



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA
“PROSPECCIÓN PRELIMINAR DE INHIBIDORES DE
FACTORES DE RESISTENCIA BACTERIANA EN
EXTRACTOS DE *Cosmos bipinnatus*, *Reseda luteola*,
Tagetes erecta Y *Tagetes lucida*”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE RAMÍREZ ORTIZ

DIRECTOR:

DR. FRANCISCO J. ESPINOSA GARCÍA.

CO-ASESOR:

BIÓL. YOLANDA M. GARCÍA RODRÍGUEZ.

MORELIA MICHOACÁN

JUNIO 2017



DEDICATORIA

Este trabajo se los dedico a mis padres por su apoyo y sacrificio. Y en especial a mi madre porque es mi gran ejemplo a seguir y por creer siempre en mí.

A mi hermana Teresita que sin importar lo que sea siempre está para mí, por su compañía y su grande amor. Y a mis hermanos por darme la alegría y dicha de ser tía y a mis hermosos sobrinos.

A mi gran amor: mi esposo Demian por su inmenso amor, por su compañía, y por todas esas aventuras que hemos vivido juntos y por las que a un nos faltan por vivir, por toda esa felicidad que me ha dado y que ha sido siempre a su lado... Te amo!!

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco J. Espinosa García por brindarme la oportunidad de trabajar con él y su equipo de laboratorio, por su apoyo, por su comprensión, por el conocimiento que me brindó durante todo este tiempo y por su infinita paciencia.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IG200514 “Búsqueda de metabolitos secundarios bioactivos de interés medicinal y agronómico, y su evaluación como sensibilizadores de organismos resistentes a xenobióticos” otorgado a los doctores Guillermo Delgado Lamas (Instituto de Química, UNAM), Tzasná Hernández Delgado (FES Iztacala, UNAM) y Francisco J. Espinosa García (IIES, UNAM); Presupuesto operativo de FJEG del IIES, UNAM y por fondos personales de FJEG.

A la Biól. Yolanda M. García Rodríguez por su análisis de cromatografía de Gases-Masas de mis muestras, por su colaboración en este proyecto, por sus consejos y por esos viajes que eran toda una aventura.

A la Dra. Guadalupe Torres por su análisis estadístico así como sus recomendaciones, por su paciencia y por brindarme su conocimiento.

A la Dra. Tzasná y su equipo de la FES Iztacala, UNAM, y a la QFB. Guadalupe Bolaños Monroy y MPS Laura Karina Avilés del Hospital Infantil de Morelia por el entrenamiento que me dieron y por las bacterias patógenas donadas. Al Dr. Salgado por su colaboración y por sus recomendaciones para con este proyecto. Y al Q.F.B Ernesto Rincón por su disposición. A la Dra. Judith Sánchez por su amistad y por su apoyo y por esas conversaciones en las que siempre se aprendía algo nuevo. A mis compañeros y amigos de laboratorio: a Ángel, Claudio, Yesenia, Viridiana Celso, Homero, Eliel que hicieron que el trabajo en el laboratorio fuera una diversión y porque siempre me brindaron su conocimiento.

A la Universidad Michoacana San Nicolás Hidalgo por el apoyo que me brindo y en especial a mi Facultad de Químico-Farmacobiología a mis maestros por sus enseñanzas y por siempre alentarnos a ser mejores cada día. Al Director Gabino Estévez, a la maestra Eréndira Solache porque me hicieron amar mi profesión.

A mi familia

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE.....	IV
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Mecanismos de acción de los antimicrobianos.....	13
2.1.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.....	13
2.1.2. Antimicrobianos activos en la membrana citoplasmática.....	13
2.1.3. Inhibidores de la síntesis proteica.....	13
2.1.4. Antibióticos que actúan en el metabolismo o estructuras de	14
ácidos nucleicos.....	
2.1.5. Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos.....	14
2.2 Inhibición de la resistencia bacteriana.....	16
2.2.1. Destrucción e inactivación del antibiótico por la producción de	17
enzimas.....	
2.2.2. Barreras de permeabilidad.....	19
2.2.3. Alteración del sitio blanco.....	20
2.3 Prospección de inhibidores de resistencia bacteriana de origen	21
vegetal.....	
2.4 Inhibición de resistencia bacteriana.....	24
2.5 Metabolitos secundarios de malezas.....	25
3. PREGUNTA.....	26
4. HIPÓTESIS.....	26
5. PREDICCIÓN.....	26

6. OBJETIVOS.....	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos.....	26
7. SISTEMA DE ESTUDIO.....	27
7.1 Descripción botánica de malezas.....	27
7.2 Bacterias usadas en el bioensayo antibacteriano.....	30
7.3 Colecta del material vegetal.....	32
7.4 Extracción de los aceites esenciales.....	33
7.5 Análisis químico de los aceites esenciales.....	34
7.6 Bioensayos preliminares de bioprospección de inhibición de resistencia a antibióticos.....	35
7.7 Diseño experimental.....	36
7.8 Bioensayo para encontrar la CMI y la CBM.....	38
8. RESULTADOS.....	41
8.1 Composición química del aceites esenciales.....	41
8.2 Bioensayos preliminares de bioprospección de inhibición de resistencia a antibióticos.....	46
8.3 Efecto de bioprospección de inhibición de resistencia a antibióticos.....	47
8.4 Resultados del bioensayo cualitativo de inhibidores de resistencia bacteriana.....	49
8.5 Efecto de inhibición bacteriana cuantitativo.....	63
9. DISCUSIÓN.....	64
9.1 Composición química de los aceites esenciales.....	64
9.2 Incidencia de actividad antibacteriana y de inhibición de resistencia a antibióticos.....	65
9.3 Ensayos para encontrar la CMI y CMB.....	69
10. CONCLUSIÓN.....	70
11. PERSPECTIVA.....	70
12. BIBLIOGRAFÍA.....	71

RESUMEN

La resistencia bacteriana a antibióticos ha generado la búsqueda sistemática de compuestos naturales (metabolitos secundarios) que son bioactivos; lo que se conoce como bioprospección. En este trabajo se reporta la bioprospección de moléculas antagónicas de los mecanismos bioquímicos que posibilitan la resistencia a antibióticos. La bioprospección se realizó en extractos de malezas, las cuales son abundantes y con un gran número de metabolitos secundarios que actúan en la defensa vegetal.

