



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
BITIOFENOS”**

PRESENTA

EVELIN LAGUNAS ALVARADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR

D.C Mauro Manuel Martínez Pacheco

COASESOR

M.C. Esp. Of. Rosa Elisa Martínez Muñoz

SINODALES

PRESIDENTE: D.C. Del Río Torres Rosa Elva Norma

VOCAL 1: M.C. Arévalo León Luz Elena

VOCAL 2: M.C. Flores García Alberto

Morelia, Michoacán, Agosto de 2013



RESUMEN

El género *Tagetes* se encuentra en México. Éste presenta acción biológica en: bacterias, hongos, nemátodos e insectos, pero con información limitada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad biológica de cuatro bitiofenos [2,2'-bitiofeno-5-carboxaldehído (**1**); 5,5'-diiodo-2,2'-bitiofeno (**2**); 3,3'-dibromo-2,2'-bitiofeno (**3**) y 2,3'-bitiofeno (**4**)] con similitud en su estructura a los ya reportados, se evaluaron contra bacterias, hongos y oomicetos. Los resultados mostraron a los bitiofenos (**1**) y (**3**) más efectivos con una actividad fungicida y fungistática en *Candida albicans*, *Colletotrichum acutatum* y *Phytophthora cinnamomi* a una concentración de 10 µg/µl. Se detectó un efecto con el bitiofeno (**4**) al inhibir el crecimiento micelial en *Aspergillus nidulans*, pero sólo en la concentración más alta (100 µg/µl). La variabilidad en las respuestas probablemente es debida a la diversidad de la estructura química de cada uno de los compuestos.



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	vi
I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	4
2.1 Generalidades de la Familia Asteraceae.....	4
2.2 Distribución de la Tribu Tageteae.....	4
2.3 Género Tagetes	4
2.4 Clasificación taxonómica y descripción del género <i>Tagetes</i>	6
2.5 Fitoquímica de <i>Tagetes</i> spp.....	7
2.6 Tiofeno.....	8
2.6.1 Aspectos fitoquímicos de tiofenos	9
III JUSTIFICACIÓN	11
IV HIPÓTESIS.....	12
V OBJETIVOS	12
5.1 Objetivo general	12
5.1.1 Objetivos específicos	12
VI MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
6.1 Organismos utilizados en los bioensayos.....	13
6.1.1 Bacterias.....	13
6.1.2 Hongos	13
6.1.3 Oomiceto.....	13

6.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS	14
6.2.1. Preparación de medios de cultivo:	14
6.2.2 Preparación de las cepas bacterianas	14
6.2.3 Estandarización del inóculo bacteriano	14
6.2.4 Preparación de los bitiofenos y de las sustancias control	15
6.3 Método de difusión en agar para bacterias y levaduras.....	16
6.3.1 Ensayo con levadura.....	16
6.4 Método de difusión para hongos filamentosos y oomicetos.....	17
6.5 Análisis de resultados	19
6.6 Determinación de la germinación en <i>Aspergillus nidulans</i>	20
6.6.1 Preparación de medio mínimo líquido.....	20
6.6.2 Selección del aislado fúngico de <i>Aspergillus nidulans</i>	20
6.6.3 Ensayo de germinación de esporas y crecimiento micelial en <i>Aspergillus nidulans</i>	21
VII RESULTADOS	22
7.1 Sensibilidad bacteriana a los bitiofenos.....	22
7.2 Efecto antifúngico de bitiofenos.....	23
7.2.1 Efecto sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	23
7.3 Efecto sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum acutatum</i>	25
7.4 Efecto antioomicético de los bitiofenos sobre <i>P. cinnamomi</i>	27
7.5 Efecto sobre la germinación de esporas de <i>Aspergillus nidulans</i>	29
7.5.1 Evaluación microscópica de los cuatro bitiofenos sobre <i>Aspergillus nidulans</i>	30
7.6 Evaluación microscópica del compuesto 1 ante <i>A. nidulans</i> a diferentes concentraciones.....	31
7.7 Evaluación del compuesto 4 ante <i>A. nidulans</i> a diferentes concentraciones	33
VIII DISCUSIÓN.....	35
IX CONCLUSIÓN	39
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.3.1 Clasificación taxonómica de <i>Tagetes</i>	7
Figura 2.6.1 Tiofenos aislados e identificados a partir de <i>Tagetes patula</i> L.....	10
Figura 6.2.4 Preparación de bitiofenos a diferentes concentraciones	16
Figura 6.3.1 Esquema del método de difusión en agar para el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano y levaduriforme.....	18
Figura 6.4.1 Método de difusión en medio sólido para el hongo filamentoso y oomiceto.....	19
Figura 6.6.4 Ensayo en medio líquido mínimo para la germinación de <i>Aspergillus nidulans</i>	22
Figura 7.1.1 Evaluación de bitiofenos sobre el crecimiento bacteriano..	23
Figura 7.2.3 Efecto fungistático del bitiofeno (1) sobre <i>C. albicans</i>	25
Figura 7.3.3 Efecto antifúngico de los bitiofenos sobre <i>C. acutatum</i>	27
Figura 7.4.3 Inhibición del crecimiento de <i>P. cinnamomi</i> por bitiofenos.	29
Figura 7.5.1 Evaluación inhibitoria de los cuatro bitiofenos ensayados en <i>A. nidulans</i>	30
Figura 7.6.1 Morfología microscópica de la inhibición del compuesto 1 sobre <i>A. nidulans</i>	31
Figura 7.7.1 Reporte microscópico del efecto de inhibición de crecimiento micelial <i>A. nidulans</i> ante el compuesto 4.....	34

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 2.2.1 Distribución de la familia <i>Asteraceae</i>	6
Cuadro 2.4.1 Composición química del género <i>Tagetes</i>	8
Cuadro 2.5.3 La presencia de tiofenos dentro de las <i>Asteraceae</i>	11
Cuadro 6.6.1. Composición del medio mínimo líquido.....	21
Cuadro 7.6.2 Evaluación de los compuesto 1 y 4 sobre <i>A. nidulana</i> a diferentes concentraciones.....	32
Cuadro 7.6.3 Actividad biológica de los compuestos ensayados ante los diferentes patógenos.....	35



ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 7.2.1 Efecto de los cuatro bitiofenos con mayor actividad biológica sobre el crecimiento de <i>C.albicans</i>	24
Gráfica 7.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del bitiofeno 1.....	25
Gráfica 7.3.1 Actividad fungistática del bitiofeno 3, ante <i>C. acutatum</i>	26
Gráfica 7.3.2 Efecto de CMI a 10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del bitiofeno 3 sobre <i>C. acutatum</i>	26
Gráfica 7.4.1 Ensayo de los cuatro bitiofenos sobre el crecimiento de <i>P. cinnamomi</i>	28
Gráfica 7.4.2 Concentración mínima inhibitoria de los compuestos 1 y 3 en <i>P. cinnamomi</i> a diferentes concentraciones.....	28

I INTRODUCCIÓN

En la investigación sobre métodos alternativos en el manejo de enfermedades infecciosas y plagas se incrementó en los últimos años, debido a los continuos problemas asociados con el uso de productos químicos convencionales (Choi *et al.*, 2003) que incluyen el desarrollo de resistencia en los organismos patógenos objetivo de control y generación de plagas secundarias (Ortega, 2001). Esta problemática impulsa la generación de estrategias alternativas, como el uso de metabolitos secundarios con actividad biológica antimicrobiana, que permitan obtener mayor rendimiento y calidad en la producción sin poner en riesgo la salud del hombre y su entorno (Rodríguez, 2000). En general las propiedades biológicas de los metabolitos antimicrobianos pueden tener un amplio espectro de acción, no sólo contra hongos fitopatógenos y patógenos de humanos, sino también contra bacterias, nemátodos e insectos (Isman, 2000).

Entre las bacterias de importancia clínica que con mayor frecuencia causan infecciones encontramos a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*. Las cuales son responsables de infecciones respiratorias, gastrointestinales y de vías urinarias. La automedicación así como una errónea prescripción, lo que aunado al uso inapropiado y excesivo de antibióticos, así como al abandono del tratamiento por parte del paciente, genera cepas bacterianas resistentes, fenómeno que se ha hecho evidente en el ámbito hospitalario (González, 2001).

Hoy en día las herramientas para la prevención y control de la diseminación de estas bacterias resistentes, son los programas de vigilancia epidemiológica, la restricción en la comercialización de antibióticos y el desarrollo de nuevas drogas, siendo ésta última

herramienta la utilizada en este trabajo, para lo cual se analizará la capacidad de los bitiofenos para inhibir el crecimiento bacteriano (Kumar, 1997).

Las infecciones por hongos han cobrado en la actualidad una importancia inusitada; son observadas con mayor frecuencia y los cuadros clínicos clásicos en ocasiones se modifican y agravan cuando se asocian a otras patologías (Castañón, 2006). Dentro de los hongos patógenos para el ser humano el género *Candida* es uno de los más representativos al hablar de organismos fúngicos más resistentes a los antifúngicos comerciales (Sara *et al.*, 2007).

El número de infecciones fúngicas se ha incrementado alarmantemente en los últimos 20 años, debido a la resistencia que presentan los hongos ante los antifúngicos convencionales, la recalcitrancia del organismo y a aumento de pacientes con el sistema inmunológico alterado ya que son altamente contaminantes. Estos factores hacen que los sistemas de control de las infecciones fúngicas no sean eficientes, tanto para los hongos que afectan a los humanos, como a las plantas (Fleming *et al.*, 2002).

Otro aspecto importante se refiere a las concentraciones más convenientes de los compuestos para llevar a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana, porque puede ocurrir que se utilicen concentraciones tan elevadas que permitan la detección de sustancias con un potencial antimicrobiano útil muy pobre, o que se empleen concentraciones tan bajas que se dejen por fuera constituyentes con un buen potencial antimicrobiano (Ruiz y Caseico, 1989).

En el sector agrícola, las enfermedades producidas por hongos causan enormes pérdidas económicas y por esta razón también es importante la búsqueda de antifúngicos que contribuyan a solucionar este

problema sin aumentar la contaminación ambiental y la toxicidad de los alimentos.

Los hongos y oomicetos fitopatógenos son importantes porque destruyen cultivos de importancia económica a nivel mundial. Son un problema que afecta a países desarrollados y en vías de desarrollo. De los géneros fúngicos más representativos son *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*. Los cultivos más importantes para Michoacán que son afectados por estos organismos son: aguacate, papa, mango, fresa y chile, (Tripathi y Dubey 2004).

Los oomicetos son organismos eucariontes que su crecimiento es parecido al de los hongos filamentosos. En un inicio se clasificaron como hongos, posteriormente con análisis moleculares y bioquímicos se determinó que están más relacionados con las algas y se reubicaron dentro del Reino *Chromista*. Un género importante de los oomicetos es *Phytophthora* del cual se conocen 60 especies, dentro de las especies más representativas son *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. infestans* por ser las que afectan con mayor frecuencia cultivos vegetales de importancia económica a nivel mundial como papa, frijol, chile, tomate, pepino y alfalfa, (Fry y Goodwin, 1997).

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de bitiofenos miembros de ésta familia y su toxicidad hacia una amplia variedad de organismos.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la familia Asteraceae

La familia Asteraceae se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano, y está conformado por 18 tribus; en la tribu Tagetae se encuentra *Tagetes*, que es uno de los ocho géneros que la integran (Heywood *et al.*, 1977). El número de especies de *Tagetes* es de 55 (Turner, 1996) y México es un importante centro de diversidad, contando con 26 especies nativas (Neher, 1966). La mayor parte de las especies son silvestres o crecen en ambientes ruderales, algunas se cultivan y se usan como ornamentales, con fines ceremoniales y religiosos, para condimentar bebidas, pan, licores, como forraje para ganado (Turner, 1996) y como insecticida (Cubillo y Hilje, 1999).

2.2 Distribución de la Tribu Tageteae

La constituyen aproximadamente 250 especies divididas entre 35 géneros. Esta tribu se caracteriza por el género *Tagetes*. En México se ha detectado la presencia de la Tribu Tageteae que comprende los géneros vegetales *Chrysactinia*, *Dyssodia*, *Pectis*, *Porophyllum* y *Tagetes* (Rzedowski y Calderón, 2005). La Tribu Tageteae forma un grupo monofilético vegetal, con buena representación en México siendo este el centro principal de diversificación de ésta tribu (Villareal, 2003).

