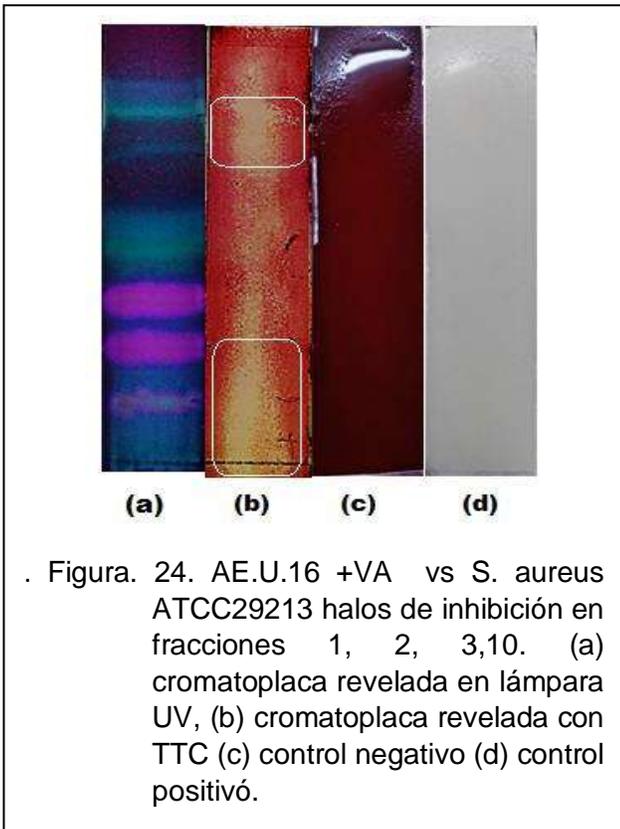
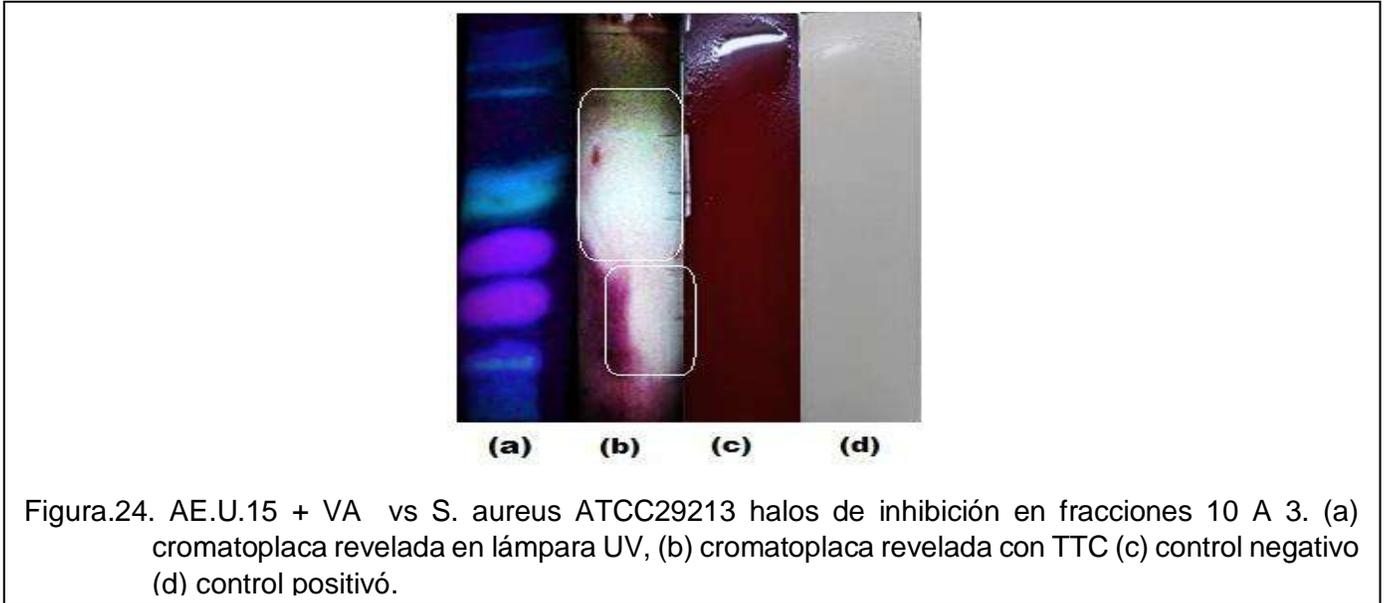
En este trabajo se detectaron los compuestos que inhiben la resistencia bacteriana a antibióticos, aunque estos compuestos vienen en mezclas de dos o tres, para tener una mayor certeza de que solo uno de estos compuestos es responsable de la actividad inhibitoria de la resistencia bacteriana de los aceite esencial de *T. lucida* se recomienda:

- Colectar una gran cantidad de *T. lucida* para asegurar una cantidad mayor de AE
- Fraccionar el aceite en cromatografía de columna obteniendo unos compuestos más puros.

- Probar los compuestos solos o en mezcla y con antibióticos a diferentes concentraciones, para ver si este efecto es solo de un metabolito o es en mezclas de estos.
- Identificar los mecanismos de defensa bacterianos inhibidos por estos metabolitos. Probar si inhiben solo un mecanismo o varios mecanismos y si estos están relacionados con los antibióticos probados.

11.-ANEXOS

11.1.- Cromatoplasmas de bioautografía



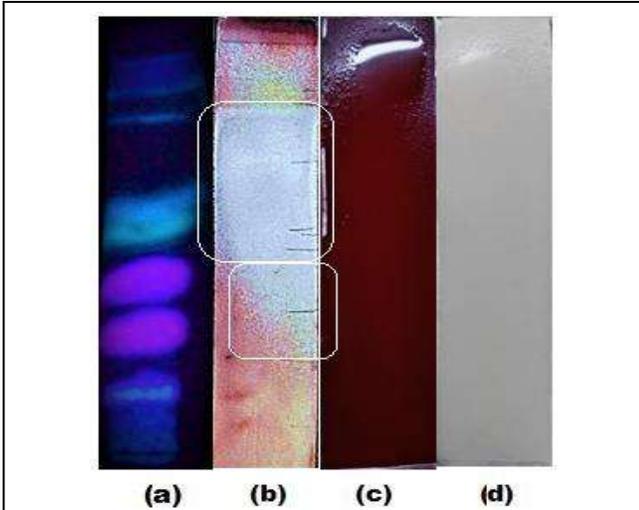


Figura.27. AE.U.15 + AMP vs *S. aureus* ATCC29213 halos de inhibición en fracciones 5 a10 (a) cromatoplaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control positivo.