En este trabajo se analizó la hipótesis que la defensa vegetal inhibe enzimas y proteínas de eflujo que protegen a las bacterias de los antibióticos, generando su resistencia a ellos. Se probó la predicción de que los compuestos secundarios de los aceites esenciales de *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* y *Reseda luteola* presentan actividad antimicrobiana e inhibidores de resistencia bacteriana en cepas patógenas en humanos.

Los aceites esenciales de estas plantas se extrajeron por arrastre de vapor de agua y fueron analizados por cromatografía de gases-masas. La actividad antimicrobiana de los aceites fue probada con la prueba de Kirby-Bauer y se estimó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de dilución en caldo. Se utilizaron bacterias Gram negativas y Gram positivas en un total de 54 bioensayos; en donde se probó el aceite esencial solo; la combinación del aceite esencial con el antibiótico anulado y el aceite esencial con el antibiótico susceptible. De los bioensayos, en el 43% de los casos hubo inhibición bacteriana, en el 18% un efecto antagónico y en el 38% ningún efecto. El aceite esencial de *Cosmos bipinnatus* mostró poca actividad antibacteriana, pero inhibió a *Proteus mirabilis*; *Tagetes lucida* inhibió a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella sp*; *Tagetes erecta* solo inhibió a *Klebsiella pneumoniae*. *Reseda luteola* mostró mayor actividad antibacteriana en combinación con los antibióticos ácido nalidíxico, cefepime, clindamicina, cloranfenicol, imipenem, penicilina y vancomicina, incluso potenció el efecto antibacteriano de los antibióticos contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

La combinación de los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. lucida* y *R. luteola* con los antibióticos, mostró un efecto sinérgico y en algunos casos potenció el efecto antibacteriano, en las cepas susceptibles. La CMI y la CMB para los aceites fueron: CMI: 1.0 mg/ml y CMB: 2.0 mg/ml de *T. lucida* contra *K. pneumoniae* IV HIM; CMI: 1.0 mg/ml y CMB: 2.0 mg/ml de *R. luteola* contra *S. aureus* IHHIM; CMI: 0.5 mg/ml y CMB: 1.0 mg/ml contra *S. epidermidis* FES; CMI: 1.0 mg/ml y CMB: 1.5 mg/ml para *E. coli* 1249 2MR; CMI: 1.0 mg/ml y CMB: 1.5 mg/ml contra *V. cholerae* y CMI: 0.125 mg/ml y CMB: 0.5 mg/ml. para *S. epidermidis* FES.

Palabras clave: aceites esenciales, actividad antimicrobiana, resistencia bacteriana a antibióticos.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics has led to the systematic search for natural compounds (secondary metabolites) that are bioactive; this is known as bioprospection.

In this research bioprospecting of antagonistic molecules of biochemical mechanisms that enable antibiotic resistance is reported. Bioprospection was carried with weed extracts; these plants are abundant and have a large number of defensive secondary metabolites. We test the hypothesis that plant defense can inhibit enzymes and/or efflux proteins that protect bacteria from antibiotics, causing resistance to them. We tested the prediction that the secondary compounds of essential oils *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* and *Reseda luteola* contain antimicrobial activity and inhibitors of bacterial resistance in bacteria pathogenic to humans.

Essential oils were extracted by water steam distillation and analyzed by gas chromatography (GC-MS). The antimicrobial activity of the oils was estimated with the Kirby-Bauer test and the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by the broth dilution method. Gram negative and Gram positive bacteria were used in a total of 54 bioassays. Bioassay, in 43% of cases bacterial inhibition was observed; in 18% antagonistic effect against antibiotic resistance; and in 38% no effect. The essential oil of *Cosmos bipinnatus* showed little antibacterial activity, but inhibited *Proteus mirabilis*; *Tagetes lucida* inhibited *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* sp; *Tagetes erecta* only inhibited *Klebsiella pneumoniae*; *Reseda luteola* showed higher antibacterial activity in combination with antibiotics nalidixic acid, cefepime, clindamycin, chloramphenicol, imipenem, penicillin and vancomycin, even potentiate the antibacterial effect of antibiotics against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae*, *E. coli* and *K. pneumoniae*.

The essential oils of *C. bipinnatus*, *T. lucida* and *R. luteola* combined with antibiotics showed synergistic effect, and some cases antibacterial potentiation. The MIC and MBC for oil *T. lucida* vs *K. pneumoniae* IV HIM were: 1.0 mg / ml and 2.0 mg / ml. For *R. luteola* vs *S. aureus* IHHIM were: 1.0 mg / ml and 2.0 mg / ml. For *R. luteola* vs *S. epidermidis* FES where 0.5 mg / ml and 1.0 mg / ml. For *R. luteola* vs *E. coli* 1249 2MR 1.0 mg / ml and 1.5 mg / ml. For *R. luteola* vs *V. cholerae* 1.0 mg / ml and 1.5 mg / ml and for *R. luteola* vs *S. epidermidis* FES 0.125 mg / ml and 0.5 mg / ml.

Keywords: Essential oils, antimicrobial activity, bacterial resistance to antibiotics.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha considerado como un grave problema de salud pública a nivel mundial. Se estima que la mitad de los antibióticos se prescriben, se dispensan y se consumen de forma inadecuada. Esto ha contribuido al desarrollo de la resistencia bacteriana, lo que se reduce la efectividad de los tratamientos e incrementa los gastos médicos y la mortalidad por enfermedades infecciosas (Dreser *et al.*, 2008).