2.3 Género Tagetes

La aparición de la Familia Asteraceae (*Compositae*) en el Continente Americano hace 65 millones de años. El género *Tagetes*, de la subtribu *Tagetae*, cuenta con cerca de 55 especies (Soule, 1993), en México está representado por 26 de ellas constituyendo un importante centro de

diversidad de dicho género. Abarcan desde el paralelo 16 hasta el 32 N con la siguiente distribución (cuadro 2.2.1). Las especies mexicanas, de acuerdo con Turner (1996) son: *T. eppaposa*; *T. lacera* Brandegee; *T. nelsonii* Grenm; *T. mulleri* Blake; *T. moorei* H. Rob; *T. micrantha* Cav; *T. filifolia* Lag; *T. oaxacana*; *T. foetidissima* Hort; *T. erecta* Linn; *T. lucida* Cav; *T. coronopifolia* Willd; *T. subulata* Cerv; *T. lunulata* Ortega; *T. tenuifolia* Cav; *T. parryi* A. Gray; *T. stenophylla* B. L. Rob; *T. linifolia* Seaton; *T. terniflora* H. B. & K; *T. lemmonii* A. Gray y *T. persicaefolius* Benth.

Región/Estados	Especies
Norte	
Baja California	<i>T. filifolia</i> (a), <i>T. micrantha</i> (a), <i>T. subulata</i> (a), <i>T. lacera</i> (p), <i>T. lunulata</i> (a)
Sonora	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> (p), <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> (p), <i>T. lemmonii</i> (p), <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i> (a), <i>T. minuta</i> (a)
Chihuahua	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. pringlei</i> (a), <i>T. subulata</i>
Coahuila	<i>T. coronopifolia</i> (a), <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i>
Nuevo León	<i>T. lucida</i> , <i>T. mulleri</i> (p), <i>T. micrantha</i>
Tamaulipas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. erecta</i>
Sinaloa	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. palmeri</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. erecta</i>
Durango	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. epapposa</i> (a), <i>T. foetidissima</i> (a), <i>T. elongata</i> (a), <i>T. remotiflora</i> (a), <i>T. erecta</i>
Zacatecas	<i>T. filifolia</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. lucida</i>
Centro Sur	
San Luis Potosí	<i>T. erecta</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. parryi</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Aguas Calientes	<i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. pringlei</i>
Guanajuato	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. subulata</i>
Nayarit	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. subulata</i>
Jalisco	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. hartwegii</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i>
Colima	<i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Michoacán	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. remotiflora</i> , <i>T. triradiata</i>
Guerrero	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i>
Oaxaca	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. oaxacana</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Veracruz	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Puebla	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Tlaxcala	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. linifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. tenuifolia</i>
México	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Morelos	<i>T. coronopifolia</i> , <i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. stenophylla</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. triradiata</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Hidalgo	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. persicaefolius</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Querétaro	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> , <i>T. micrantha</i> , <i>T. moorei</i> (a-sp-p), <i>T. foetidissima</i> , <i>T. pringlei</i> , <i>T. remotiflora</i>
Sur- Suereste	
Chiapas	<i>T. erecta</i> , <i>T. filifolia</i> , <i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. nelsonii</i> , <i>T. subulata</i> , <i>T. tenuifolia</i> , <i>T. terniflora</i>
Yucatán	<i>T. erecta</i> , <i>T. tenuifolia</i>
Tabasco	<i>T. lucida</i>

Cuadro 2.3.1 **Distribución de la familia Asteraceae.** Fuente: Turner (1996), complementado por Villareal (2003). (a) anuales, (sp) semiperentes, (p) perentes.

2.4 Clasificación taxonómica y descripción del género *Tagetes*

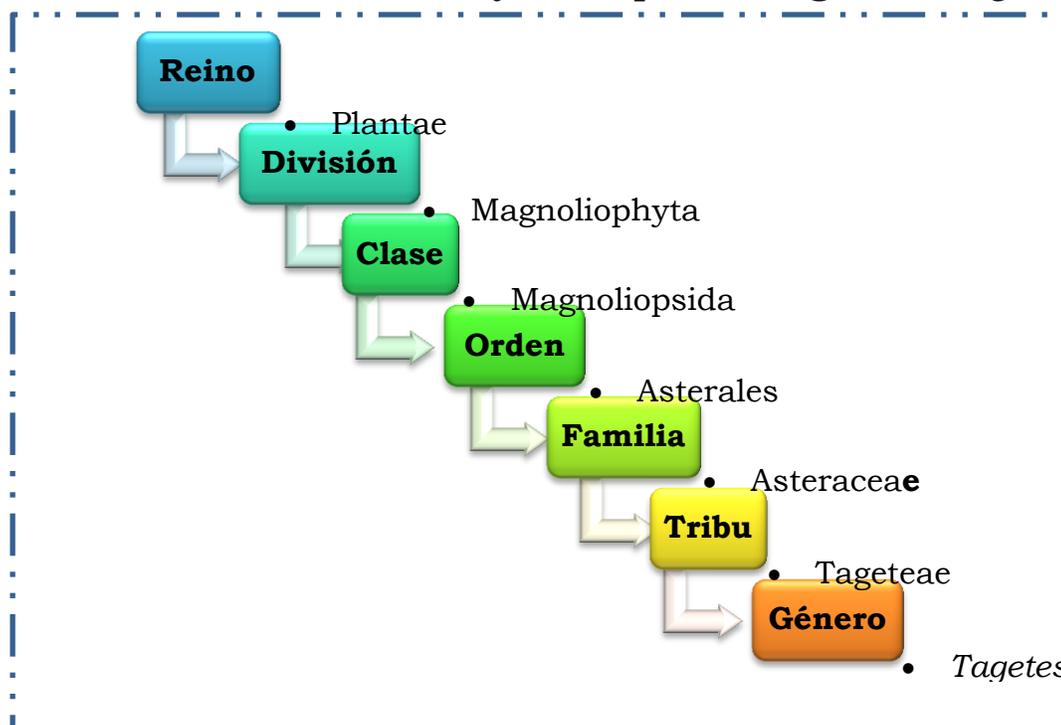


Figura 2.4.1. Clasificación taxonómica de *Tagetes*.

Tagetes sp es comúnmente conocida como maravilla. Son herbáceas anuales o perennes, con hojas opuestas por lo común pinnadas, con numerosas glándulas oleíferas translúcidas; cabezuelas solitarias o más o menos cimoso-corimbosas, involucro cilíndrico, fusiforme o angostamente campanulado, sus brácteas de tamaño subigual, unidas entre sí hasta del ápice y provistas de dos hileras de glándulas oleíferas; el receptáculo plano o convexo, desnudo; flores liguladas generalmente presentes, fértiles, sus corolas amarillas, anaranjadas, rojizas o blancas; flores hermafroditas, corola con garganta infundibuliforme, enteras con las bases obtusas, ramas del estilo truncadas y peniciliadas en el ápice con apéndices cónicos cortos; aquenios lineares o claviformes, vilano de tres a 10 escamas desiguales lineares, a veces más o menos unidas entre sí (Villareal, 2003).

2.5 Fitoquímica de *Tagetes* spp

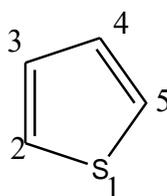
La composición química del género *Tagetes* varía entre las especies, Mariotti *et al.*, (2004), mencionan que la diversidad química está determinada genéticamente y estrictamente relacionada a las especies. Algunos de los compuestos encontrados en las especies en *Tagetes* pertenecen a los grupos de alcoholes, ésteres, aldehídos, acetonas, ésteres, carotenoides, flavonoides, tiofenos, terpenos y cumarinas (Kaul *et al.*, 2005; Krishna *et al.*, 2004 y Mariotti *et al.*, 2004). Las propiedades biológicas de estas plantas afectan a diversos organismos, desde bacterias, virus, hongos, nemátodos, ácaros e insectos e inclusive otras especies de plantas (Serrato y Quijano, 2003). Hay algunas especies de *Tagetes* que comparten compuestos químicos, mientras que otros compuestos solo se encuentran en una sola especie (cuadro 2.4.1).

Actividad/ Especie	<i>T. lucida</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. minuta</i>	<i>T. patula</i>
Efecto fungicida	1,8-Cineol	1,8-Cineol	α -Tertienil	1,8-Cineol	Ácido cafeico
	Anetol	α -Tertienilo	Anetol	Ácido acético	Kaempferol
	Anisaldehído	Kaempferol	Anisaldehído	α -Tertienil	Ácido
	Cariofileno		Citral	β -Felandreno	Cumárico
	Chavicol			Bornéol	Quercetin
	Herniarin			Cariofileno	
	Linalol			Ocimento	
	Metil-eugenol			Citral	
	Mirceno			Geraniol	
	Tiofeno			Quercetina	
				4-Terpinenol	
				Terpinoleno	
				Tiofeno	
			Timol		
Efecto fungistático	Limoneno		Limoneno	Carvon	
	Metil-eugenol			Acido fórmico	
Efecto nematocida	1,8-Cineol	1,8-Cineol	α -Tertienil	Limoneno	
	Chavicol	5-3-1 Butenil	Citral	1,8-Cineol	
	Limoneno	2-2 Bitienil	Limoneno	5-3-1 Butenil	
	Linalol	α -Tertienilo		2-2 Bitienil	
	Metil-eugenol			α -Terpineol	
	Tiofeno			α -Tertienilo	
				Borneol	
			Carvon		
			Geraniol		

Cuadro 2.5.1 Composición química del género *Tagetes* Fuente: Duke (2009).

2.6 Tiofeno

Tiofeno se deriva de la palabra griega que significa *theion* azufre y *phaino* significa brillando. Que consiste en un anillo de cinco miembros plano, es aromático como se indica por sus reacciones de sustitución extensas. Contiene un átomo de azufre en la posición **1**, las posiciones **2** y **5** son equivalentes en el anillo de matriz, como son las posiciones **3** y **4**. Es un compuesto heterocíclico, aromático, con fórmula C_4H_4S , nombre químico es tiaciclopentadieno (Raghav *et al.*, 2011).



Tiofeno

A temperatura ambiente, el tiofeno es un líquido incoloro, inflamable y tóxico, con un olor ligeramente agradable. La masa molecular de tiofeno es 84.14 g/mol, la densidad es 1.051 g/ml y punto de fusión es $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Es insoluble en agua pero soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, incluyendo alcohol y éter. Los "pares de electrones" en azufre son significativamente deslocalizados en el sistema de electrones π , debido a esto se comporta derivado de benceno extremadamente reactivo. Como benceno, el tiofeno forma un azeótropo con etanol. La similitud entre las propiedades fisicoquímicas de benceno y tiofeno que llama la atención, por ejemplo, el punto de ebullición del benceno es de $81.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la de tiofeno es $84.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a 760 mm Hg) y, por tanto, tiofeno y el benceno son un ejemplo conocido de bioisosterismo. Puede ser fácilmente sulfonados, nitrados, derivados halogenados, acilado. No puede alquilarse y ser oxidados (Sachin, 2012).

2.6.1 Aspectos fitoquímicos de tiofenos

Estos compuestos que contienen azufre se aislaron inicialmente a partir de los pétalos de la variedad africana de caléndula común (*Tagetes erecta* L., Tribu *Tageteae*) (Zechmeister y Sease, 1947). Alfa-tertienil (alfa-T) fue el primer tiofeno natural a ser identificado (Figura 2.6.2).

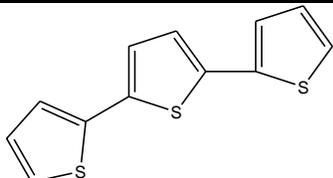
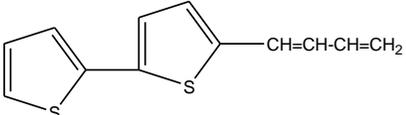
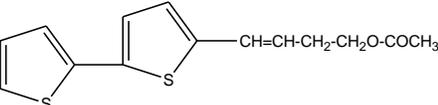
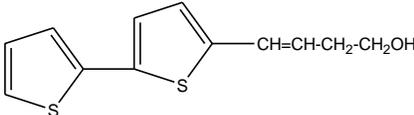
Nombre		Estructura
1	2,2':5',2'- tertienil (α -T)	
2	5-(3-buteno-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT)	
3	5-(4-acetoxi-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT-OAc)	
4	5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienil (BBT-OH)	

Figura 2.6.2 Tiofenos aislados e identificados a partir de *Tagetes patula* L. Fuente: (Zechmeister y Sease , 1947)

Adicionales derivados de tiofeno se han registrado en doce especies de *Tagetes*, así como otros géneros de la Tribu *Tageteae* incluyendo dos especies de *Porophyllum*. (Bohlmann *et al.*, 1973). El cuadro 2.6.3 muestra la presencia de tiofeno en otras tribus de la familia.