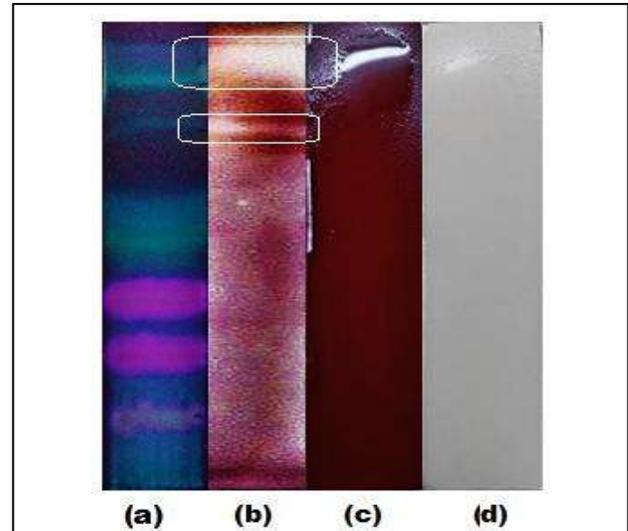


Figura.28. A2E+AMP vs *S. aureus* ATCC29213 halos de inhibición en fracciones 9y10, (a) cromatoplaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control

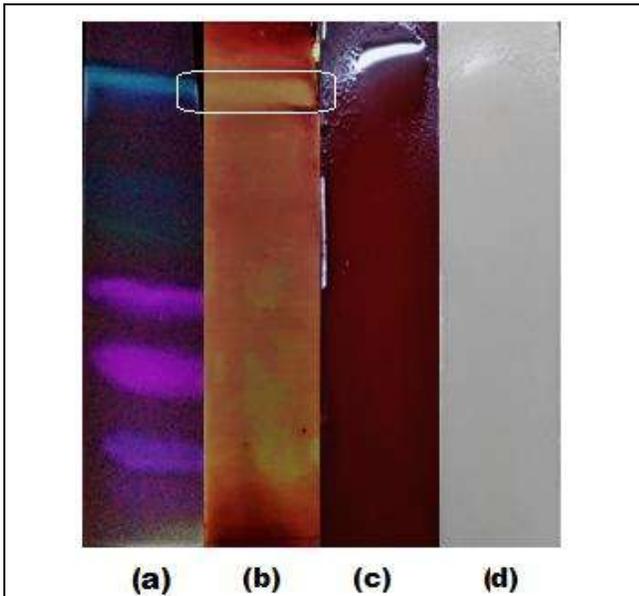


Figura.29. AE3 + AMP vs *S. aureus* ATCC29213 halos de inhibición en fracciones 10(a) cromatoplaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control positivo.

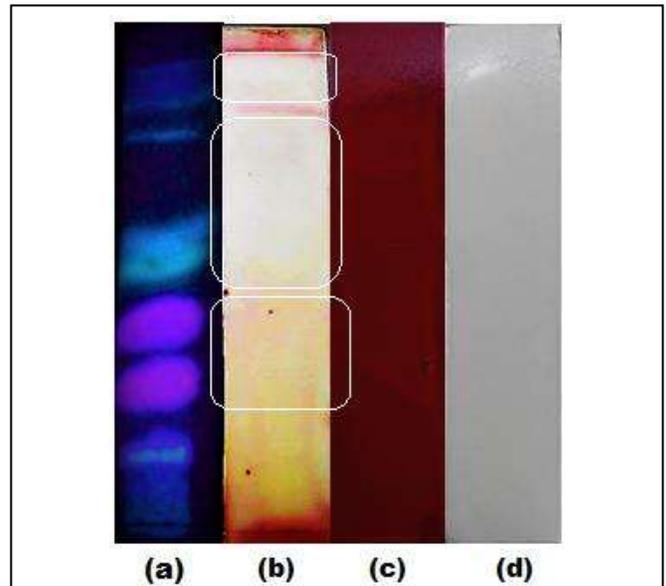


Figura.30. AE1+Cloranfenicol vs *P. aeruginosa* halos de inhibición en fracciones 7,8,9,10, (a) cromatoplaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control positivo.

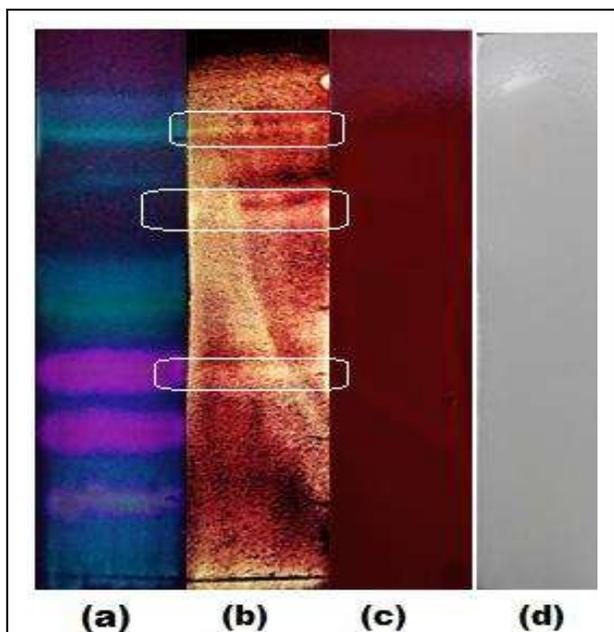


Figura.31. AE.U.16+Cloranfenicol vs *P. aeruginosa* halos de inhibición en fracciones 1, 5, 9, 10 (a) cromatoplaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control positivo.