Se entiende por resistencia, al mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir o anular la acción de los agentes antimicrobianos. Existen dos tipos de resistencia bacteriana, la natural y la adquirida; la natural es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de antibióticos. Todas las bacterias de una misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso da ventaja competitiva sobre otras cepas y les permite sobrevivir cuando se usa ese antibiótico. En este caso la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación.

La resistencia adquirida constituye un problema en la práctica clínica, pues se ponen de manifiesto los fracasos de los tratamientos terapéuticos de un paciente infectado con un microorganismo que en otros tiempos era sensible. La resistencia bacteriana adquirida se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de las bases del ADN) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. Esta transferencia se realiza de forma horizontal a través de plásmidos u otro material genético móvil como integrones o trasposones, también transfiere material genético a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contactos con ellos.

A lo largo del tiempo las bacterias han desarrollado varios mecanismos de resistencia en contra de los antibióticos. Uno de ellos son las barreras de permeabilidad en el que destaca la bomba de flujo que permite la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que pueden eliminar muchos agentes antimicrobianos. El siguiente mecanismo se debe a una disminución de permeabilidad en la pared bacteriana, con la pérdida o

modificación de los canales de entrada (porinas). Otro de los mecanismos de defensa es por la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos; como son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetil transferasa y las β -lactamasas para el grupo de β -lactámicos. Otro mecanismo de resistencia bacteriana es por la modificación de la proteína diana. La bacteria modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas. (Fernández Riverón *et al.*, 2003).

Con el fin de minimizar estos mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos se han realizado estrategias como es evitar la automedicación, el uso racional de los antibióticos mediante la educación de los médicos a la población, así como incrementar la educación médica de enfermedades infecciosas, el uso de los agentes antimicrobianos y su prescripción basada en la evidencia, el establecimiento de programas de vigilancia epidemiológica y realizar antibiogramas en contra de los patógenos que producen las enfermedades más comunes, la racionalización del empleo de los antibióticos en la medicina veterinaria para la producción de alimento animal, así como el cumplimiento estricto de las medidas de prevención y control de la infección intrahospitalaria y el empleo de las vacunaciones, el uso de cocteles antibióticos, así como el uso alternativo de diferentes antibióticos, y el uso de antibióticos por periodos largos aunque el paciente muestre mejoría completa o recuperación de la salud y el desarrollo de nuevos antibióticos mediante la búsqueda de nuevas dianas (sitio del blanco) metabólicas en las bacterias.

Los antibióticos se identifican por su capacidad para matar a las bacterias (bactericidas) o inhibir el crecimiento (bacteriostáticos). Éstos actúan mediante la inhibición de las funciones bacterianas (tales como la síntesis de la pared celular, la replicación de ADN, transcripción de ARN y síntesis de proteínas) que son vitales para su crecimiento logarítmico (Clatworthy *et al.*, 2007).

En 1999, un estudio en el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, Georgia, USA (CDC, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA), reveló que el 49% de *Salmonella typhimurium*, el 91% de especies de *Shigella*, el 53% de especies de *Campylobacter* y el 10% de las cepas de *Escherichia coli* aisladas clínicamente, eran resistentes a uno o más de los antibióticos utilizados más

comúnmente. El 28% de los aislados de *S. typhimurium*, fue resistente a cinco o más antibióticos (Muñoz *et al.*, 2009).

Por lo que la búsqueda de inhibidores de resistencia bacteriana a antibióticos, moléculas bioactivas (metabolitos secundarios) es de suma importancia, en la investigación se le conoce como bioprospección. Se mencionan cuatro puntos importantes por lo que deben de ser estudiadas las plantas, 1) Porque las plantas producen metabolitos secundarios y tienen la propiedad de ser antibacterianos como parte de su estrategia de defensa química para protegerse de bacterias así como de hongos, virus e insectos; 2) Porque existe un sinnúmero de plantas que se han utilizado por la vía tópica y sistémica para tratar infecciones bacterianas; 3) Por la variedad química de grupos funcionales así como la quiralidad y la diversidad química de productos naturales que señalan ser una valiosa fuente de moléculas bioactivas. 4) Y por su fitoquímica (Gibbons, 2008).

Existe una gran variedad de plantas que se encuentra entre los cultivos o en zonas perturbadas y que se les conoce comúnmente como malezas o plantas indeseables (Espinosa & Sarukhán, 1997). Se ha demostrado que estas plantas contienen un gran número de metabolitos secundarios que actúan en la defensa vegetal (García y Pérez 2009). Por otra parte desde hace más de dos décadas se ha documentado la influencia que ejercen los volátiles sobre numerosas interacciones bióticas, en funciones fisiológicas y ecológicas como interacción planta-animal (Céspedes-L & Loaiza-Marín, 2007). También se ha demostrado que los volátiles pueden tener diferentes propiedades desde fármacos, plaguicidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas, y hasta colorantes, saborizantes y fragancias (Trejo-Tapia, 2007). La actividad antimicrobiana es otra de las actividades biológicas de los aceites esenciales y está directamente relacionada con los componentes bioactivos que contienen.

Una estrategia metodológica de bioprospección que ha demostrado tener resultados positivos es la búsqueda de plantas que resulten fuentes de nuevos antibióticos o compuestos inhibidores de resistencia bacteriana a antibióticos, y que además sean abundantes y que no se vayan a extinguir por su cosecha (Torres & Velho, 2010). Las malezas cumplen con ese requisito, por lo que en este trabajo se analizó el efecto de

los aceites esenciales de *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* y *Reseda luteola*, sobre su actividad contra bacterias Gram negativas y Gram positivas en combinación con antibióticos a los que la bacteria muestra resistencia, para realizar un estudio preliminar de inhibidores de resistencia bacteriana en extractos de malezas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismos de acción de los antimicrobianos

Existe una gran diversidad de grupos y familias de antibióticos. Los mecanismos de acción de los antimicrobianos para inhibir o causar la muerte a una bacteria son muy variados, y depende de las dianas afectadas (sitio del blanco).