	Monotiofeno	Ditiofeno	Tertiofeno
Tribu			
<i>Anthemideae</i>	+	-	-
<i>Arctotideae</i>	+	+	+
<i>Astereae</i>	-	-	-
<i>Calenduleae</i>	-	-	-
<i>Cichorieae</i>	-	-	-
<i>Cynareae</i>	+	+	+
<i>Eupatorieae</i>	+	-	-
<i>Helenieae</i>	+	+	+
<i>Heliantheae</i>	+	+	+
<i>Inuleae</i>	+	+	-
<i>Mutisieae</i>	-	-	-
<i>Senecioneae</i>	+	+	-
<i>Tageteae</i>	+	+	+
<i>Vernonieae</i>	+	-	-

Cuadro 2.6.3 La presencia de tiofenos dentro de las Asteraceae (Sorenson, 1977).

La distribución de los tiofenos en miembros de *Tageteae* ha sido estudiada para incluir sólo partes específicas de la planta (Towers y Wat, 1978). En las raíces se encontró que es la ubicación principal de alfa-T y BBT, pero también en pétalos de flores (Zechmeister y Sease, 1947) y pappus de aquenios (Chan *et al.*, 1975) demostraron poseer bajas concentraciones de estos compuestos.

Antes de estudios *in situ* para llevarse a cabo, es necesario conocer la distribución y los niveles de los diversos derivados de la planta, así como las toxicidades relativas de cada componente. Estos estudios son difíciles de llevar a cabo inicialmente, debido a la falta de un sistema apropiado para su detección y cuantificación (Curtis y Phillips, 1962; Atkinson *et al.*, 1965)

III JUSTIFICACIÓN

La demanda para el descubrimiento y posterior aplicación de los agentes antimicrobianos, ha contribuido a controlar las enfermedades infecciosas y por consiguiente, justifica la búsqueda de fuentes naturales de plaguicidas que sean estables y altamente biodegradables con efectos biológicos en contra de bacterias, hongos y oomicetos. La enorme riqueza de los recursos genéticos de *Tagetes* en México, tanto silvestres como domesticados, y las posibilidades para su aprovechamiento es un estímulo para la realización de investigaciones encaminadas para continuar la búsqueda de nuevos compuestos.

IV HIPÓTESIS

Los bitiofenos con distintos radicales químicos presentan actividad antimicrobiana contra patógenos de importancia para el ser humano y el sector agrícola.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana de los bitiofenos mencionados.

5.1.1 Objetivos específicos

- Determinar la concentración efectiva del compuesto microbicida.
- Determinar la sensibilidad de las bacterias, hongos y oomicetos a los bitiofenos.

VI MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Organismos utilizados en los bioensayos

6.1.1 Bacterias

Las bacterias utilizadas fueron cuatro aislados clínicos caracterizadas bioquímicamente, dos bacterias Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* y *Proteus vulgaris*) y dos Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), todas ellas obtenidas del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, Mich, Méx

6.1.2 Hongos

Levadura. Se utilizó un aislado clínico de *Candida albicans*, que fue obtenida del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” de esta ciudad.

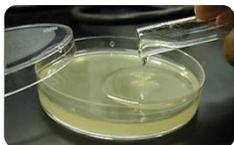
Filamentoso. El hongo filamentoso utilizado fue *Colletotrichum acutatum*, aislado silvestre obtenido de frutos y plantas de aguacate infectadas en Uruapan, Mich. Méx.

Fitopatógeno. Se utilizó un aislado silvestre AFG2 de *Aspergillus nidulans* que proviene de campos de labranza sembrados en Zacatecas. Mex., durante los años de 1995 a 2001 y forma parte del cepario del laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH.

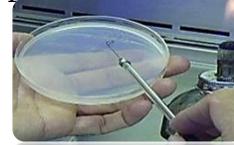
6.1.3 Oomiceto

El oomiceto utilizado fue *Phytophthora cinnamomi*, aislado de plantas infectadas de fresa, chile y aguacate obtenidos en Uruapan, Mich., Méx.





6.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS



6.2.1. Preparación de medios de cultivo:

Para el crecimiento de las bacterias y el hongo levaduriforme se utilizó agar Mueller Hinton (MH), y para el hongo filamentoso y oomiceto Agar Sabouraud (AS) y Agar Papa Dextrosa (PDA), todos de la marca BIOXON como lo indica en el manual de procedimientos de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), una vez vertido el agar en cajas de Petri (100 x 55) se dejó solidificar, se rotularon las placas y se realizó la prueba de esterilidad, incubándolas a 16 h a 37 °C.

6.2.2 Preparación de las cepas bacterianas

Cada una de las cepas bacterianas se reesembraron en placas de agar MH y fueron utilizadas entre 16 y 20 h de crecimiento con la finalidad de trabajar con células jóvenes como lo marca el manual de procedimientos para la manipulación de microorganismos del National Committee for Clinical Laboratory Estándar (NCCLS).

6.2.3 Estandarización del inóculo bacteriano

De un cultivo bacteriano joven en medio sólido MH, se tomó una colonia aislada de las cepas y se colocó en un tubo de caldo MH, el cual se incubó a 37 °C y cada hora se determinó la turbidez a 600 nm en el

espectrofotómetro hasta obtener una turbidez de 0.5 según la escala de Mc Farland, para asegurarnos que tenemos 1×10^8 ufc/ml.

6.2.4 Preparación de los bitiofenos y de las sustancias control

Cada uno de los cuatro bitiofenos se disolvió en Dimetil Sulfoxido (DMSO) al 95%, siendo control positivo cefatoxima y control negativo DMSO al 95%. En pequeños viales ependorf se prepararon diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 con cada uno de los compuestos; para obtener las siguientes concentraciones: 10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Figura 6.2.4).

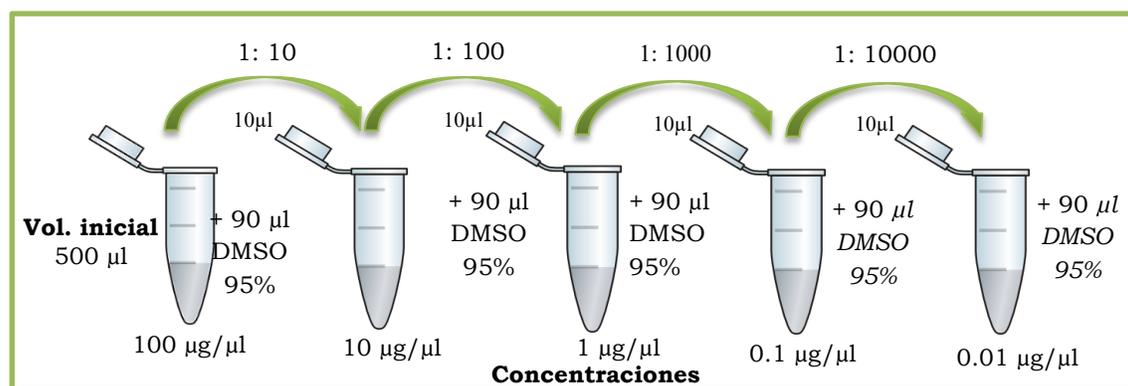
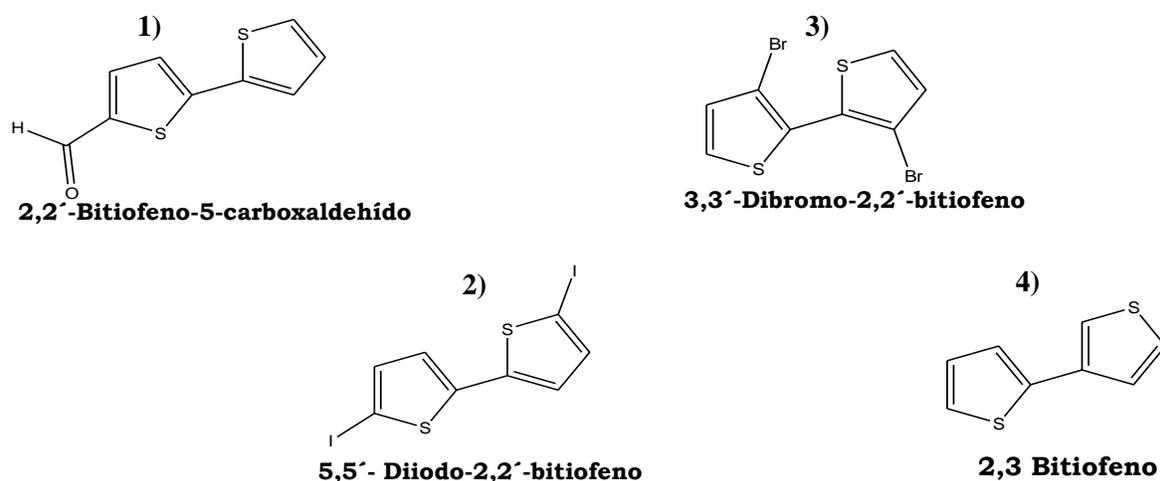


Figura 6.2.4 Preparación de bitiofenos a diferentes concentraciones.

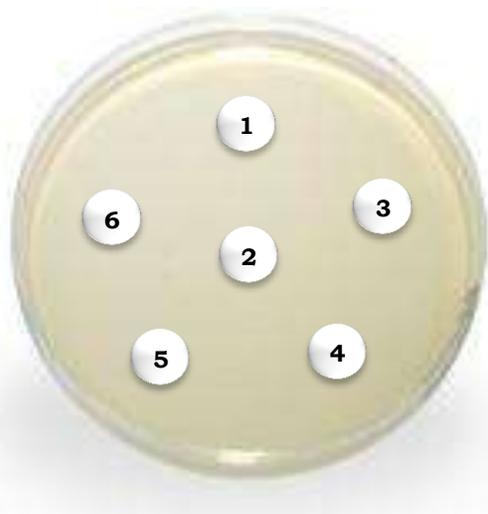
6.3 Método de difusión en agar para bacterias

Una vez crecidas las bacterias en caldo MH y con la turbidez de 0.5, se inocularon en cajas de agar MH con ayuda de un hisopo estéril, después se colocaron seis discos de papel filtro estériles por placa, en cuatro de ellos los compuestos utilizados, en otro disco se control positivo Cefotaxima (125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y por último control negativo DMSO al 95%. Las placas se incubaron a 37 °C y se reportó el halo de inhibición. (Figura 6.3.1).

6.3.1 Ensayo con levadura

El hongo levaduriforme utilizado (*C. albicans*) se inoculó en caldo MH y se incubaron a 37 °C, hasta lograr una turbidez de 0.5, logrado con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Una vez obtenida la turbidez de 0.5, se inocularon en placas de agar dextrosa sabouraud con la ayuda de un hisopo estéril, después se colocaron seis discos en cada placa en cuatro de ellos 6 μl de los bitiofenos, el control positivo utilizado fue Fluconazol (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y un control negativo DMSO (6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h y el crecimiento fue monitoreado a las 24, 48 y 72 h.





- 1.- 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 2.- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 3.- 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 4.- 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 5.- Cefotaxima (125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para bacterias y Fluconazol 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para *C. albicans*
- 6.- DMSO al 95% (6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

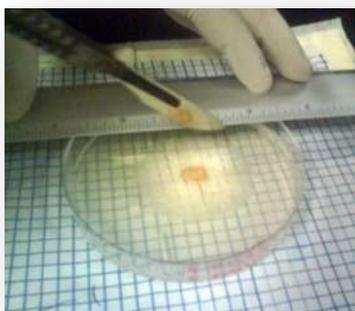
Figura 6.3.1 Esquema del método de difusión en agar para el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano y levaduriforme.

6.4 Método de difusión para hongo filamentoso y oomiceto

Los hongo filamentoso utilizado *C. acutatum* y el oomiceto *P. cinnamomi* fueron resembrados en placas de agar papa dextrosa (PDA), se crecieron por siete días a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Las placas con los patógenos fueron cubiertas con ayuda de un bisturí estéril en cubos de 5 mm³, después en placas de agar papa dextrosa se colocaron seis discos de papel filtro estériles por placa, a cuatro de ellos se le adicionaron los bitiofenos a dichas concentraciones, en otro disco fue control positivo y se adicionó tiabendazol [2-(tiazol-4-il) benzimidazol] (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para el caso del hongo filamentoso. Mientras que para el oomiceto se utilizó el ácido-(R)-2[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino] metil éster propiónico (Mefenoxam 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y por último el control positivo utilizado en todos los ensayos mencionados, de todos

ellos se agregó un volumen de 6 μl a cada disco, se realizó un corte al hongo u oomiceto utilizado con ayuda de una hoja cuadriculada de fondo para guiarnos y se colocaron sobre el disco de papel filtro previamente impregnado. Las placas se incubaron protegidas de la luz y se reportó en índice de crecimiento (IC) al segundo, tercer y cuarto día, (Figura 6.4.1).



Corte del hongo u oomiceto en cuadrícula



Colocación de hongo u oomiceto en discos impregnados de los compuestos.



1.- 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

2.- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

3.- 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

4.- 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

5.-Control positivo Tiabendazol (0.001 $\text{mg}/\mu\text{l}$) para el hongo filamentoso y Mefenoxam (0.001 $\text{mg}/\mu\text{l}$) para el oomiceto.