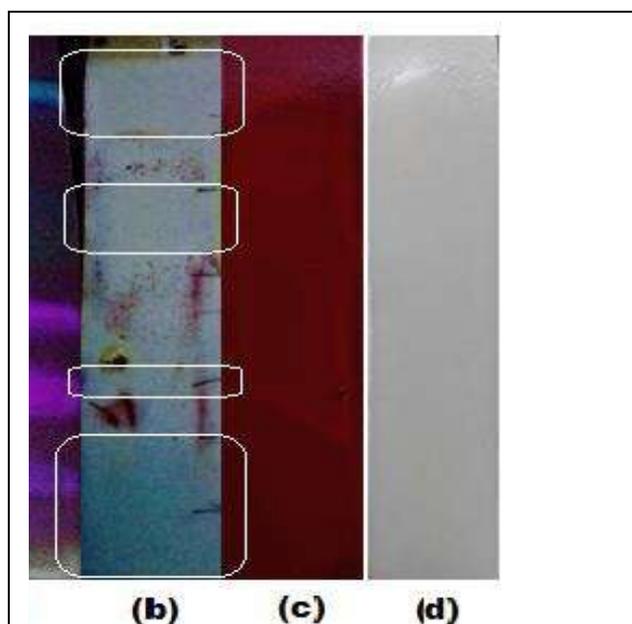
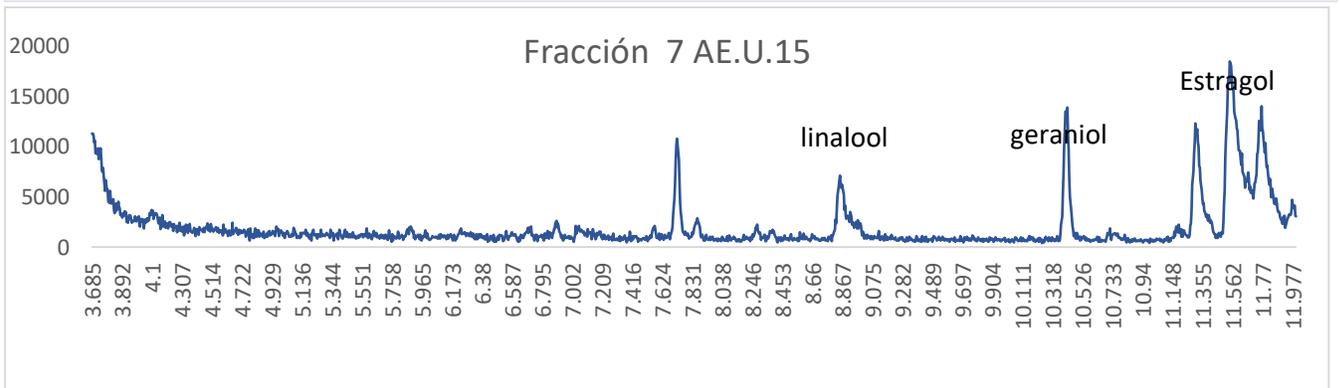
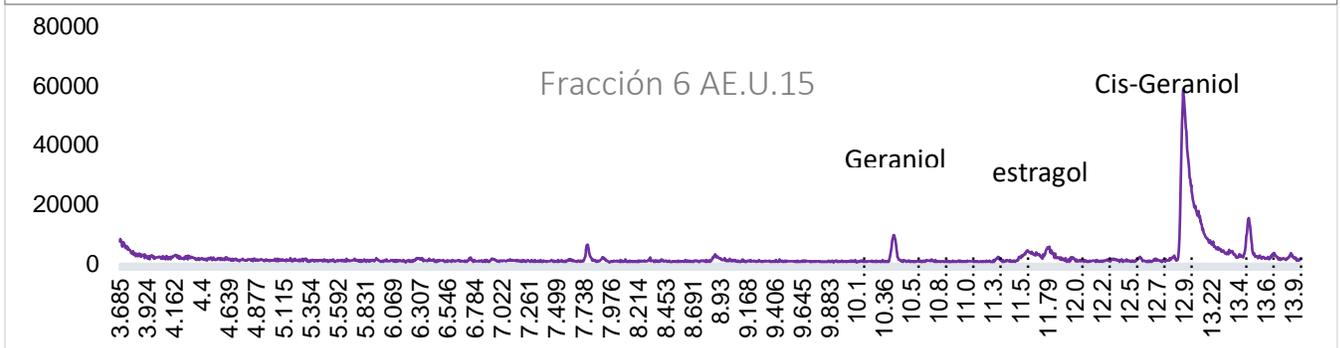
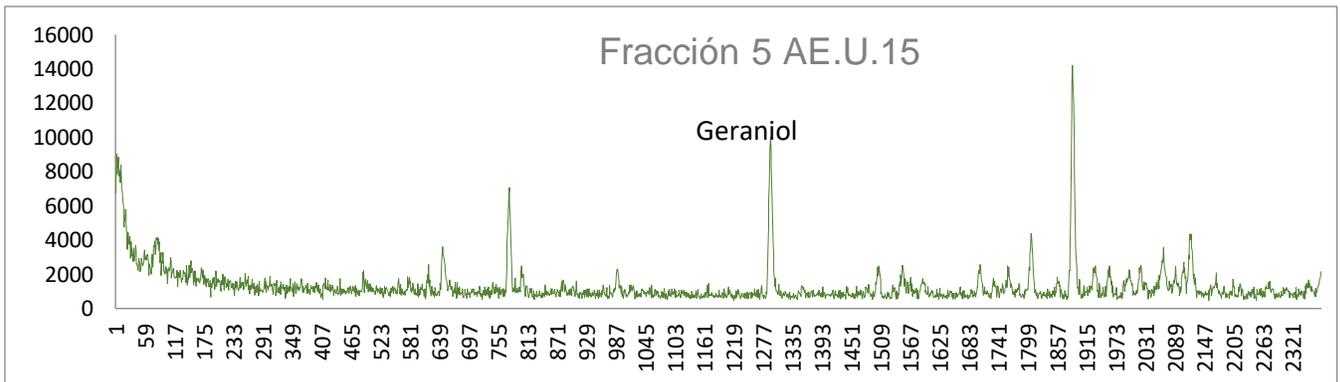
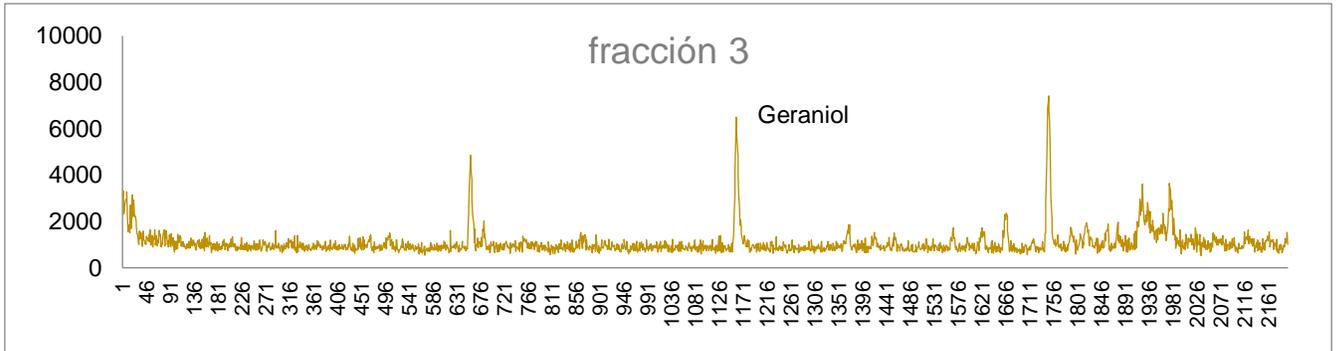
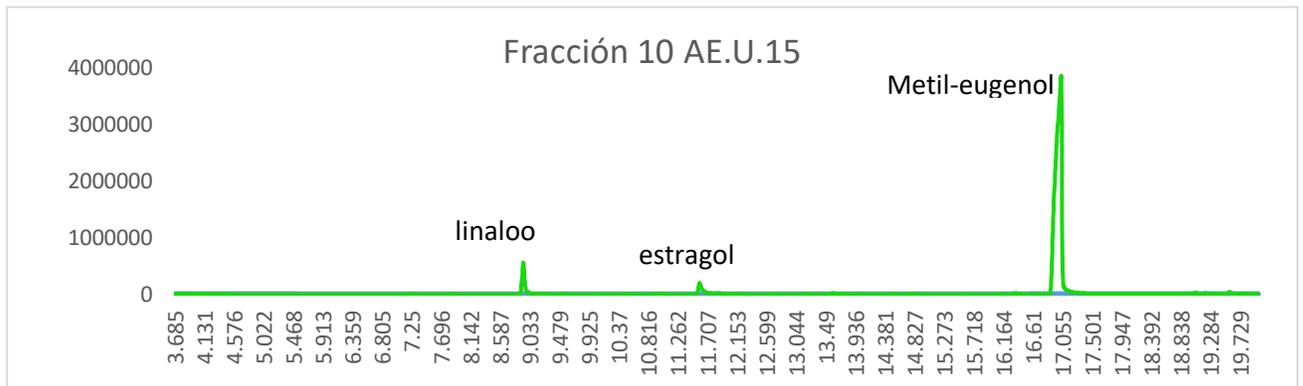
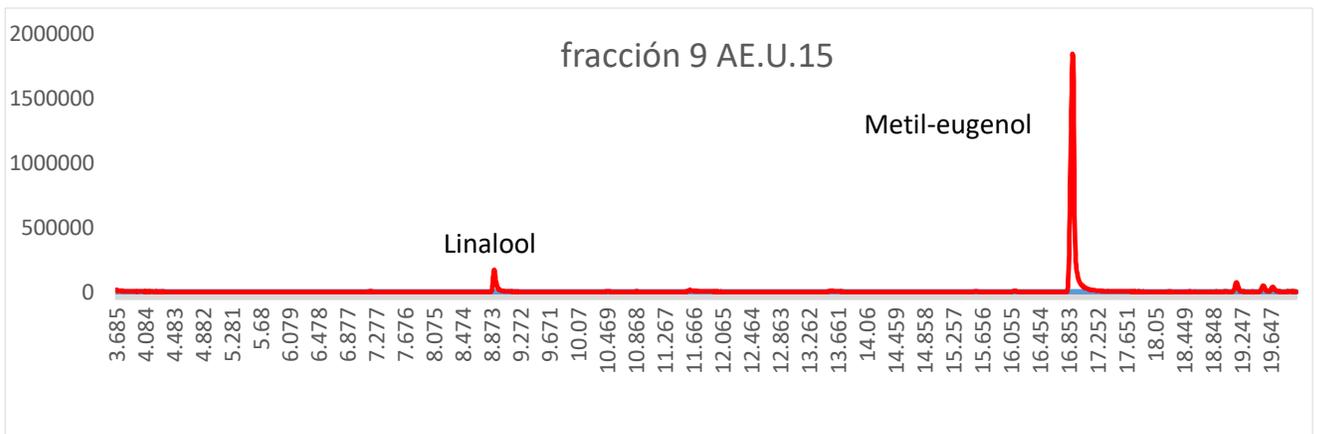
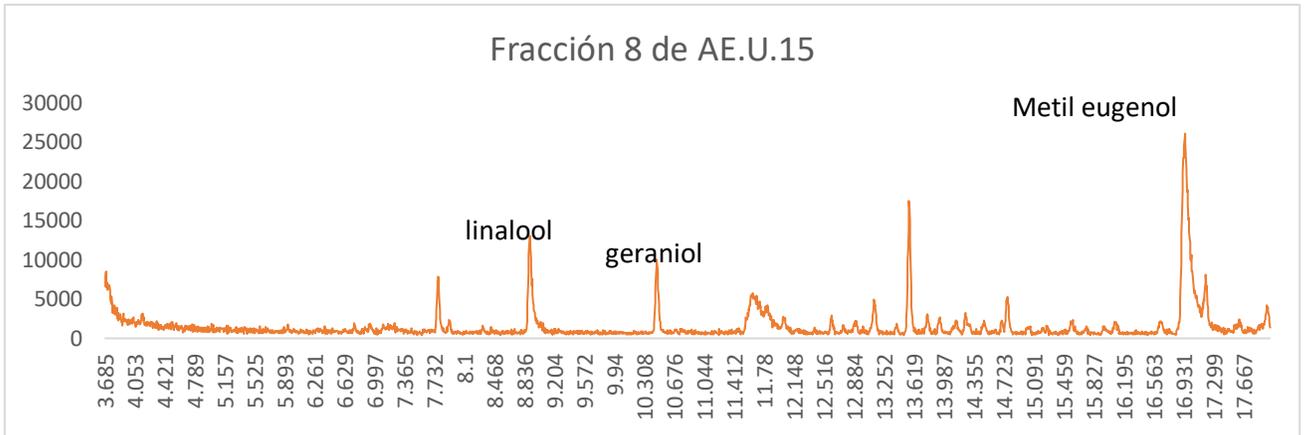
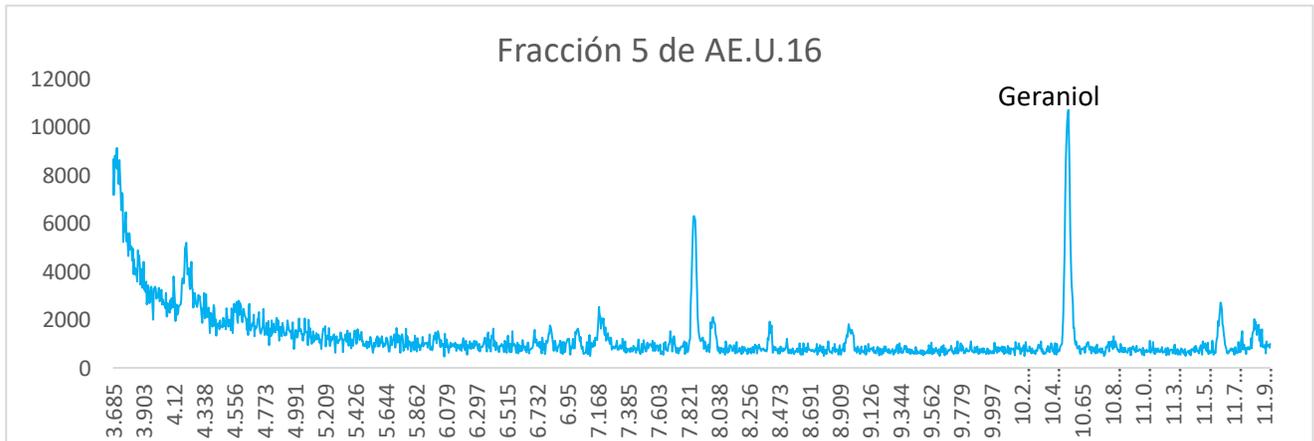
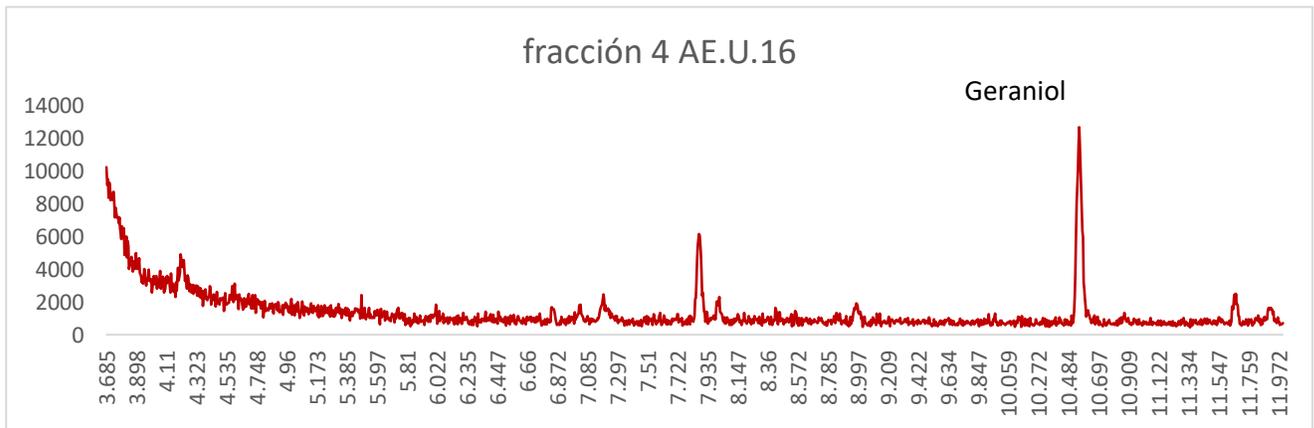
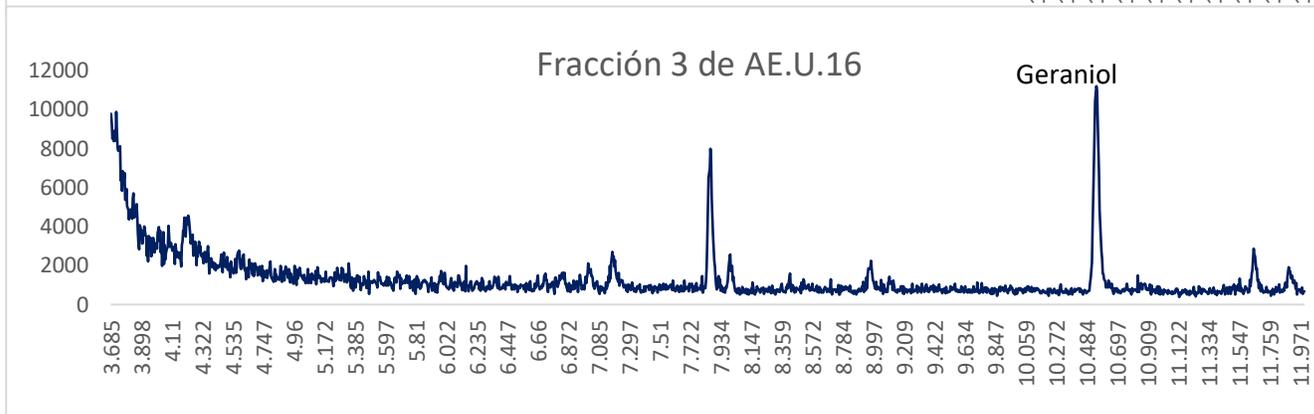
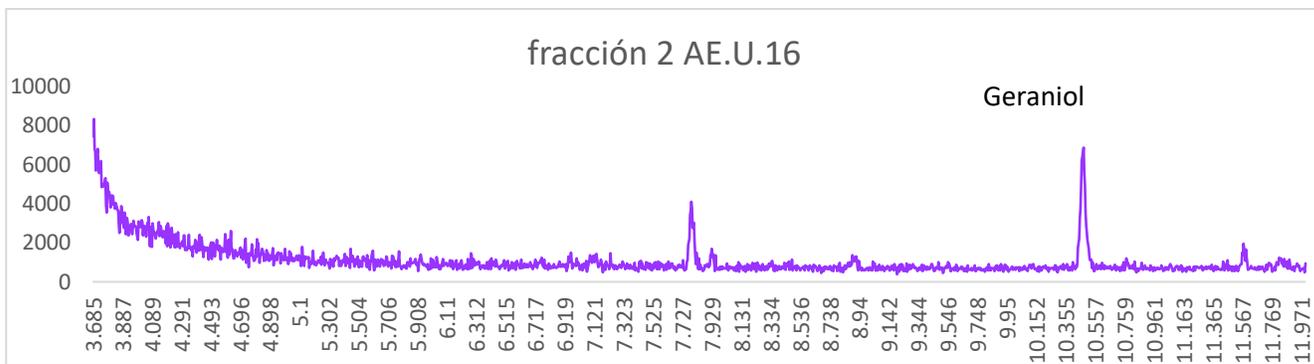