2.1.1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

La ausencia de esta estructura condicionaría la muerte de la bacteria, debido al elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. Para que estos antibióticos ejerzan su acción, la bacteria se debe encontrar en crecimiento activo y que el medio en el que se encuentre sea isotónico o hipotónico, esto favorece el estallido de la célula cuando la pared celular se pierde. Son más efectivos sobre las bacterias Gram positivas. La síntesis de la pared celular se desarrolla en tres etapas: la etapa citoplasmática, donde se sintetizan los precursores del peptidoglicano como la fosfomicina y cicloserina. El transporte a través de la membrana, y la organización final de la estructura del peptidoglicano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared.

2.1.2. Antimicrobianos activos en la membrana citoplasmática

Esta membrana es vital para todas las células, ya que intervienen activamente en los procesos de difusión y transporte activo, por lo que controla la composición del medio interno celular. A este grupo pertenecen las polimixinas y los poliénicos. Estos antibióticos modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio en el metabolismo bacteriano por lo que se comportan como bactericidas.

2.1.3 Inhibidores de la síntesis proteica

Éste es uno de los procesos más afectados frecuentemente por los antibióticos, y su inhibición se debe a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S) que contienen ARN ribosómico. En esta estructura pueden ser lugares de unión

para los antibióticos. La síntesis proteica se desarrolla en diferentes fases: de inhibidores de activación, inicio, de fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma e inhibidores de elongación.

2.1.4 Antibióticos que actúan en el metabolismo o estructuras de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene la información para la síntesis de proteínas a través del ARN mensajero a partir del ADN, y para la síntesis del ARN ribosómico. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. La inhibición de estos procesos son realizados por las rifamicinas y las quinolonas, que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN (por lo que se consideran bactericidas rápidos).

2.1.5 Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos

Para la síntesis de los aminoácidos o las bases púricas y pirimídicas de los nucleótidos, se requiere la síntesis de folatos, que algunas bacterias son incapaces de obtener del medio. La síntesis de ácido tetrahidrofólico se obtiene a partir de una molécula depteridina y de ácido *para*-aminobenzoico (PABA), y mediante la enzima dihidropteroatosintetasa se forma el ácido dihidropteroico. Por la adición del ácido glutámico se forma el ácido dihidrofolico (ácido fólico), que reducido por la dihidrofolato reductasa forma el ácido tetrahidrofólico (ácido folínico). Entre los antibióticos que inhiben estas vías metabólicas se encuentran las sulfamidas y diaminopirimidas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

La aparición de la penicilina; fue seguido por la aparición de la resistencia bacteriana en tan solo unos pocos años. Es claro que estamos en una carrera para desarrollar nuevos antimicrobianos para completar nuestro arsenal y combatir la creciente aparición de cepas resistentes a los antibióticos (Clatworthy *et al.*, 2007) (Fig. 1). Actualmente esta carrera armamentista se está perdiendo pues la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas calcula que el 70% de las infecciones adquiridas en los hospitales en los Estados Unidos son resistentes a uno o más antibióticos.

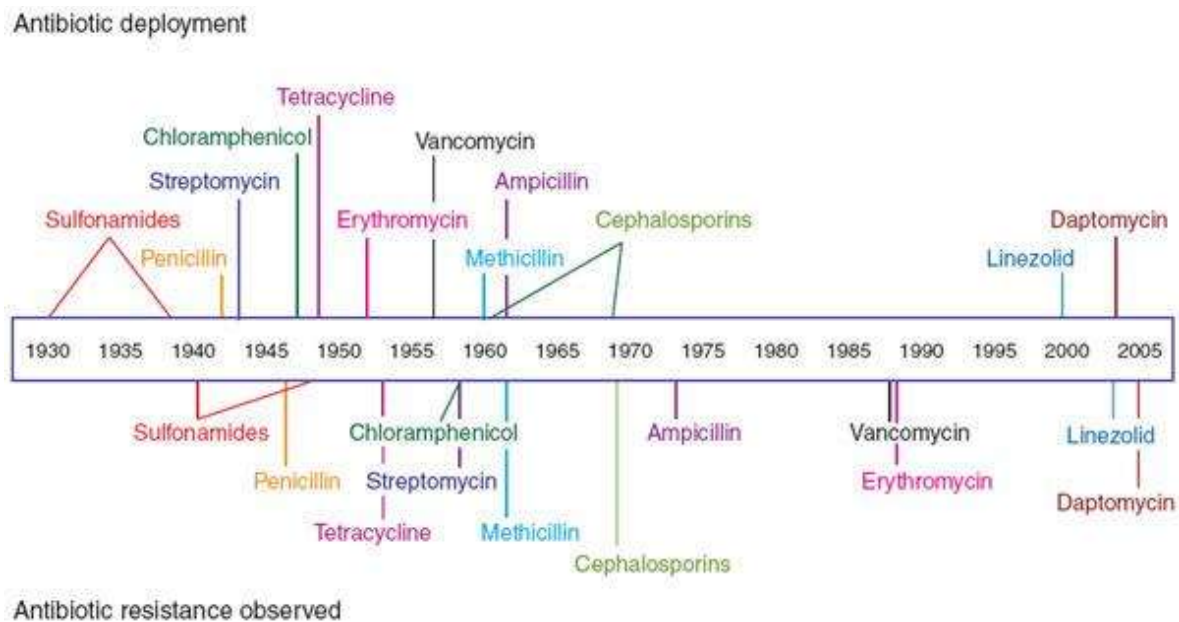


Fig. 1 Resistencia a antibióticos.
Tomado de (Clatworthy *et al.*, 2007)

2.2. INHIBICIÓN DE LA Resistencia bacteriana

Desde el punto de vista molecular y bioquímico (Fig. 2) existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico:

- Inactivación del antibiótico.
- Alteración del sitio blanco del antibiótico.
- Barreras de permeabilidad en el que destaca las bombas de eflujo.