Figura 6.4.1 Método de difusión en medio sólido para el hongo filamentoso y oomiceto.

6.5 Análisis de resultados

Todos los experimentos se hicieron de forma independiente y por triplicado cada uno de ellos utilizando el programa Statistic 7.0. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) que compara medias múltiples Tukey ($\alpha = 0.05$).

Para hongos filamentosos y oomicetos se determinó el Índice de Crecimiento (IC) de la siguiente manera:

$$IC = Ct / Cc$$

En donde:

Ct = Crecimiento del hongo filamentosos u oomiceto con bitiofeno.

Cc = Crecimiento del hongo filamentosos u oomiceto con DMSO al 95%.

6.6 Determinación de la germinación en *Aspergillus nidulans*

6.6.1 Preparación de medio mínimo líquido

Cuadro 6.6.1. Composición del medio mínimo líquido (Bartnicki y Nikerson, 1962).

COMPONENTE	GRAMOS POR LITRO DE AGUA
Glucosa	20
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	3.0
Sulfato magnésico (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.5
Nitrato amónico (NH ₄ NO ₃)	0.5
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	1.8 x 10 ⁻³
Sulfato ferroso (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	1 x 10 ⁻³
Tiamina	1 x 10 ⁻³
Ácido nicotínico	1 x 10 ⁻³
Sulfato cúprico (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	4 x 10 ⁻⁴
Sulfato manganésico (MnSO ₄ · H ₂ O)	3 x 10 ⁻⁴

Todos los componentes del medio de cultivo se disolvieron en agua a pH de 4.5 para finalmente esterilizarlo por filtración con una membrana de 0.22µm.

6.6.2 Selección del aislado fúngico de *A. nidulans*

Los aislados se propagaron en medio PDA a 15-20 °C, una vez que los aislados cumplieron siete días de edad, las esporas se recuperaron y se lavaron hasta eliminar los residuos del medio de cultivo. Los cultivos se inocularon con 20 µl de una suspensión con una densidad de 1 x 10⁹



esporas por mililitro, Los matraces utilizados se incubaron durante cinco días a temperatura ambiente.

6.6.3 Ensayo de germinación de esporas y crecimiento micelial en *A. nidulans*

Se realizaron dos ensayos por separado a concentraciones de 100 y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ utilizando 12 matraces pequeños a los que agregamos 5ml de medio mínimo líquido y 20 μl de esporas, de los cuales se utilizó Tiabendazol (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) como control positivo, dimetil sulfóxido (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) control negativo y al resto los compuestos con sus diferentes concentraciones respectivamente. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

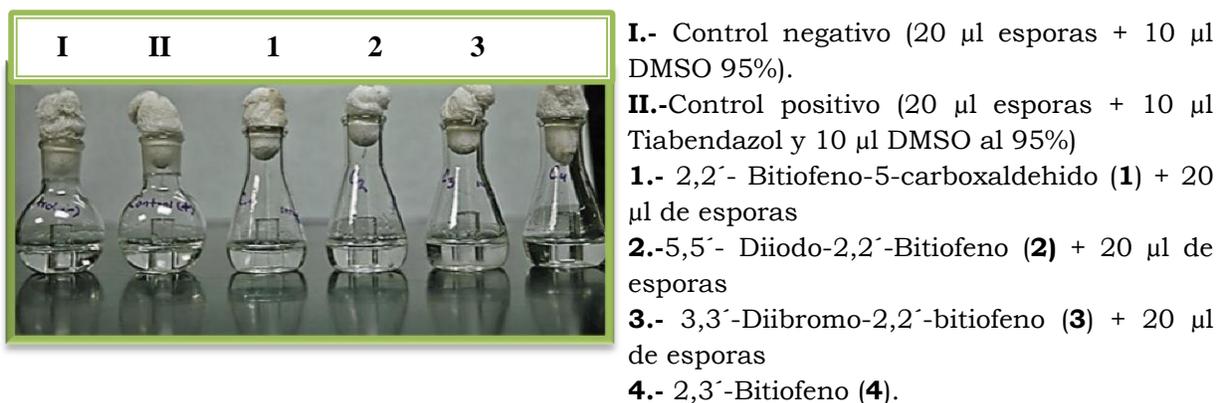


Figura 6.6.4 Ensayo en medio líquido mínimo para la germinación de *Aspergillus nidulans*.

VII RESULTADOS

7.1 Sensibilidad bacteriana a los bitiofenos

El análisis se registró a las 16 h del crecimiento bacteriano y se reportó que los bitiofenos no presentaron ningún halo de inhibición que indicara el efecto antimicrobiano. Esto es debido a que la membrana externa que rodea la pared celular de cada una de las bacterias, restringe la difusión de los compuestos a través de la cubierta polisacáridica. Por esta razón las bacterias presentan resistencia ante los bitiofenos ensayados (Figura 7.1.1).

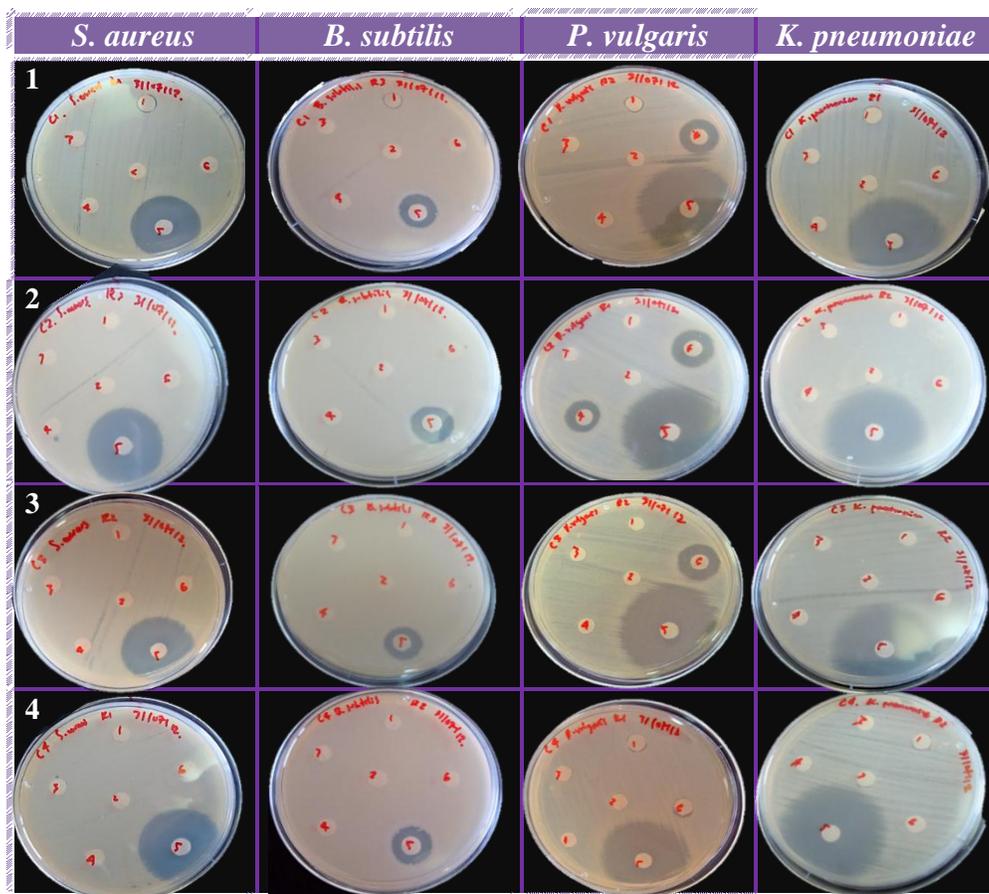
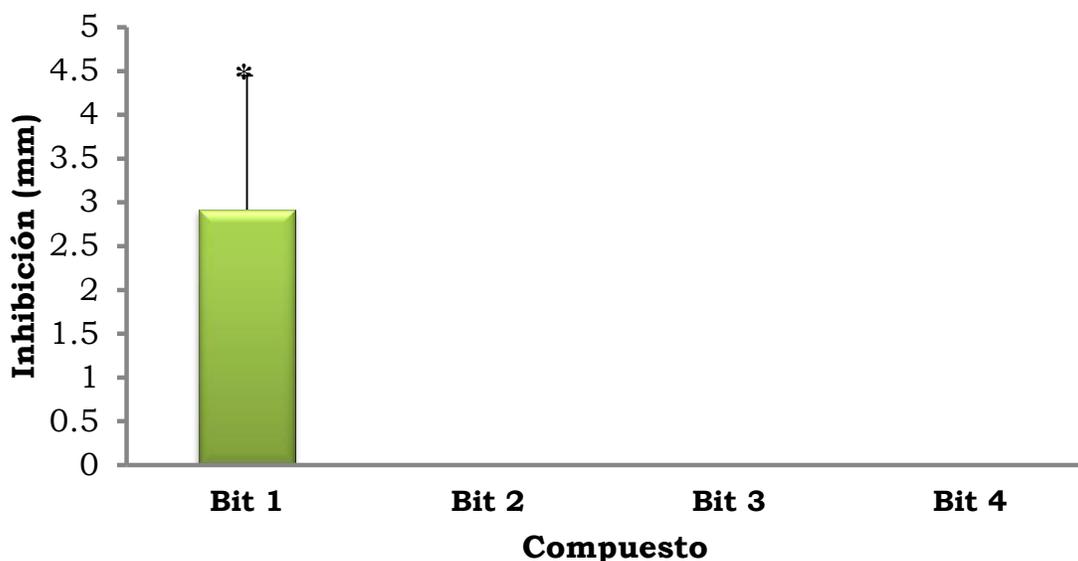


Figura 7.1.1 Evaluación de bitiofenos sobre el crecimiento bacteriano. Diferentes concentraciones (10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), registrado a las 16 h de incubación.

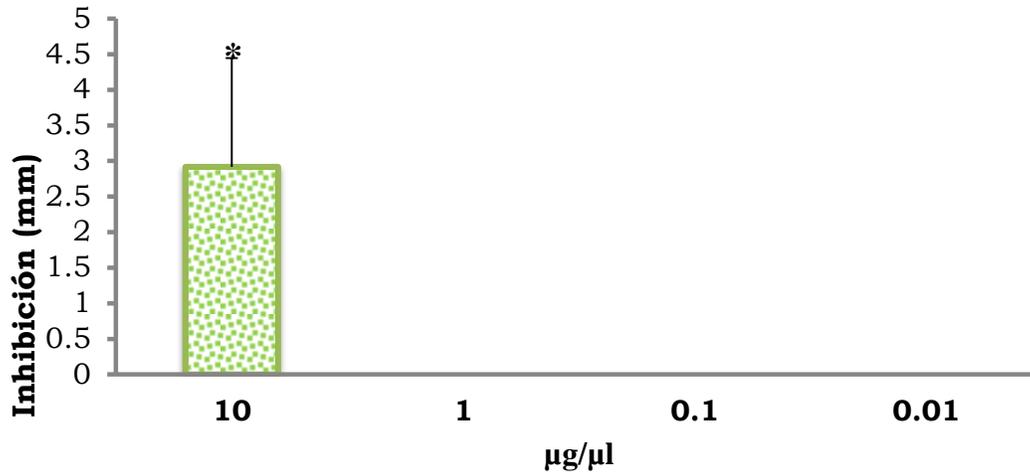
7.2 Efecto antifúngico de bitiofenos

7.2.1 Efecto sobre el crecimiento de *Candida albicans*

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana reportados a las 24 y 48 h, son reflejados en la Gráfica 7.2.1, donde se evidencia una respuesta de inhibición por el bitiofeno (**1**) que presentó un halo de inhibición promedio de 2.9 mm. Sin embargo, a las 48 h se reanudó el crecimiento de *C. albicans* (Figura 7.2.3), por lo que definimos que el compuesto **1** presenta un efecto fungistático. Con el objetivo de conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de compuesto **1**, se realizaron diluciones de la concentración inicial, y se observó que sólo a 10 µg/µl presentó inhibición. Lo opuesto resultó para el resto de los bitiofenos al no presentar ningún efecto inhibitorio en *C. albicans* (Gráfica 7.2.2).



Gráfica 7.2.1 Efecto de los cuatro bitiofenos con mayor actividad biológica sobre el crecimiento de *C. albicans* a las 48 h. Los datos son promedio de tres experimentos independientes \pm DE con $n = 3$. Tukey ($\alpha = 0.05$).



Gráfica 7.2.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del bitiofeno **1** a concentraciones: 10, 1, 0.1 y 0.01 µg/µl sobre *C. albicans*. Los datos son promedio de tres experimentos independientes ± DE con $n = 3$. Tukey ($\alpha = 0.05$).