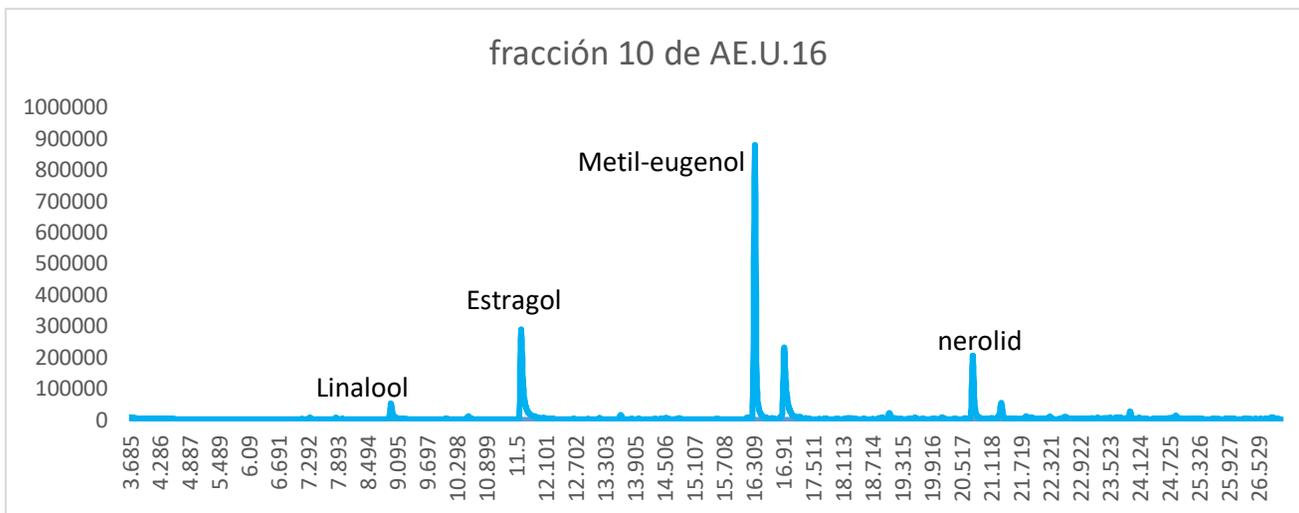
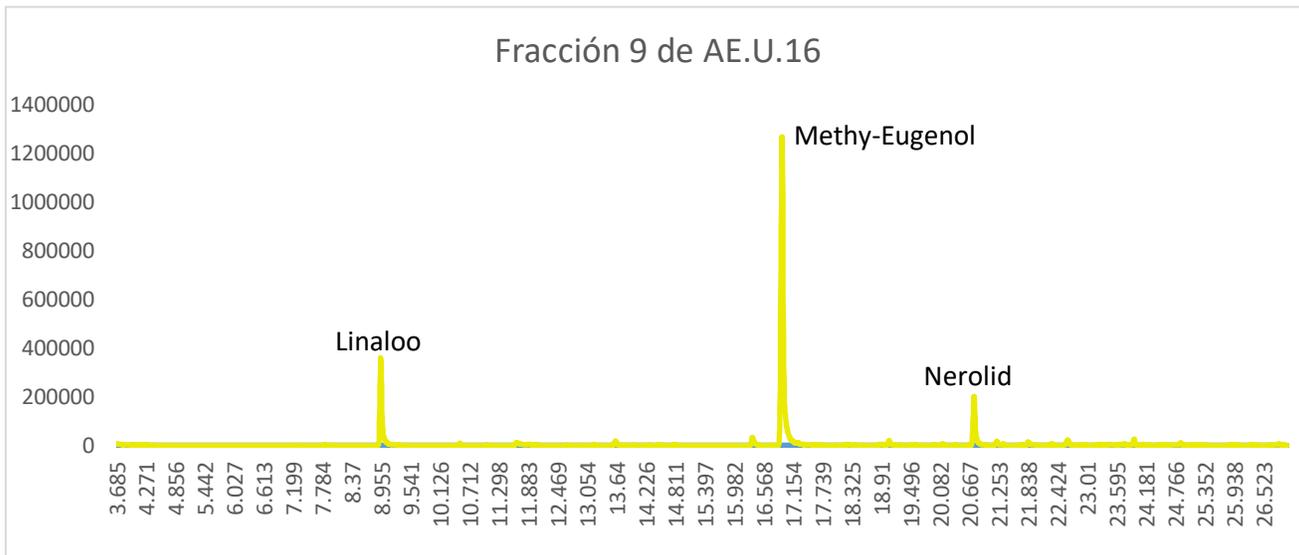
Figura.32. AE.T.16+cloranfenicol vs *P. aeruginosa* HIM halos de inhibición en fracciones 1, 2, 3,4, 6, 7, 9, 10(a) cromatoplaca revelada en lámpara UV, (b) cromatoplaca revelada con TTC (c) control negativo (d) control positivo.