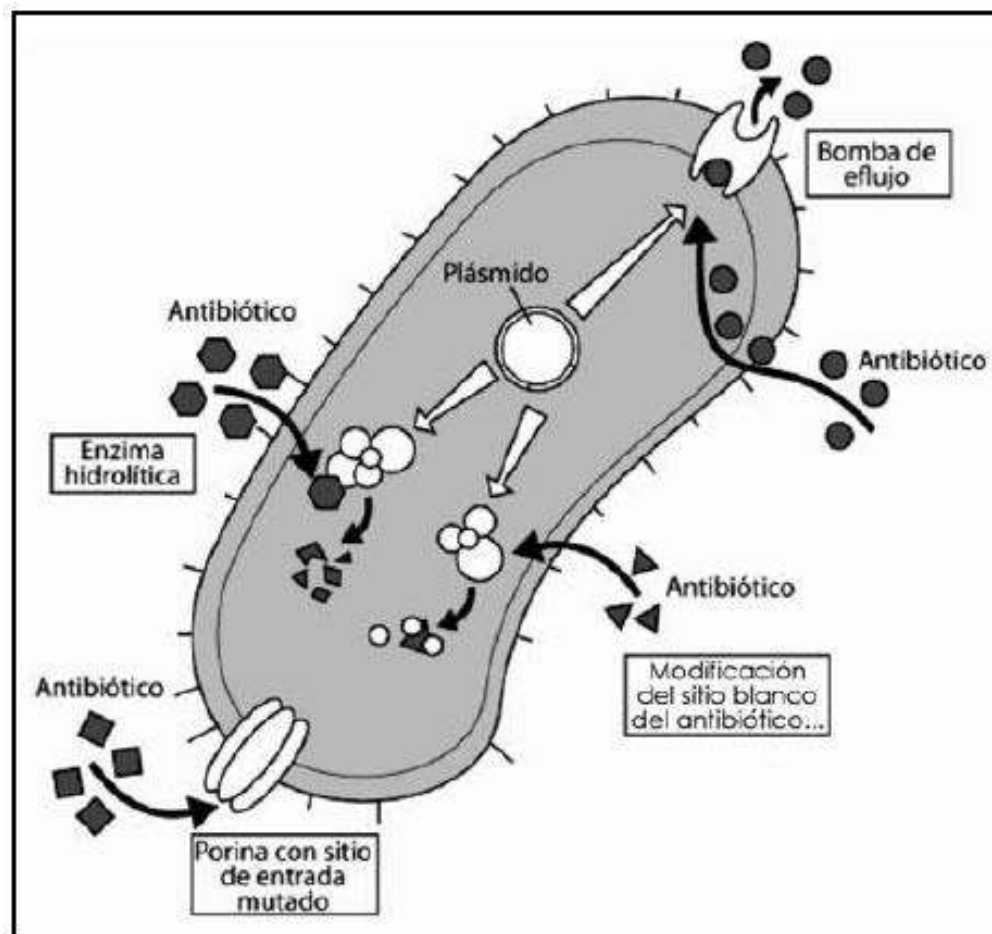


Fig. 2. Mecanismos de Resistencia, (Moreno-M *et al.*, 2009)

2.2.1. Destrucción e inactivación del antibiótico por la producción de enzimas

Este mecanismo de resistencia se debe a la producción de enzimas que hidrolizan al antibiótico. Las β -lactamasas son las más interesantes ya que son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de la familia de la penicilina. Las bacterias Gram negativas poseen este mecanismo de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar en el cromosoma bacteriano o en los plásmidos, lo que permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias (Tafur *et al.*, 2008).

Son ejemplos de bacterias resistentes las que producen β -lactamasa, β -lactamasa de amplio espectro, eritromicina estereasa y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cloramfenicol, lincosamidas y estreptograminas.

Los antibióticos, β -lactámicos como penicilina, oxacilina, cefalosporinas, actúan inhibiendo la enzima D-alanin-carboxipeptidasa (PBPS) que se encarga de la síntesis de la pared. Se trata de un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia frecuentemente producida por bacterias Gram negativas. Para las cuales se han clasificado, siendo la más aceptada la de Bush.

Los plásmidos se difunden ampliamente por lo que es importante señalar las enzimas responsables de este mecanismo:

- Enzimas de amplio espectro que hidrolizan las bencilpenicilinas y cefaloridina.
- Oxacilinasas que degradan oxacilinas y similares (OXA-1, OXA-2) la tipo A producida por *Staphylococcus aureus*, enterobacterias (TEM-1, SMV-1) éstas últimas (*E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* respectivamente) de suma importancia ya que codifican la β -lactamasa de amplio espectro capaz de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos.
- Carbecilinasas que hidrolizan penicilina.
- β -lactamasas de espectro extendido.

- Oximino- β -lactamasa diferentes a las β -lactamasas de espectro extendido.
- Enzimas que hidrolizan cefamicinas y oximino- β -lactámicos y son resistentes a la inhibición del clavulanato.