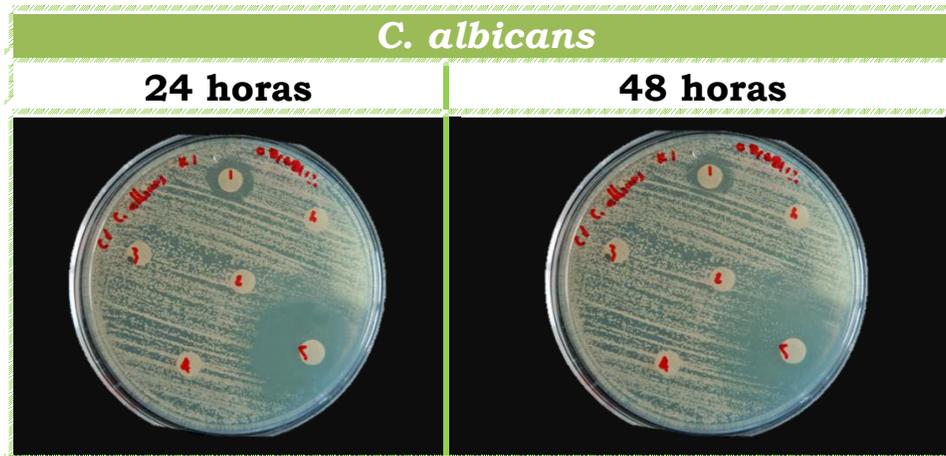
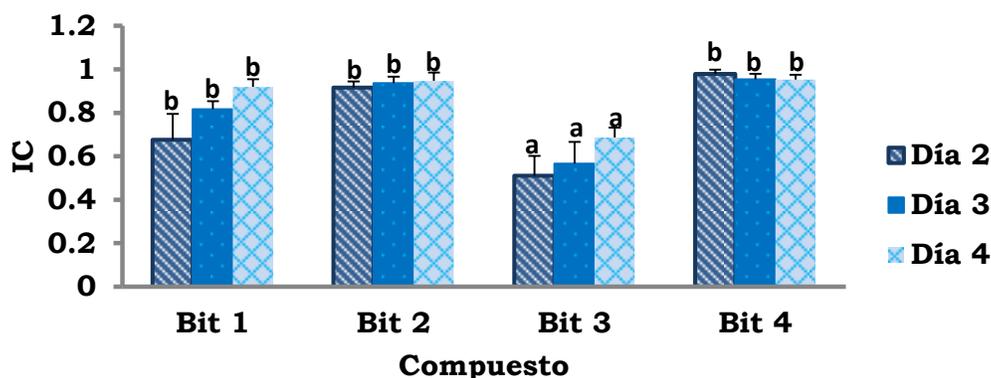


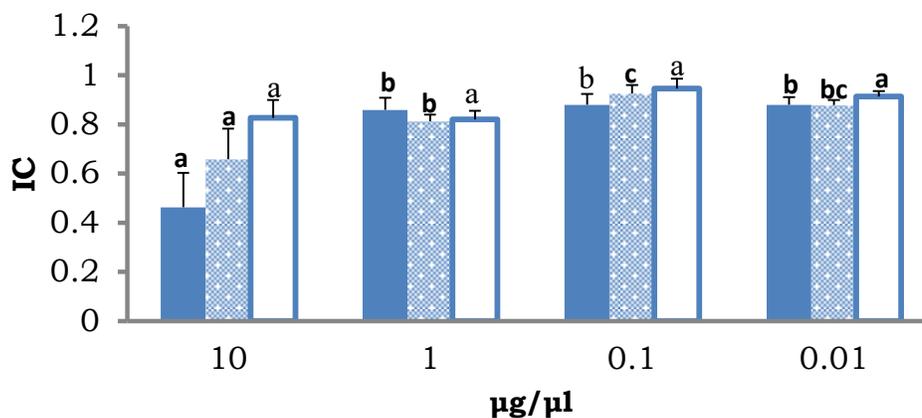
Figura 7.2.3 Efecto fungistático del bitiofeno (**1**) sobre *C. albicans*.

7.3 Efecto sobre el crecimiento de *Colletotrichum acutatum*

En la evaluación de los bitiofenos sobre el crecimiento filamentoso del hongo fitopatógeno *C. acutatum* se observó que el bitiofeno **3** con un halo de inhibición promedio de 0.5 mm; siendo el mejor para inhibir el crecimiento fúngico al segundo, tercer y cuarto día (Gráfica 7.3.1). Los bitiofenos **1**, **2** y **4** presentaron un comportamiento similar de menor actividad de efecto antifúngico a los días probados respectivamente.



Gráfica 7.3.1 Actividad fungistática del bitiofeno **3**, ante *C. acutatum* Barras con la misma letra son estadísticamente iguales. Los datos son promedio de tres experimentos independientes \pm DE con $n = 3$. Tukey ($\alpha = 0.05$).



Gráfica 7.3.2 Efecto de CMI a 10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del bitiofeno **3**. Valores seguidos de la misma letra en la barra no difieren estadísticamente. Los datos son promedio de tres experimentos independientes \pm DE con $n = 3$. Tukey ($\alpha = 0.05$).

La concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del bitiofeno **3** fue la que ejerció efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *C. acutatum*.

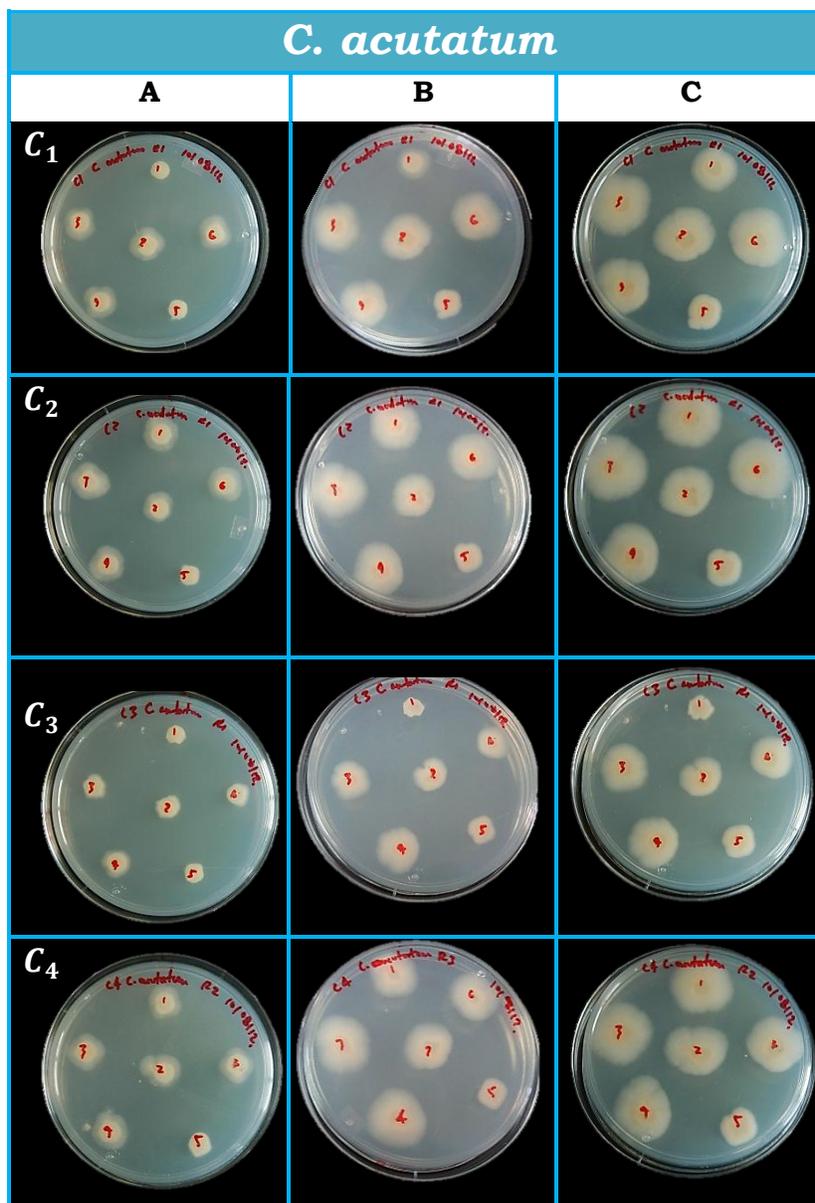
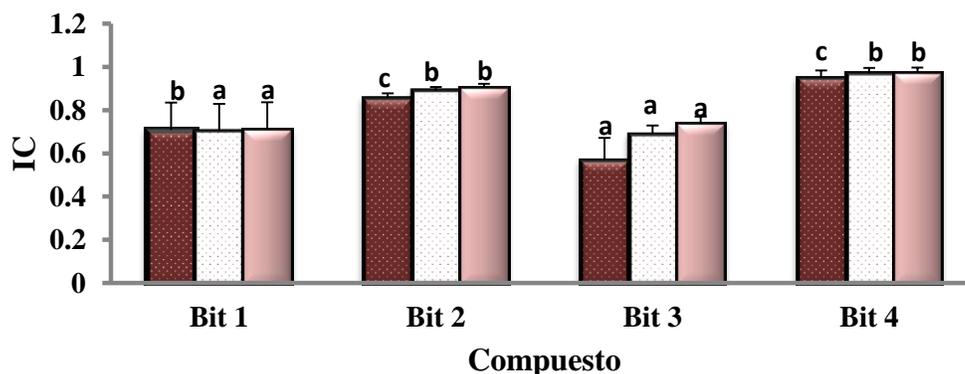


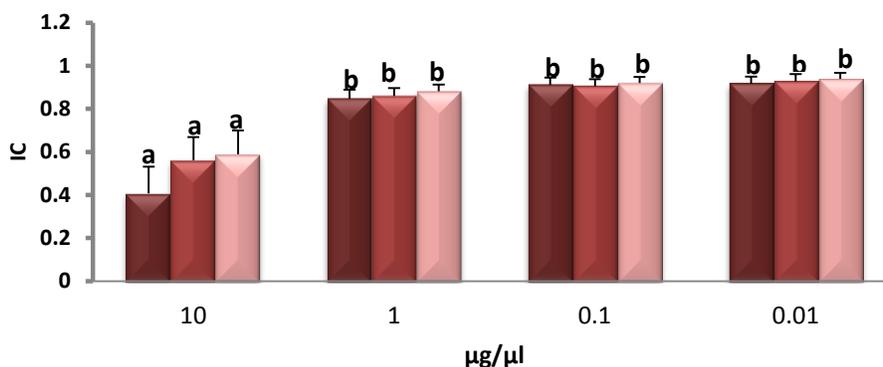
Figura 7.3.3 Efecto antifúngico de los bitiofenos sobre el crecimiento *C. acutatum*. Las concentraciones usadas son: 10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se realizó un registro de: **A**= día 2, **B**= día 3 y **C**= día 4 respectivamente.

7.4 Efecto antioomicético de los bitiofenos sobre *P. cinnamomi*

Los cuatro bitiofenos evaluados mostraron en distinto grado un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*. Los bitiofenos **1** y **3** fueron los mejores con un IC promedio de 0.70 mm para el primero y 0.9 mm para el último respectivamente. Mientras que para los bitiofenos **2** y **4** no presentó un significativo efecto (Gráfica 7.4.1).



Gráfica 7.4.1 Ensayo de los cuatro bitiofenos sobre el crecimiento de *P. cinnamomi*. Dónde: ■ =Día 2, □=Día 3 y ▨=Día 4. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas. Los datos son promedio de tres experimentos independientes \pm DE con $n = 3$. Tukey ($\alpha = 0.05$).



Gráfica 7.4.2 Concentración mínima inhibitoria de los compuestos **1** y **3** en *P. cinnamomi* a diferentes concentraciones (10, 1, 0.1 y 0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Los datos son promedio de tres experimentos independientes \pm DE con $n = 3$. Tukey ($\alpha = 0.05$).

La inhibición del crecimiento de *P. cinnamomi* a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ presentó efectos significativos respecto a las demás concentraciones y ésta puede ser útil para estudios posteriores (Figura 7.4.3).