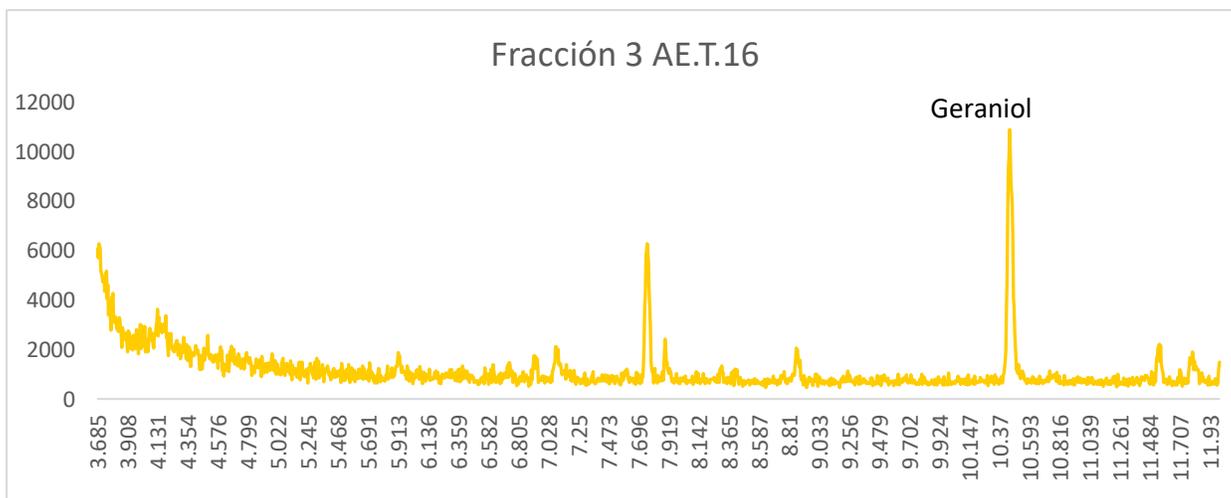
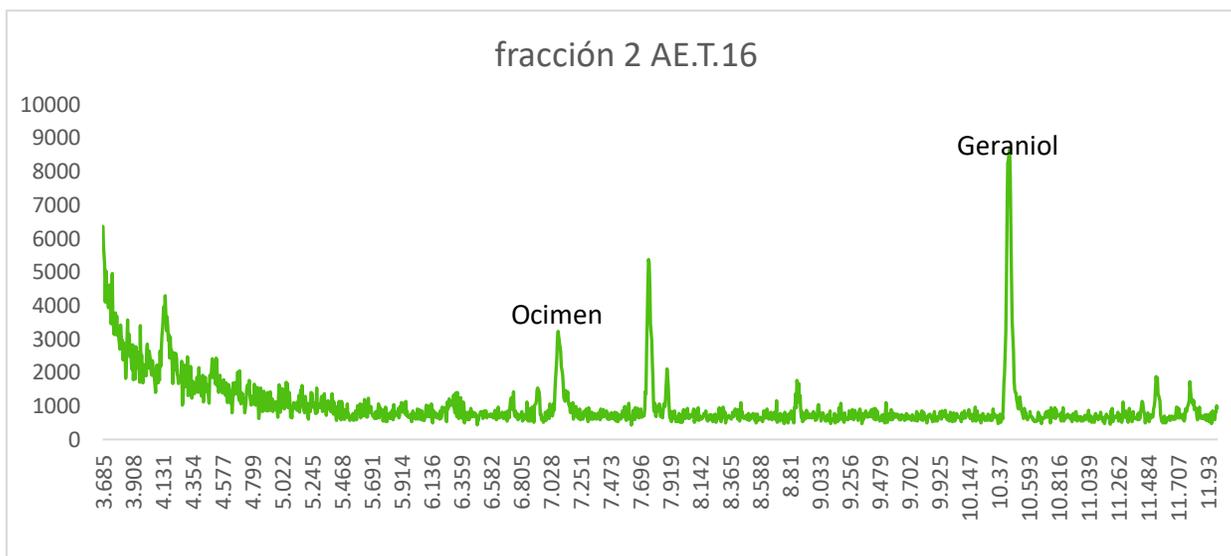
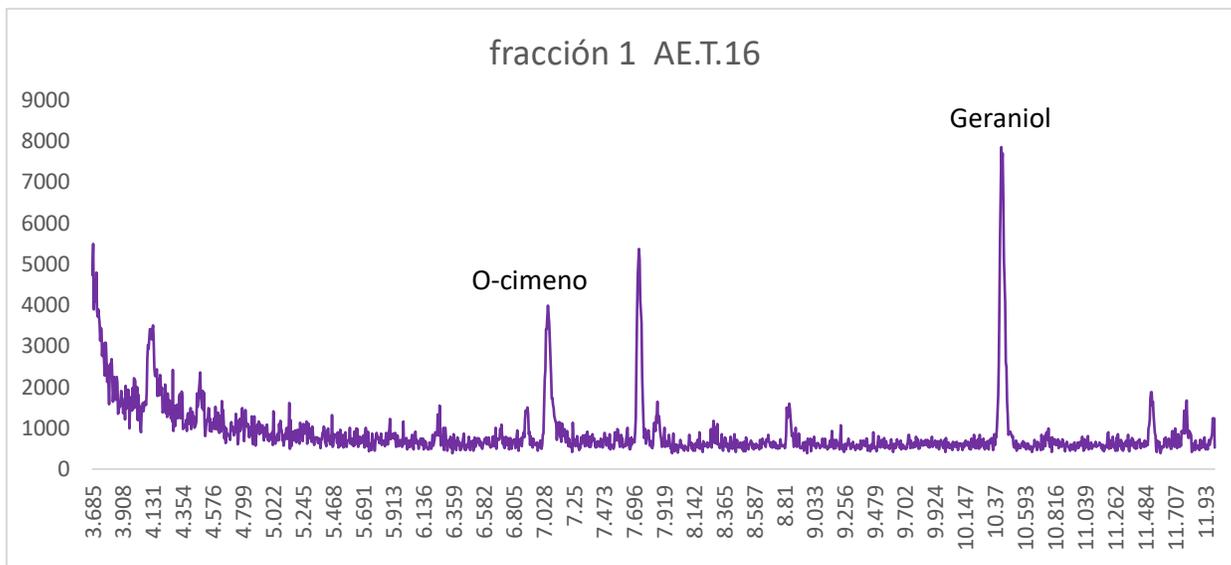
11.2.- Cromatograma de las fracciones donde se encontraron halos de inhibición bacteriana en cromatoplasas.