- Carbapenemasas

Otro mecanismo de inactivación del antibiótico es la modificación enzimática. Este es el caso de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos codificadas en plásmidos. Entre las principales enzimas responsables de catalizar la modificación, están la acetil transferasa (AAC), fosfatidil transferasa (APH) y adenil transferasa (ANT o AAD). Cuando un aminoglucósido es inactivado ya no puede unirse a la subunidad 30s ribosomal y por lo tanto no pueden interferir en la síntesis de proteínas (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

Los antibióticos macrólidos se caracterizan por poseer un anillo macrocíclico unido a dos azúcares, existen otros dos grupos de antibióticos: lincosamidas y estreptograminas que poseen diferencias estructurales con los macrólidos, pero su mecanismo de acción es similar, por lo que se le llama el grupo MLS (Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas). El mecanismo de acción de este grupo de antibióticos es la unión a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, inhibiendo la síntesis de proteínas (Portillo *et al.*, 2000). La producción de eritromicina esterasas, cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Se han descrito Esterasa I y II confinadas a Gram negativos (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

La modificación del cloranfenicol la realiza una enzima intracelular, cloranfenicol acetil transferasa (CAT), existente tanto en Gram positivos como en Gram negativos. Esta enzima acetila los dos grupos hidroxilo y previene la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

2.2.2. Barreras de permeabilidad

Incluye tres componentes básicos:

- La estructura de la membrana externa de la bacteria.
- Las porinas canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por tamaño molecular.
- Características fisicoquímicas del antimicrobiano. En el caso de los medicamentos hidrofílicos (imipenem) requieren presencia de porinas para su transporte al interior de la célula.

Existen fundamentalmente dos mecanismos de resistencia:

1. Entrada disminuida:

- Permeabilidad de la membrana externa: está definida en las bacterias Gram negativos que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antibiótico.
- Permeabilidad de la membrana interna: este mecanismo consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos.
- Porinas: son canales de difusión que se encuentran en la membrana externa de la bacteria. La modificación por mutación de estas proteínas se genera una disminución del paso del antibiótico. Éste es el mecanismo empleado por *Salmonella typhimurium* (OmpC) contra cefalosporinas de primera generación, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* contra aminoglucósidos y carbapenem (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

2. Bombas de eflujo

El principal objetivo de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias nocivas para la célula. Se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas, que bien podrían ser metabolitos, antibióticos o agentes tóxicos para la existencia de la bacteria. Para este mecanismo utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra transporte iónico como sustrato energético (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

Las bombas de eflujo pueden ser específica para un agente antimicrobiano (codificadas en plásmidos y, por tanto, transmisibles) o inespecíficas (expresadas en el cromosoma bacteriano). Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica, puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos empleándose un solo mecanismo. Las bombas de eflujo, el cierre de porinas, las mutaciones en los sitios de acción y las enzimas hidrolíticas trabajan conjuntamente para defender la bacteria de la muerte a causa del antimicrobiano (Tafur *et al.*, 2008).

Las bombas de eflujo confieren resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol y β -lactámicos, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

2.2.3. Alteración del sitio blanco

Otro mecanismo de resistencia es el cambio de estructura terciaria del sitio donde los antibióticos ejercen su acción. Estos sitios se pueden encontrar en diferentes puntos de la bacteria que involucran actividades celulares vitales. Como lo son: las proteínas unidoras de penicilasas que son las responsables de la transpeptidación, las proteínas unidoras de penicilinas (Tafur *et al.*, 2008).

En este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc.

La modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares, conferirán resistencia a los β -lactámicos ya que es esta enzima su sitio de acción.

Otro mecanismo de resistencia es el meticilino que se debe por la producción de una proteína ligadora de penicilina (PBP), la resistencia a penicilina por *Streptococcus pneumoniae*, la resistencia a glicopéptidos por *Staphylococcus aureus* (Sussmann-Otto *et al.*, 2002).

2.3. Prospección de inhibidores de resistencia bacteriana de origen vegetal

El uso inadecuado de antibióticos representa un riesgo para la salud, ya que esto ha contribuido a la resistencia bacteriana y por lo tanto incrementan los gastos médicos y la mortalidad por enfermedades infecciosas (Dreser *et al.*, 2008). Por ejemplo, en el año de 1980, la resistencia a múltiples fármacos surgió como un importante desafío terapéutico. La propagación de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, enterococos resistentes a los glucopéptidos y los neumococos resistentes a la penicilina y a los macrólidos, y la aparición reciente de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* a la vancomicina (Cornaglia & Rossolini, 2009).

Una estrategia metodológica que ha demostrado resultados positivos para atacar este problema es la búsqueda de plantas que si resultan fuente de nuevos antibióticos o compuestos de inhibidores de resistencia bacteriana a antibióticos, (Clatworthy *et al.*, 2007). Los aceites esenciales de la familia Verbenaceae, se han investigado por su composición química y su actividad antibacteriana. Como los aceites esenciales de *Aloysia virgata*, *Lantana camara*, *Lantana trifolia*, *Lantana montevidensis*, *Lippia brasiliensis* y *Lippia sericea* se caracterizaron por su alto contenido de sesquiterpenos como β -cariofileno, germacreno y biciclogermacreno que tienen actividad antimicrobiana, como ocurre con el aceite esencial de *A. virgata* que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Sousa *et al.*, 2011).

Además, el aceite esencial de la parte aérea de la planta *Lantana achyranthifolia* Desf fue analizado GC-MS; identificando como compuestos mayoritarios al carvacrol, 1,8-cineol, isocariofileno, β -bisaboleno y α -bisabolol, demostrando su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas (Hernández *et al.*, 2005).

Asimismo, en el aceite esencial de *Lippia graveolens* H.B. K (Verbenaceae) se identificaron el carvacol, α -terpenil acetato, *m*-cimeno, timol y β -pineno como compuestos mayoritarios, demostrando también que tiene actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* y *Sarcina lutea*) y Gram positivas (*Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* No-01, *Vibrio cholerae* (aislado clínico). Por estas características, se ha recomendado a *Lippia graveolens* como un medicamento popular en contra de patógenos causantes de enfermedades respiratorias y gastrointestinales. (Hernández *et al.*, 2009).