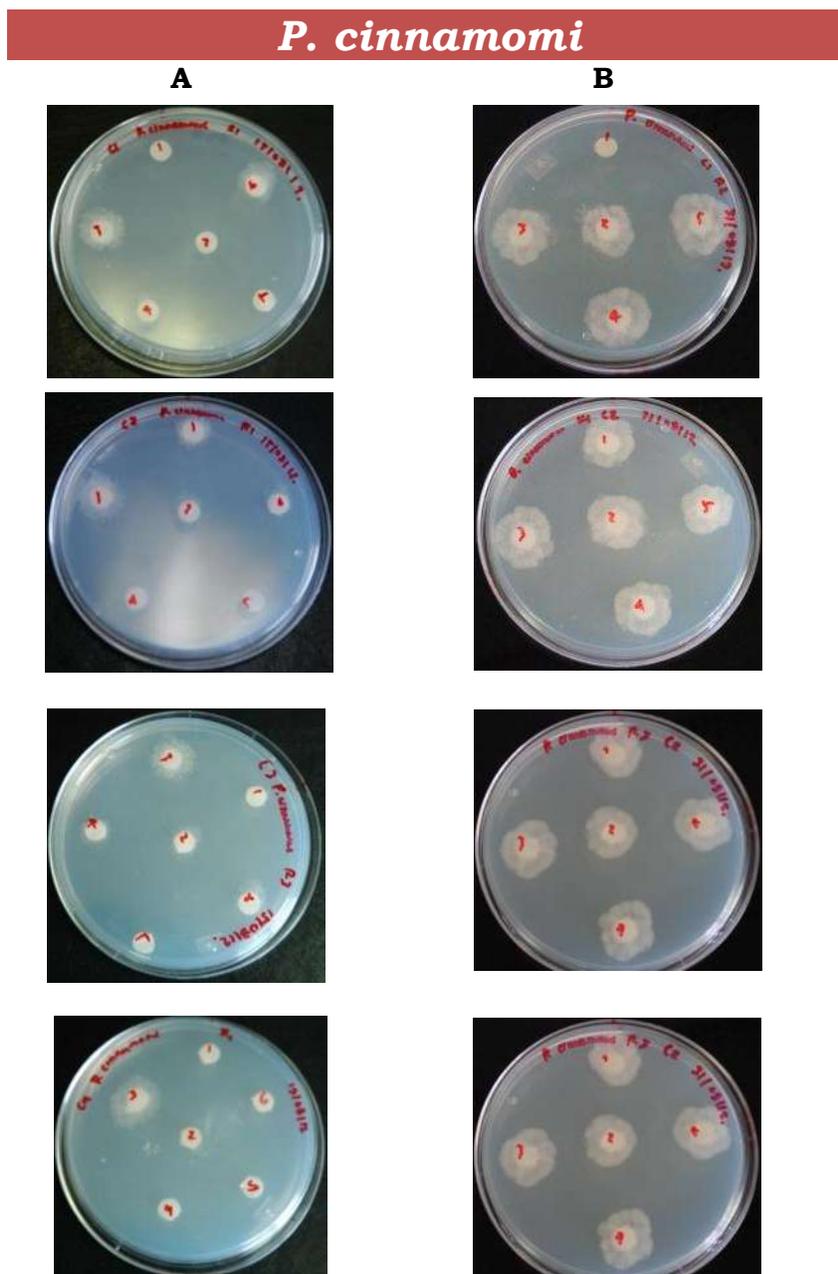


Figura 7.4.3 Inhibición del crecimiento de *P. cinnamomi* por bitiofenos. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 7.3.3.

7.5 Efecto sobre la germinación de esporas de *Aspergillus nidulans*

Durante la evaluación del efecto de los compuestos sobre el crecimiento micelial y germinación de esporas en *Aspergillus nidulans*, se encontró que el bitiofeno **1** y **3** inhibieron completamente el crecimiento. La germinación desde las primeras horas evaluadas, con el tratamiento con bitiofenos, fue significativamente mayor con respecto al control, pero sin diferencias (Figura 7.5.1).

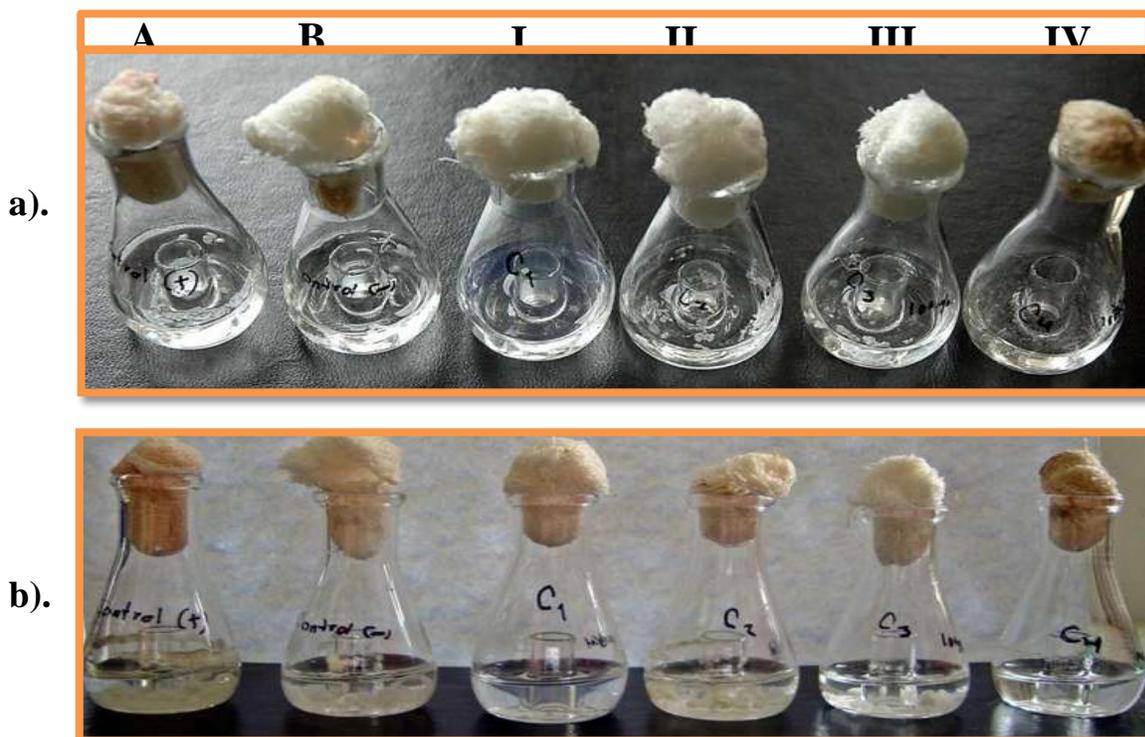


Figura 7.5.1 Evaluación inhibitoria de los cuatro bitiofenos ensayados en *Aspergillus nidulans*. Reporte evaluado a las 24 (a) y 48 (b) h; donde: **A**: Control positivo, **B**: Control negativo, **I**, **II**, **III** y **IV** representan a cada uno de los bitiofenos utilizados respectivamente.

7.6 Evaluación microscópica de los cuatro bitiofenos sobre *Aspergillus nidulans*.

El estudio morfológico de cada uno de los compuestos se realizó observando con objetivo 40 y 100 X del microscopio, en 4 campos por cada placa. Se tomó como inhibición al no observar crecimiento de micelio por cada campo (Figura 7.5.1).

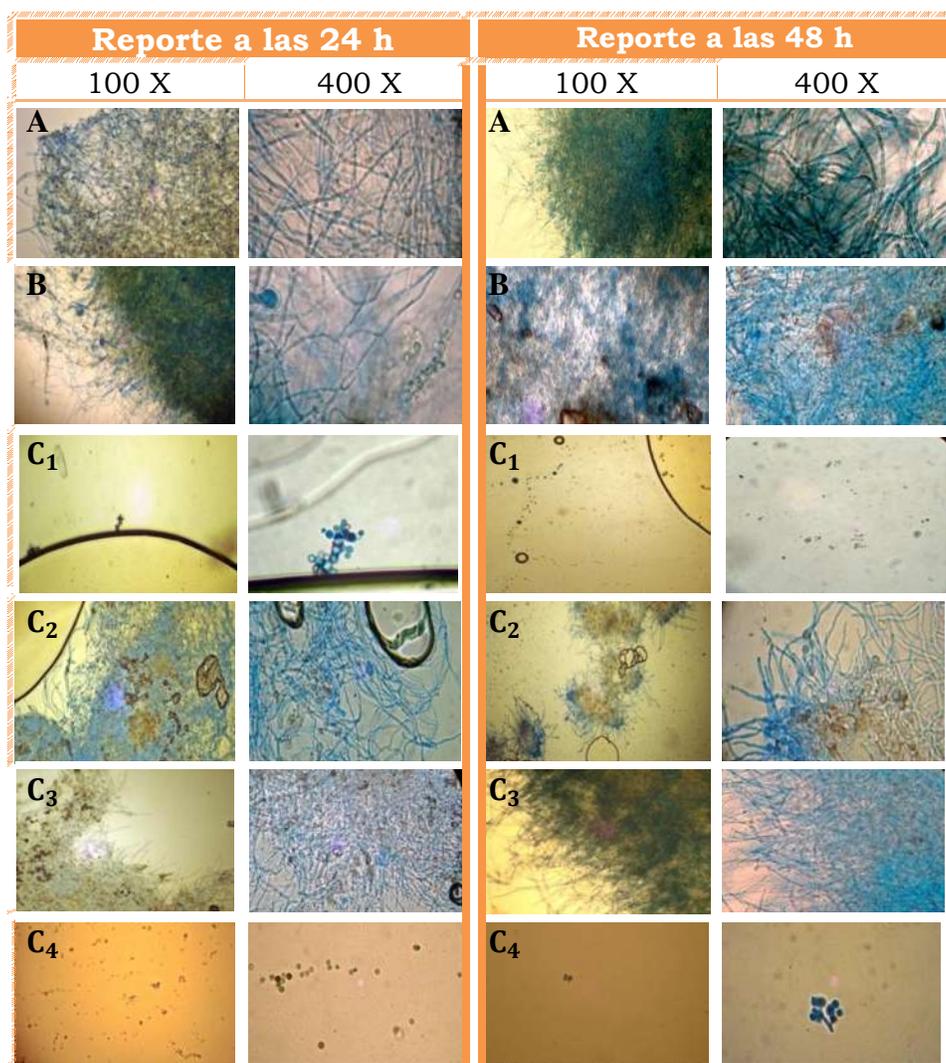


Figura 7.6.1 Morfología microscópica de la inhibición de crecimiento micelial de *Aspergillus nidulans*. Se evaluó en un lapso de 24 y 48 h. **A**= Control positivo, **B**= Control negativo, **C₁-C₄**=Corresponde a cada uno de los bitiofenos en estudio.

Dos de los compuestos más activos identificados en la evaluación microscópica fueron el bitiofeno (**1**) que inhibió el crecimiento micelial y germinación de esporas casi en un 100 % durante todo el periodo de evaluación, seguido del bitiofeno (**4**) cuyo efecto negativo sobre el crecimiento del hongo fue bastante regular a través del tiempo, siempre con respecto a los controles, fueron evaluados posteriormente a diferentes concentraciones en un formato de 24 y 48 h. Se realizó nuevamente un ensayo donde sólo se seleccionaron los dos compuestos más activos pero a diferentes concentraciones necesarias para determinar el efecto de inhibición de crecimiento fúngico (Cuadro 7.5.2).

Cuadro 7.6.2 Evaluación de los compuesto **1** y **4** sobre *A. nidulana* a diferentes concentraciones. Se tomó como referencia al tiabendazol (Tecto 60) como control donde: el **1**= bitiofeno 2,2'- Bitiofeno-5-carboxaldehido y **4**= 2,3'-Bitiofeno. El signo positivo (+) = representa el efecto positivo de nuestro compuesto y el signo negativo (-) = significa que no hubo cambio ni modificación en su crecimiento.

Concentración	Compuestos				Control (+) Tecto 60
	1		4		
	24 h	48 h	24 h	48 h	
100 µg/µl	+	+	+	-	-
10 µg/µl	+	+	+	-	-
1 µg/µl	-	-	-	-	-
0.1 µg/µl	-	-	-	-	-
0.01 µg/µl	-	-	-	-	-

7.7 Evaluación microscópica del compuesto 1 ante *A. nidulans* a diferentes concentraciones.

En la evaluación podemos observar que el matraz **I** y **II** de las dos imágenes no presentan crecimiento micelial ni germinación de esporas a



concentraciones más altas como 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del compuesto **1** reportado a las 24 y 48 h. Se observa en el objetivo 400 X del microscopio en 4 campos, que favorece la germinación y crecimiento del hongo a partir de concentraciones más bajas, encontrando que en tres campos está completamente invadido de conidióforos, presentando inicio de esporas en forma de cadena lineal. (Figura 7.7.1).