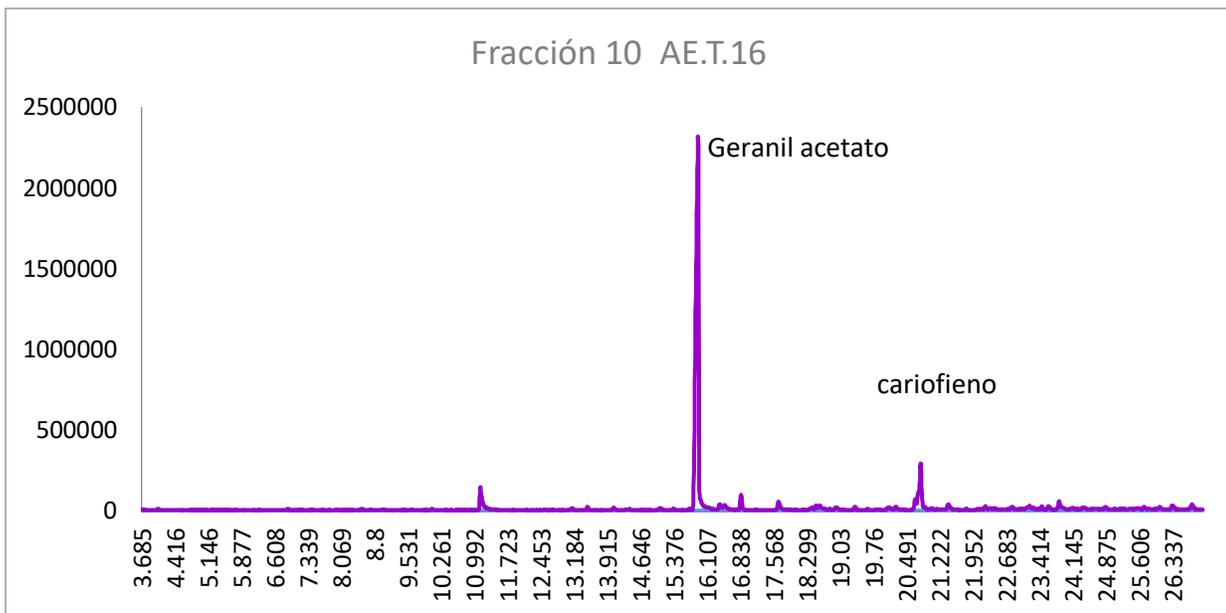
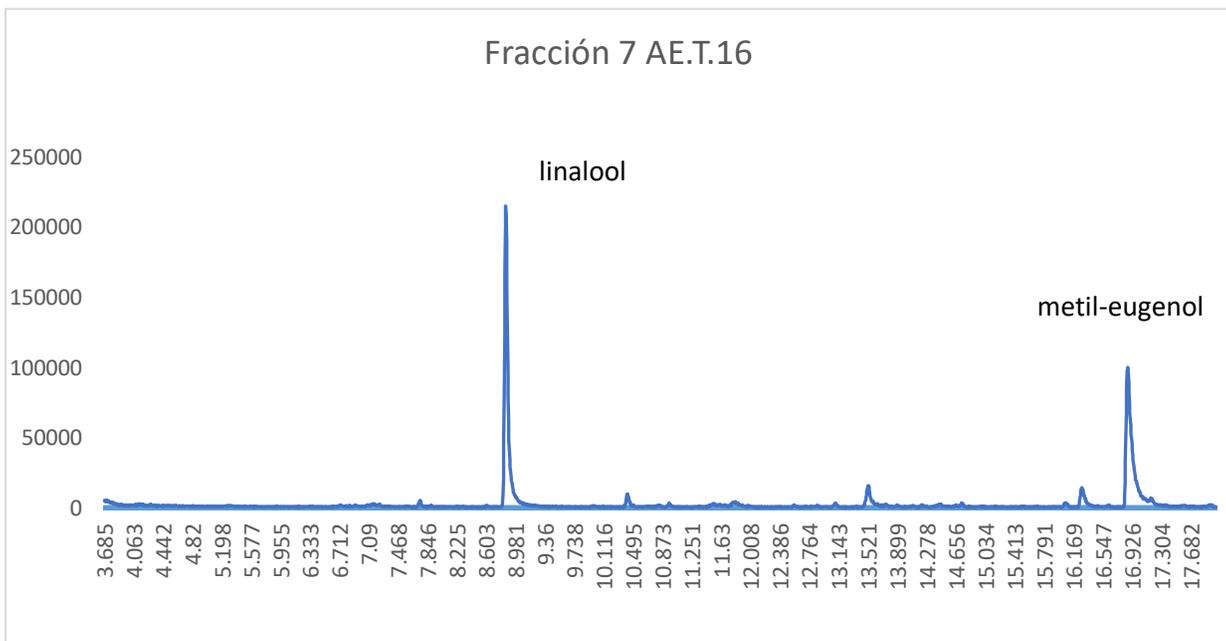