Otro ejemplo de investigación es la familia Lamiaceae, de la que diversas especies han sido estudiadas, como es el aceite esencial de *Salvia chudaei*, cuyos compuestos mayoritarios fueron el bornil acetato, B-eudesmol, β -cariofileno, α -pineno y γ -cadineno, los que tienen actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Listeria monocitogenes*; incluso tienen actividad antimicótica en contra de *Candida albicans* (Krimat *et al.*, 2015).

Otras plantas de la familia Lamiaceae han sido analizadas para determinar el efecto contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, los aceites esenciales de 14 plantas diferentes, entre las cuales se encontraban el *Origanum vulgare*, *Thymbra spicata*, *Origanum onites* y *Origanum minutiflorum*, presentaron el mayor efecto inhibitorio en contra de ambos tipos de bacterias, y este efecto, se debe a la composición química del aceite esencial, identificando 64 compuestos a diferentes concentraciones. (Evrendilek, 2015).

La familia Asteraceae también ha sido ampliamente investigada: en la composición química del aceite esencial *Anaphalis lacteal* se encontraron 31 compuestos químicos (flavonoides, triterpenoides y esteroides). Se realizaron ensayos antimicrobianos con cepas Gram positivas y Gram negativas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium* y *Fusarium oxysporum*). Se demostró que el aceite esencial de *A. lacteal* tiene un efecto antimicrobiano, antimicótico, así como su alta capacidad antioxidante (Liu *et al.*, 2015).

En la familia Rutaceae destacan los estudios de *Ruta graveolens* L. ya que su aceite esencial se identificaron como compuestos mayoritarios a 2-nonanona, 2-undecanona, octil acetato, observando que éste inhibió bacterias tanto Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* y *micrococcus luteus*) como Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes*) demostrando que tiene propiedades antibióticas de amplio espectro (França Orlanda & Nascimento, 2015).

Algunas especies de la familia Boraginaceae son muy utilizadas en la medicina tradicional mexicana como lo es *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer y Schultes la que se utiliza para tratar enfermedades gastrointestinales, respiratorias y trastornos dermatológicos (Hernández *et al.*, 2007). Los extractos y el aceite esencial de esta planta mostraron actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y cinco cepas de hongos. *Sarcina lutea* y *Vibrio cholerae* fueron las cepas más sensibles al efecto del aceite esencial. Se identificaron un total de 11 componentes que representan 96.28% del aceite esencial: 4-metil, 4-etenil-3-(etenilo 1-metil)-1-(metanol 1-metil) ciclohexano, β -eudesmol, espatulenol y cadina 4 (5), 10 (14) dieno, resultaron ser los principales componentes (Hernández *et al.*, 2007).

Las infusiones de la parte aérea de *Viguiera dentata* (Cav.) Sprenguel (Asteraceae) se utilizan para el tratamiento de la erupción del bebé por los habitantes de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, México. Se examinaron las actividades antibacterianas y antifúngicas a través del método de difusión en disco. El aceite esencial de partes aéreas de *V. dentata* fue examinado por GC-MS: está constituido principalmente por monoterpenos, de estos los componentes principales son 1,3,3-trimetil-triciclo [2.2.1.0^{2,6}] heptano y limoneno. Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas fueron sensibles al aceite esencial (Canales *et al.*, 2008).

2.4 Inhibición de resistencia bacteriana

Existen reportes que demuestran que los aceites esenciales de las plantas tienen inhibidores de resistencia bacteriana. Tal es el caso del aceite esencial de *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae) está compuesto por sesquiterpenos hidrocarbonados, entre los más representativos se encuentra el β -cariofileno y biciclogermacreno. Se evaluó su actividad antimicrobiana y además se combinó con antibióticos glicósidos y se observó que tenía un efecto modulador que aumentó la actividad del antibiótico (amikacina) en contra de la bacteria de *Staphylococcus aureus* reduciendo tres concentraciones menos con respecto a la concentración mínima inhibitoria CIM. Con *Escherichia coli* hubo una reducción de dos concentraciones menos al utilizar neomicin (de Aguiar *et al.*, 2015).

Además, en un ensayo antimicrobiano y antifúngico con el aceite esencial de 12 plantas medicinales de las Islas Mauricio, se observó la capacidad de potenciar el efecto antimicrobiano de antibióticos convencionales. En cuanto a la composición química de los aceites se identificaron 43 compuestos diferentes, de los cuales había monoterpenos oxigenados y compuestos aromáticos en diferentes concentraciones. Se observó inhibición bacteriana con los diferentes aceites utilizados, así como su efecto antifúngico. Un efecto sinérgico se presentó en *Pimenta dioica*, *Psiadia arguta* y *Piper betel* observado frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* cuando se combina con gentamicina (Aumeeruddy-Elalfi *et al.*, 2015).

Un estudio del aceite esencial de *Elletaria cardamomum* L. al combinarse con antibióticos a los que la bacteria anuló como lo fue con metilicina para *Staphylococcus aureus*. La interacción del aceite esencial con los antibióticos se evaluó por el método de tablero de ajedrez en donde hay pocillos que forman un tablero donde hay múltiples diluciones de los antibióticos en concentraciones superiores e inferiores a la CMI de cada uno de ellos frente a la bacteria a estudiar. El aceite esencial se analizó por (CG-EM) y cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID). Los compuestos que se identificaron fueron el α -terpinilo (40%) y 1,8-cineol (31%). Se demostró que la combinación del aceite más los antibióticos tuvieron un efecto de adición con cardamomo aceite esencial-ciprofloxacina, 1,8-cineol-amoxicilina y 1,8-

cineol–ciprofloxacina, así como otras combinaciones resultaron tener un efecto antagónico (Gradinaru *et al.*, 2014).

2.5. Metabolitos secundarios de malezas

Existen una gran variedad de plantas que se encuentra entre los cultivos, orillas de caminos y áreas perturbadas y que se les conoce comúnmente como malezas o plantas indeseables (Espinosa y Sarukhán, 1997). Pero se ha demostrado que estas plantas contienen un gran número de metabolitos secundarios que actúan en la defensa vegetal (Pérez-Urria & Ávalos-García, 2009).