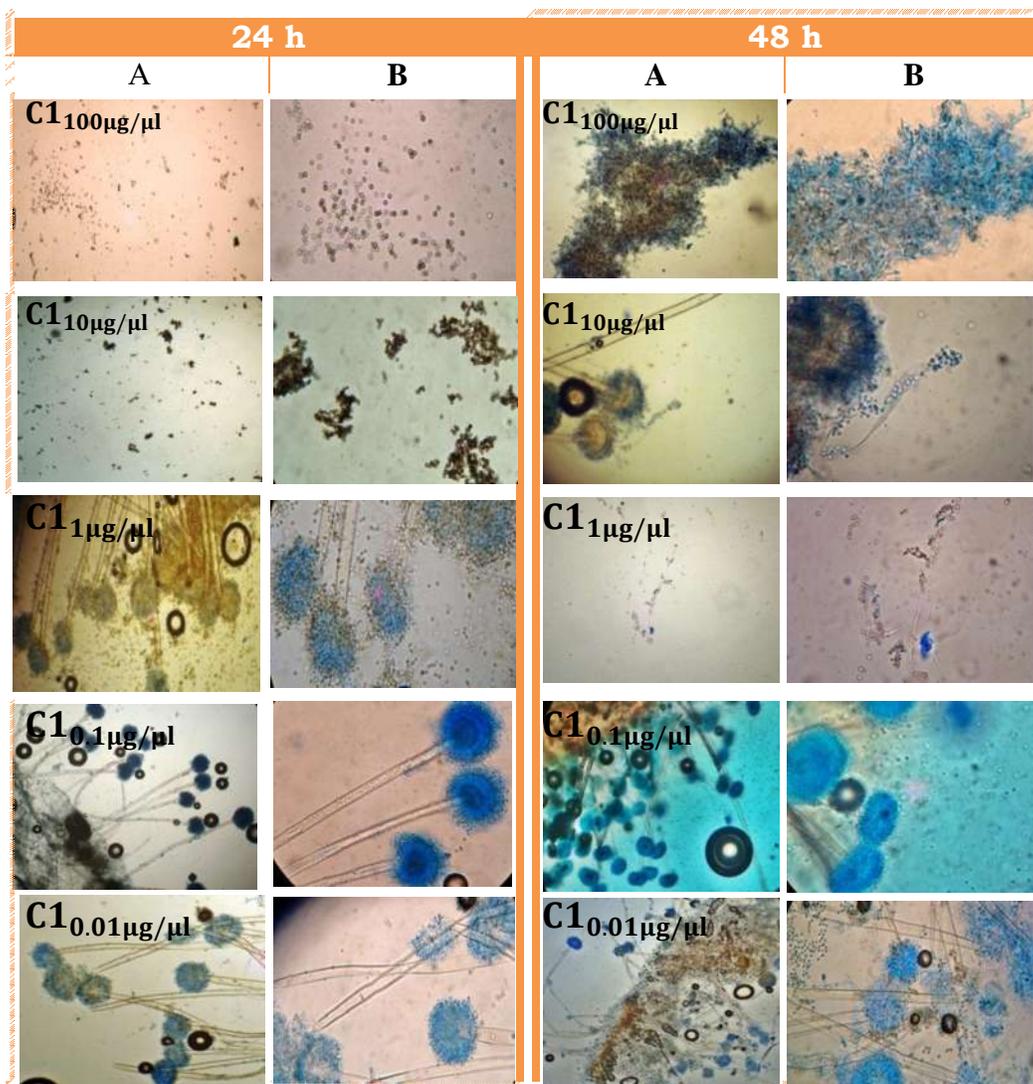


Figura 7.7.1 Morfología microscópica del efecto de inhibición del compuestos **1** sobre *A. nidulans*. Reporte de evaluación a las 24 y 48 h. Donde **A**= 100 X y **B**= 400 X a diferentes concentraciones.

7.8 Evaluación del compuesto 4 ante *A. nidulans* a diferentes concentraciones

Para el ensayo con el compuesto **4** se observa que al segundo día (24 h) sólo a la concentración de 100 µg/µl inhibe la germinación, y después de la concentración más baja de 10 µg/µl ya está esporulando rápidamente el hongo de *A. nidulans* y al tercer día (48h) el hongo está crecido en el matraz en medio mínimo líquido (Figura 7.7.1).

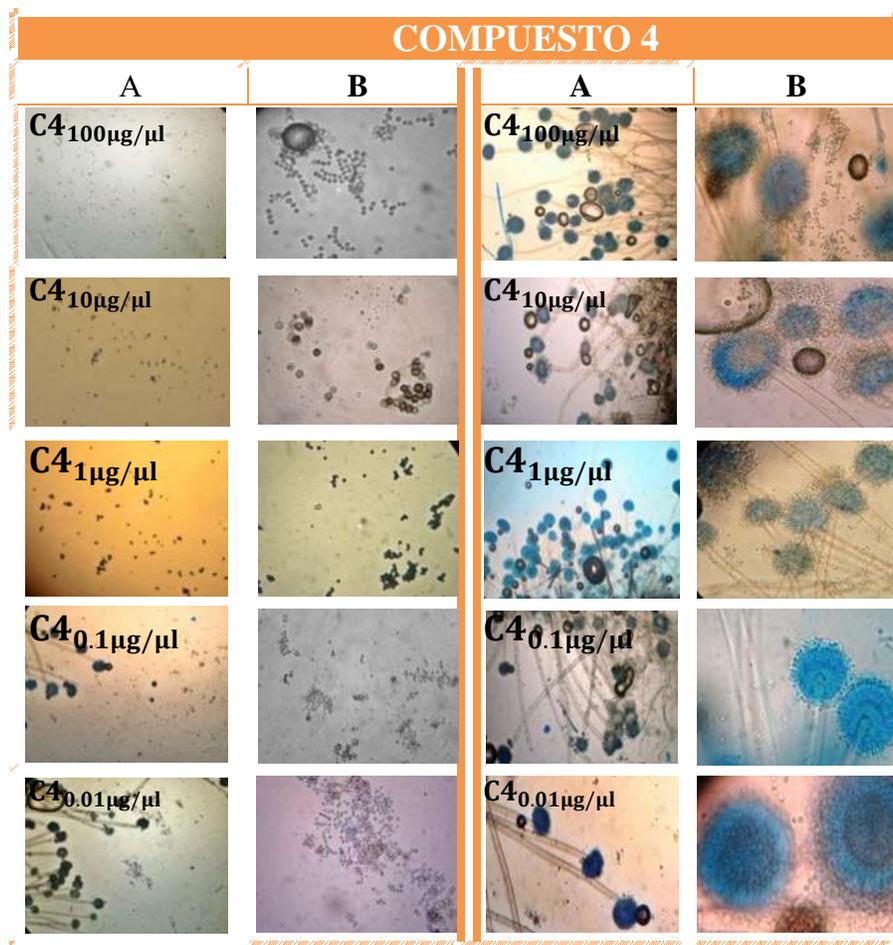
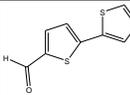
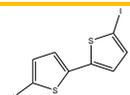
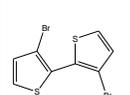
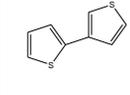


Figura 7.8.1 Reporte microscópico del efecto de inhibición de crecimiento de *A. nidulans* ante el compuesto **4**. Los datos son similares a la imagen 7.6.1.

El compuesto **1** parece ser relativamente selectivo para el género *A. nidulans* exhibiendo un elevado nivel de actividad contra el crecimiento a una concentración de 100 µg/µl y una actividad moderada a 10 µg/µl. La actividad del compuesto 1 a una concentración de 100 µg/µl a las 24 y 48 h es comparable a la del control positivo, Tecto 60®. El compuesto 4 fue el menos activo antifúngico, ya que sólo presentó efecto a las 24 h y un efecto fungistático a las 48 h. Las actividades selectivas del compuesto **1** y **4** hacia la especie *A. nidulans* merecen más estudio como productos fitosanitarios potenciales.

De los cuatro bitiofenos ensayados en bacterias no presentaron efecto sobre su crecimiento; mientras que el compuesto **1**, fue el mejor para inhibir el crecimiento de hongos como *C. albicans*, *A. nidulans* y *P. cinnamomi*, seguido del compuesto **3** que presentó un efecto fungicida sobre *C. acutatum* y *P. cinnamomi*. También el 2,3-bitiofeno (**4**) que solamente presentó efecto biocida en *A. nidulans* (Cuadro 7.6.3).

Actividad Biológica									
Nombre de compuesto	Estructura química	Modelo biológico							
		Bacterias				Hongo			Oomiceto
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. acutatum</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>P. cinnamomi</i>
2,2'-Bitiofeno-5-carboxaldehído		-	-	-	-	+	-	+	+
5,5'-Diiodo-2,2'-Bitiofeno		-	-	-	-	-	-	-	-
3,3'-Dibromo-2,2'-bitiofeno		-	-	-	-	-	+	-	+
2,3- bitiofeno		-	-	-	-	-	-	+	-

Cuadro 7.6.3 Actividad biológica de los compuestos ensayados ante los diferentes patógenos. Donde el signo negativo (-) = No presentó efecto de inhibición y el signo positivo (+) = Sí presentó efecto antimicrobiano con los compuestos probados.



VIII DISCUSIÓN

Una fuente potencial de agentes de control biológico es la búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica tal como los “bitiofenos”; que gran parte de ellos tienen origen natural, y por su actividad biológica han despertado el interés para controlar con ellos las enfermedades de algunas plantas y del ser humano.

Un ejemplo de planta antagónica a nemátodos, hongos y bacterias es el cempasúchil o “flor de muerto” (*Tagetes erecta*) es una planta ampliamente reconocida por sus propiedades fungicidas, nematocidas e insecticidas, Badii y Abreu, (2006).

Existe evidencia que los compuestos secundarios en *Tagetes*, como los bitiofenos son elementos de disuasión eficaz de numerosos organismos, incluyendo: hongos patogénicos en seres humanos, bacterias en general, parásitos y numerosas plagas de insectos a través de varios mecanismos (Harish y Bapu, 2001)

Se sabe de cuatro bitiofenos presentes en abundancia en el género *Tagetes*, estos son: 5-(3-buten-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT), 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBTOH), 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil (BBTOAc) y 2',5',2'' tertienilo ó α -tertienilo (α -T), (Marotti *et al.*, 2010). Las concentraciones en la plantas varían de acuerdo a la especie, el estado de desarrollo, órgano vegetativo y distribución de las cavidades secretoras, sin embargo el sitio de mayor concentración de bitiofenos es en la raíz (Grandi *et al.* 2009)

El gran espectro como agentes antimicrobianos y su capacidad biodegradable, los hace atractivos como alternativa en el uso de posibles compuestos antibacterianos y fúngicos, por ello nos motiva a explorar actividades antimicrobianas de bitiofenos de los cuales no se conoce su aspecto antimicrobiano. Uno de los criterios que se utilizaron, fue utilizar bitiofenos diferentes con la misma característica estructural de los ya



reportados presentes en *Tagetes* y para saber si presentaban mejor efecto microbicida contra los microorganismos evaluados (Kumar *et al.* 2012).

Se observó que los bitiofenos (1) 2,2'-Bitiofeno-5-carboxaldehído y (3) 3,3'-dibromo-2,2'-bitiofeno son los mejores para inhibir el crecimiento de hongos y oomicetos, ya que presentaron un efecto fungicida sobre *C. albicans* y *C. acutatum*, así como oomiceticida frente a *P. cinnamomi*. Esta observación es comparable con lo que reporta Bosveld (1989), quienes determinaron que existe efecto de *T. patula* en bacterias comunes como *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, así como contra algunos hongos en cultivos de tomate, cítricos, manzano, banano, plátano y flores. Por lo que se infiere que los grupos aldehído o dibromo aumentan la actividad antimicrobiana.

El bitiofeno 2,2'-Bitiofeno-5-carboxaldehído (1) y 2,3'-Bitiofeno (4) fueron estadísticamente similares e inicialmente lograron inhibir la germinación totalmente pero fueron perdiendo eficacia a través del tiempo y de la concentración, para llegar a la última evaluación (48 h) con un crecimiento que, comparado con los controles, representó el 100 y 80 % respectivamente. La inhibición en la germinación de esporas mediante el uso de bitiofenos, podría ser una importante contribución a limitar la propagación del patógeno.

No se tiene referencias del uso de los dos bitiofenos utilizados para el control de este hongo; pero si se conoce de resultados satisfactorios de tiofenos extraídos de *Echinops ritro* (Asteraceae) que presentan actividad antifúngica, los cuales fueron evaluados en mayor detalle utilizando microdilución en caldo frente a patógenos de plantas tal como *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *C. gloesporioides*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis viticola* y *Phomopsis obscurans*. 5'-(3-Buten-1-inil)-2,2'-bitiofeno, el alfa-tertienil, y 2-[penta-1,3-diinil]-5[4-hidroxi-but-1-inil]tiofeno a 3 y 30 μ M fueron activos frente a



las tres especies de *Colletotrichum*, *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis viticola* y *Phomopsis obscurans* (Fokialakis *et al.* 2006). Por otro lado, los menos efectivos para inhibir el crecimiento fúngico fueron el 5,5'-Diiodo-2,2'-Bitiofeno (**2**) y el 3,3'-Diibromo-2,2'-bitiofeno (**3**); desde el primer momento de evaluación, se observó un crecimiento con respecto a los otros bitiofenos usados en este estudio. Con respecto a las concentraciones usadas para cada bitiofeno en este ensayo, se encontró que durante las primeras 24 h de evaluación, las dos concentraciones (100 µg/µl y 10 µg/µl) tuvieron un efecto característicamente similar; pero ésta respuesta varió con el paso del tiempo.