12.-BIBLIOGRAFIA

- Anaya Lang, A. L. (2003). *Eecología Química*. (P. Y. V. S. A. DE C.V., Ed.) (Primera).
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. <https://doi.org/1989-3620>
- Avetisyan, A., Markosian, A., Petrosyan, M., Sahakyan, N., Babayan, A., Aloyan, S., & Trchounian, A. (2017). Chemical composition and some biological activities of the essential oils from basil *Ocimum* different cultivars. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1587-5>
- Barajas Pérez, J. S., Montes-Belmont, R., Castrejón Ayala, F., Flores-Moctezuma, H. E., & Serrato Cruz, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género. *Revista Mexicana de Micología*, 34(2), 85–91.
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 102–111. Retrieved from http://www.hiba.org.ar/archivos/noticias_attachs/47/documentos/7482_102-111-belloso.pdf
- Borges, A., Abreu, A. C., Dias, C., Saavedra, M. J., Borges, F., & Simões, M. (2016). New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*, 21(7), 877. <https://doi.org/10.3390/molecules21070877>
- Borges, A., Abreu, A. C., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simões, L. C., & Simões, M. (2015). Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4737–4748. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1533-1>
- Bravo-Monzón, A. (2015). *Variación Química Y Genética Entre Las Poblaciones De Mikania micrantha H.B.K. Y Su Efecto En La Herbivoría*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2537.3601>
- Bravo-Monzón, Á. E., Ríos-Vásquez, E., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. (2016). Differential herbivory of the specialist beetle *Stolas punicea* on chemical phenotypes of its host *Mikania micrantha*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(3), 419–425. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1118436>
- Cabrera, C., Fabian, G., & Zuñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibioticos, antisepticos y desinfectantes. Una manifestacion de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38, 149–158.
- Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., & Brüssow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Current Opinion in Microbiology*, 6(4), 417–424. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00086-9)
- Cano Perez, C. A. (2007). Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña.” *Universidad Nacional*

- Mayor de San Marcos*, 25(3), 1–7. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- De Sá Del Fiol, F., De Mattos Filho, T. R., & Groppo, F. C. (2000). Resistencia bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina*, 57(10), 1129–1140. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200008>
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 16(4), 385–393.
- García Rodríguez, Y. M., Bravo Monzón, A., & Martínez Díaz, Y., Torres Gurrola, G y Espinosa García, F. J. (2012). Variación Fitoquímica Defensiva en Ecosistemas Terrestres. *Temas Selectos En Ecología Química de Insectos*, (March 2017), 217–252.
- Golus, Sawicki, R., Widelski, J., & Ginalska, G. (2016). The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1291–1299. <https://doi.org/10.1111/jam.13253>
- González, A., & Castro, M. (2008). Papel ecológico de los metabolitos secundarios. *LACANDONIA (Revista de Ciencias de La UNICACH*, 2(1), 123–130. Retrieved from <http://cuid.unicach.mx/revistas/index.php/lacandonia/article/view/143/144>
- Hashemi, L., & Murphy, R. (2004). English Grammar in Use Supplementary Exercises with Answers, 142. <https://doi.org/10.2307/326902>
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkha, B., & Mehmandar, F. B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal*, 1(November), 11–17.
- Javier, F., Ibarra, O., Méndez, I. M., Acevedo, A. G., Figueroa, J. R., Benítez, A., ... Lerma, D. L. (2009). El reto de la resistencia bacteriana en México: los beneficios de contar con una nueva alternativa de maenjo antimicrobiano eficaz. *Med Int Mex*, 25(5), 361–371.
- Kim, J., Marshall, M. R., & Wei, C. i. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(11), 2839–2845. <https://doi.org/10.1021/jf00059a013>
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., & Okulik, N. B. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides . *Facultad de Agroindustria UNNE*, 1(E-057), 1–4.
- Marina, D., Avella, G., Alberto, C., García, O., & Cisneros, A. M. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de Metrología*, 1–5. Retrieved from http://cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
- Mendez Rodriguez, C. (2011). Tesis, *Evaluación del aceite esencial del pericón (Tagetes lucida Cav.) Como bioplagicida contra insectos de maíz almacenado*. Dr. Francisco J. Espinosa García. Universidad Michoacana De San Nicolas De Hidalgo.

- Omer, E. A., Hendawy, S. F., Nour El-Deen, A. M., Zaki, F. N., Abd-Elgawad, M. M., Kandeel, A. M., ... Ismail, R. F. (2015). Some biological activities of *Tagetes lucida* plant cultivated in Egypt. *Advances in Environmental Biology*, 9(2), 82–88.
- Perdomo Roldán, F., & Mondragón Pichardo, J. (2009). Ficha @ Wwww.Conabio.Gob.Mx. Retrieved May 16, 2018, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/linaceae/linum-usitatissimum/fichas/ficha.htm>
- Phitaktim, S., Chomnawang, M., Sirichaiwetchakoon, K., Dunkhunthod, B., Hobbs, G., & Eumkeb, G. (2016). Synergism and the mechanism of action of the combination of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. and oxacillin against an oxacillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *BMC Microbiology*, 16(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0814-4>
- Pombo Ospina, L., Matulevich Peláez, J., Borrego Muñoz, P., Cardona Castrillón, W., & Barajas Villamizar, L. (2016). Composición Química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Pelargonium odoratissimum* (L) L ` Hér (Geraniaceae), 12(1), 74–83. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1856>
- PUIS UNAM. (2018). Estado Actual de la Resistencia Antimicrobiana en México. *Programa Universitario de Investigación En Salud*.
- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). Metodologías Para Evaluar In Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal, Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, (42), 263–268.
- Ramirez Ortiz, M. G. (2017). Tesis, “*Prospección preliminar de inhibidores de factores de resistencia en extractos de Cosmos bipinnatus, Reseda luteola, Tagetes erecta Y Tagetes lucida.*” Universidad Michoacana De San Nicolas De Hidalgo.
- Regalado, E. L., Fernández, M. D., Pino, J. A., & Mendiola, J. O. A. (2011). Chemical Composition and Biological Properties of the Leaf Essential Oil of *Tagetes lucida* Cav . from Cuba Chemical Composition and Biological Properties of the Leaf Essential Oil of *Tagetes lucida* Cav . from Cuba, 23(July 2012), 37–41.
- Richards, L. A., Glassmire, A. E., Ochsenrider, K. M., Smilanich, A. M., Dodson, C. D., Jeffrey, C. S., & Dyer, L. A. (2016). Phytochemical diversity and synergistic effects on herbivores. *Phytochemistry Reviews*, 15(6), 1153–1166. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9479-8>
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., ... Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiological Research*, 191, 51–80. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.008>
- Rodríguez, E., León, G., Petersen, S., Pérez, H. R., González, E., & Morfín, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34, 181–190. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>

- Rojas, M. M., , Sánchez, Y., , Abreu, Y., , Espinosa, I., Correa, T. M., & , Trevisan, S. (2012). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L., 27(2), 130–134.
- San Millan, A., Escudero, J. A., Gifford, D. R., Mazel, D., & MacLean, R. C. (2016). Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1), 0010. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0010>
- Sanches de Rivas, C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...? *Química Viva*, 2, 63–77. Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov
- Senthilkumar, A., & Venkatesalu, V. (2009). Phytochemical analysis and antibacterial activity of essential oil of *Clausena anisata* (Wild). Hook. F. ex Benth. *International Journal of ...*, 5(2), 116–120. Retrieved from [http://www.researchgate.net/profile/Venugopalan_Venkatesalu/publication/44259489_Phytochemical_analysis_and_Antibacterial_Activity_of_the_Essential_Oil_of_Clausena_anisata_\(Willd.\)_Hook._f._ex_Benth/links/0fcfd50573d5c3553e000000.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Venugopalan_Venkatesalu/publication/44259489_Phytochemical_analysis_and_Antibacterial_Activity_of_the_Essential_Oil_of_Clausena_anisata_(Willd.)_Hook._f._ex_Benth/links/0fcfd50573d5c3553e000000.pdf)
- Serra Valdés, M. Á. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 5(3), 8–9. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011
- Smith, P. A., & Romesberg, F. E. (2007). Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 549–556. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.27>
- Solorzano Santos, F., & Miranda Novales, G. (1998). Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. Retrieved from <https://www.scielosp.org/pdf/spm/1998.v40n6/510-516>
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226. https://doi.org/http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf
- UNAM. (2010). Medición del crecimiento Microbiano. Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf
- Vega, M. del C. (2013) Tesis,. *Identificación parcial de principios activos de diez plantas medicinales del norte de México con actividad biológica contra bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia*. Universidad Autónoma De Nuevo León Facultad De Ciencias Biológicas Subdirección De Estudios De Postgrado Identificación.
- Yap, P. S. X., Yiap, B. C., Ping, H. C., & Lim, S. H. E. (2014). Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 6–14. <https://doi.org/10.2174/1874285801408010006>