Es importante mencionar que, si el efecto de una determinada concentración varía mucho con relación a otra del mismo bitiofeno, el análisis multifactorial puede encubrir el efecto individual de cada una de las concentraciones estudiadas e inducir a conclusiones equivocadas con respecto a la eficacia de un bitiofeno determinado. En nuestro estudio se observó que el 2,2'-Bitiofeno-5-carboxaldehído (**1**), a concentraciones 100 y 10 µg/µl inhibieron completamente la germinación de esporas en el hongo. Parece que el grupo carboxaldehído en el compuesto **1** y la adición de bromo en el compuesto **3**, es necesario para mantener el mayor nivel de actividad. En efecto, el bitiofeno simple y la adición de yodo parece ser responsable de la reducción de la actividad.

Existen reportes diferentes de los tiofenos de origen natural, tal como α-tertienilo que presentó toxicidad significativa para las actividades antivirales fotoactivados y citotóxicos frente al citomegalovirus murino con concentraciones inhibitorias mínimas en el rango de 0.02-40 m. La relación de fototoxicidad tiofeno sugirió que la tasa de producción de oxígeno singlete es el principal determinante de las actividades antivirales y citotóxicos, (Marles *et al.*, 2008). Además de ser un agente de control de mosquitos, α-tertienilo se ha demostrado que tiene varias otras actividades en presencia de luz ultravioleta como antibiótico, antifúngico,

actividades anti-HIV y una nueva proteína inhibidora acción quinasa. α -tertienilo puede ser extraído de las raíces de las especies de Tagetes en éter de petróleo e incluso el extracto crudo es eficaz contra las larvas de mosquitos. α -tertienilo puede purificarse adicionalmente usando una columna de sílice (80-120 Å). α -tertienilo también está disponible comercialmente en Aldrich, USA, (Manish Nivsarkar *et al.*, 2001).

Compuestos diferentes pero de la misma variedad como: 5-(3-buteno-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT), 5-(4-hidroxi-1-butenil)-2,2'-bitienil (BBT-OH), 5-(4-acetoxi-1-inil)-2,2'-bitienil (BBT-OAc) y 2,2':5',2'-tertienil (α -T) fueron evaluados para determinar su actividad biológica (mortalidad y genotoxicidad) en células de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* D7. Muzzoli y Sacchetti (2001) observaron un alto porcentaje de mortalidad de BBTOAc en todas las concentraciones ensayadas y un efecto significativo con α -tertienil, pero sólo en la concentración más baja, mientras que BBT no mostró efectos. Ninguno de los compuestos ensayados presentó actividad genotóxica.

También se sabe que en estudios ensayados por Manish Nivsarkara *et al.* (2001) han comprobado que α -Tertienilo se activa por la luz ultravioleta y produce fototoxicidad a larvas de mosquitos, mostrando un 100% de muerte de larvas a 55 minutos de exposición a alfa-tertienilo y luz ultravioleta (366 nm). Sin embargo, se genera especies con radicales de oxígeno y tienen la capacidad para inhibir varias enzimas como tanto *in vivo* como *in vitro*.

Es así, como en el presente estudio se muestra que los bitiofenos presentan actividad antifúngica y contra patógenos de plantas del suelo. La disponibilidad de estos compuestos hace un candidato atractivo potencial para el desarrollo como base de microbicidas.



IX CONCLUSIÓN

Los bitiofenos presentaron actividad antifúngica y omiceticida contra los microorganismos probados de patógenos de humanos y plantas.

X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Atkinson, R.E; Curtis, R.F y Phillips, G.T. (1965).** “Naturally-occurring thiophene. Bithienyl derivatives from *Tagetes minuta* L”. *J. Chem. Soc.* 23(9): 7109-7115.
2. **Badii M. H. y Abreu J. L. (2006).** “Control Biológico una forma sustentable de control de plagas”. *Daena: international journal of good conscience.* 1(1): 82-89.
3. **Bartnicki-Garcia** y Nickerson Walter J. Nutrition, growth, and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 84:841–858.
4. **Bohlmann, F. (1973).** “Naturally occurring acetylenes”. In: *Phytochem.* Pergamon Press. 3 (1): 112-131.
5. **Bosveld M. (1989).** “Thiophene accumulation in relation to morphology in roots of *Tagetes patula*”. *Planta Springer-Verlag* 179(5): 43-50.
6. **Castañón Olvares L. Rocío. (2006).** “Organismos Emergentes y Resurgentes en micología médica”. Laboratorio de Micología Médica. Facultad de Medicina, UNAM. México. 20: 304-309.
7. **Chan G. F. Q; Towers G. H. N. y Mitchell J. C. (1975).** “Ultraviolet- mediated antibiotic activity of thiophene compounds of the *Tagetes*”. *Phytochem.* 14: 2295-2296.
8. **Choi, W. I; Lee E. H; Park H. M y Ahn Y. J. (2003).** “Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae)”. *Journal of Economic Entomology.* 96 (5): 1479-1484.
9. **CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2005).** *Reference Method for difission disk Susceptibility.* CLSI document M2-A8.
10. **Cubillo D. G. y Hilje L. (1999).** “Evaluación de repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos



- vegetales sobre Bemisia tabaco”. *Manejo Integrado de Plagas*. 53 (9): 65-72.
11. **Curtis R. F. y Phillips G. T. (1962)**. “Thin-layer chromatography of thiophene derivatives. J. Cromatog”. *Der Pharma Chemical*. 3 (4): 38-54.
 12. **Duke, J. (2009)**. “Phytocheical and Ethnobotanical databases USDA”. <http://www.ars-grin.gov/duke/Plants.html>. (Octubre de 2009).
 13. **Fleming R. V; Walsh T. J y Anaissie E. J. (2002)**. “Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am*.16 (4): 915-933.
 14. **Fry W. E y Goodwin S. B. (1997)**. “Re - surgimiento de la papa y el tomate tizón tardío en los Estados Unidos”. *Plant Dis*. 81(1):1349-1357.
 15. **González Ana María (2001)**. “Características del consumo de antibióticos y de la resistencia bacteriana en la ciudad de Santa Fe: estimación del gasto en antibióticos en un servicio de salud”. Buenos Aires. *Inst. Universitario de la Fundación ISALUD*. 71 (2): 33-40 p.
 16. **Grandi Silvia; Roberta Piccaglia y Nastri Anna Dinelli Giovanni. (2009)**. “Ocurrence of thiophene in different Tagetes species”. Research Article. *Publishe online in Wiley Interscience*: 9 (16): 366-368.
 17. **Harish Padh y Bapu Cherian. (2001)**. “Thiophenes: plant-derived new generation insecticide”. *Current Science*. 81(6): 54-59.
 18. **Heywood V. H; Harbone J. B y Turner B. L. (1977)**. “The Biology and Chemistry of the Compositae”. *Academic Press*, London. 1188 p.
 19. **Isman, M.B. (2000)**. “Plant essential oils for pest and disease management”. *Crop. Protection* 19 (8): 603-608.

20. **Kaul P. N; Bhattacharya A.K; Rajeswara B. R; Syamasundar K. V. y Ramesh S. (2005).** “Essential oil composition of *Tagetes minuta* L. fruits”. *Journal Essential Oil Research*. 17 (3):184-185.
21. **Krishna A; Kumar S; Mallavarapu G. R. y Ramesh S. (2004).** “Composition of the essential oils of the leaves and flowers of *Tagetes erecta* L”. *Journal Essential Oil Research*. 16 (7): 520-522.
22. **Kumar A. (1997).** “Microbbial resitance to drugs – a universal problem in urgent need of a comprehensive approach”. *Natl Med J India* 10 (5): 221-4.
23. **Kumar A; Deeksha Joshi y Suresh Walia. (2012).** “Antifungal Acetylinic Thiophenes from *Tagetes minuta*: Potential Biopesticide”. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 85: 207-211.
24. **Manish Nivsarkar*, Bapu Cherian y Harish Padh. (2001).** “ α -Tertienil: Un insecticida de origen vegetal de nueva generaci3n”. Department of Pharmacology and Toxicology, B. V. Patel Pharmaceutical Education and Research Development Centre.India. *La Ciencia Actual*, 81(6): 1-5.
25. **Mariotti M; Piccaglia R; Biavati B; y Marotti I. (2004).** “Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species”. *Journal Essential Oil Research*. 16 (7): 440-444.
26. **Marles Robin J; Hudson James B; Graha A. y Morand Peter. (2008).** “Structure-activity studies of photoactivated antiviral and cytotoxic tricyclic thiophenes”. *Photochemistry and Photobiology* 56 (4): 479-487.
27. **Muzzoli Mariavittoria y Sacchetti Gianni. (2001).** “Biological Activity of Four Thiophene Compounds in Resting *Saccharomyces cerevisiae* Cells”. Department of Biology, Pharmaceutical Biology Lab., University of Ferrara, Ferrara, Italy. *Pharmaceutical Biology*. 39 (1): 40–42.



28. **Neher R. T. (1966).** “Monograph of the genus *Tagetes* (Compositae)”. Ph D. Tesis. Indiana University. Bloomington, Indiana, USA. 306 p.
29. **Ortega, L. D. (2001).** “Actividad biológica de extractos de *Tagetes filifolia* Lag; en la mosca blanca *Trialeurodes vaporariorum* West. (Hemiptera; Aleyrodidae)” Folleto técnico. Colpos, CONACYT y RAPAM. México. 16 p.
30. **Raghav Mishra; K.K. Jha; Sachin Kumar e Isha Tomer. (2011).** “Synthesis, properties and biological activity of thiophene”. A review. College of Pharmacy, Teerthankar Mahaveer University, India. Scholars Research Library. *Der Pharma Chemical.* 3 (4): 38-54.
31. **Rodríguez, H. C. (2000).** “Plantas contra plagas: Potencial práctico del ajo, anona, nim, chile y tabaco”. RAPAM. México. *Rev. Colomb. Entomol.* 35 (2):133.
32. **Ruiz C.H. y Caseico M. H. (1989).** “Aislamiento y caracterización de las fracciones con actividad antimicrobiana de *Drimys granadensis*”. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia. pp. 22-301.
33. **Rzedowski J y Calderón R. G. (2005).** “Flora fanerogámica del Valle de México”. Instituto de Ecología, 2 ed. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento. pág. 921-923.
34. **Sachin Kumar. (2012).** “Biological Diversity of Thiophene”. Collage of Pharmacy, Teerthankar Mahaveer University. A Review *Ankita Chaudhary. Journal of Advanced Scientific Researc.* 3(3): 03-10.
35. **Sara Asticcioli; Elisabetta Nucleo; Gianfranco Perotti; Cecilia Matti; Laura Sacco y Laura Pagani. (2007).** “*Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: antifungal susceptibility and



- genotypic analysis". IRCCS Hospital Italia. *New Microbiología*, 30 (6): 303-307.
36. **Serrato C. M. A. y Quijano M. L. (2003)**. "Usos de algunas especies de Tagetes: Revisión bibliográfica (1984-1992)". Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenibles: Importancia y continuación de la agricultura tradicional. Comisión de Estudios Ambientales y Centro de Enseñanza, Investigación y Capacitación para el desarrollo Agrícola Regional (CEICADAR, Puebla), de Colegio de Postgraduados. México. p. 228-238.
37. **Sorenson N. A. (1977)**. "Polyacetylenes and conservatism of chemical characters in the Compositae". In: *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press. New York. 1(2): 385-409.
38. **Soule J. (1993)**. "Systematics of Tagetes (Asteraceae-Tageteae)". Doctoral Thesis. University of Texas, Austin. 683 p.
39. **Towers, G.H.N. y What, C.-K. (1978)**. "Biological activities of polyacetylenes". *Rev. Latinamer. Quim.* 9:162-170.
40. **Tripathi P y Dubey N. K. (2004)**. "Exploitation of natural products as an alternative strategy to controls postharvest fungal rotting of fruit and vegetables". *Postharvest Biol Technol*; 32 (1): 235-245
41. **Turner B. L. (1996)**. "The Comps of Mexico: A systematic account of the family Asteraceae Tageteae and Athemideae". *Phytologia Memoirs* 6: (10): 1-93.
42. **Villareal Q. J. A. (2003)**. "Tribu Tageteae". Rzedowski, J. & G. C. de Rzedowski (Eds.) *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* 113: 85.
43. **Zechmeister L. y Sease J. W. (1947)**. "Chromatographic and spectral characteristics of some polythienyls". *J. Amer. Chem. Soc.* 69(20): 270-273.