La mayoría de estos compuestos pertenecen a cuatro grupos: los terpenos que constituyen el grupo más numeroso con más de 40,000 moléculas diferentes, los compuestos fenólicos, un grupo muy diverso que comprenden moléculas muy sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como lo son los taninos y las ligninas, a este grupo pertenecen las antocianinas y flavonoides, muchas de estas moléculas están implicadas en la interacción planta-herbívoro; los glucósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, su nombre hace referencia al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo, existen tres grupos de glucósidos (saponinas, glucósidos cardiacos y glucósidos cianogénicos); y el cuarto grupo son los alcaloides, que son un grupo de más de 15,000 metabolitos secundarios que contienen tres características en común, son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica (Anaya-Lang & Espinosa-García, 2006).

Desde hace más de dos décadas se ha documentado la influencia que ejercen los volátiles sobre numerosas interacciones bióticas, en funciones fisiológicas y ecológicas como interacción planta-animal (Céspedes-L & Loaiza-Marín, 2007).

Por lo que utilizamos cuatro plantas, *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* y *Reseda luteola*, y extrajimos su aceite esencial y se probó su actividad antibacteriana. Obtuvimos los aceites esenciales mediante un sistema de destilación, a partir de las partes aéreas de las plantas, en el caso de *R. luteola* también se utilizó la raíz. Por lo que nos planteamos la siguiente pregunta y la hipótesis.

3. PREGUNTA

¿Los aceites esenciales de malezas *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* y *Reseda luteola* contienen inhibidores de resistencia bacteriana?

4. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de las plantas contienen metabolitos secundarios que inhiben las enzimas o proteínas de eflujo que habilitan la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales.

5. PREDICCIÓN

Al combinar los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* con antibióticos a los que la bacteria es resistente, los aceites esenciales anularán sus mecanismos de resistencia y habrá inhibición del crecimiento bacteriano.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Realizar la búsqueda preliminar de los aceites esenciales de *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* y *Reseda luteola* sobre la resistencia bacteriana a antibióticos comerciales.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Cosmos bipinnatus*, *Tagetes erecta*, *Tagetes lucida* y *Reseda luteola* solos y en combinación con antibióticos comerciales a los que la bacteria muestra resistencia.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales en bacterias patógenas de humanos.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales en bacterias patógenas de humanos.

7. SISTEMA DE ESTUDIO

7.1 Descripción botánico de malezas



Fig. 3 *Cosmos bipinnatus*
commons.wikimedia.org

***Cosmos bipinnatus* Cav.**

Hierba anual, erecta, poco ramificada, casi glabra que puede llegar a medir de 20 cm a 2 m de alto; hojas de 3 a 11 cm de largo; flores liguladas generalmente 8, de color rosa, lila, violeta o blanco hasta 3 cm de longitud y 1.8 cm de ancho, conocida como mirasol o girasol morado (G. & Rzdowski, 2005) (Fig. 3). De la familia Asteraceae, florece de septiembre a noviembre. Esta planta atractiva es muy familiar en los campos y a lo largo de las carreteras a finales del año. Nativa del sur de los Estados Unidos hasta el centro de México. Se cultiva comúnmente en diversas formas de color en

muchas partes del mundo (Rodríguez *et al.*, 2006) .

La planta de *C. bipinnatus* ha sido utilizada en la herbolaria como remedio tradicional para diversas enfermedades como ictericia, fiebre intermitente, y esplenomegalia. Y se ha demostrado que las flores tienen actividad antioxidante y un efecto antígenotóxico (Olajuyigbe & Ashafa, 2014).



Fig. 4 *Tagetes erecta*
www.plantelia.com

***Tagetes erecta* L.**

Planta anual, erecta, hasta 1.8 m de alto, muy aromáticas; tallos estriados, glabros; hojas de hasta 20 cm de largo, pinnadas; cabezuelas solitarias o agrupadas por varias; flores liguladas de 5 a 8 que van de amarillas a rojas. Tiene usos medicinales y alimento para aves (G. & Rzdowski, 2005) (fig. 4).

T. erecta es una planta originaria de México. Se le dio el nombre de “cempoalxóchitl” (flor de las cuatrocientas vidas) y fue empleada en diversas ceremonias religiosas. También se le conoce como cempaxuchilt, flor de muerto y en la península de Yucatán se le llama x`pujuc (Del Villar-Martinez *et al.*, 2007).

T. erecta es una planta herbácea anual, erecta y muy aromática, de tallos estriados y hojas pinadas, cuya flor es una cabezuela solitaria como capítulo, que a su vez tiene numerosas flores individuales de los tipos tubulado o ligulado. Presentan colores que varían de amarillo débil al anaranjado intenso (Fig. 4). Esta gama de colores se debe a la presencia de diversos carotenoides, de los cuales el principal es la luteína (Del Villar-Martinez *et al.*, 2007).

Existen estudios que demuestran que algunos de los carotenoides contenidos en la planta han sido utilizados para diversas enfermedades de los ojos asociadas con la edad como lo son las cataratas y la degeneración muscular. En la industria se han utilizado sus pigmentos, como aditivos para la elaboración de alimento para aves, peces y crustáceos, así como para el consumo humano; ya que contienen nutrimentos que pueden actuar como anticancerígenos y antioxidantes en el ser humano (Del Villar-Martinez *et al.*, 2007).

De manera terapéutica *T. erecta* se ha utilizado como remedio herbal para el dolor de estómago, para eliminar los parásitos intestinales, para enfermedades respiratorias como tos, fiebre, gripe y bronquitis, entre otros usos. Se ha comprobado

científicamente que *T. erecta* tiene acción antibiótica y funguicida, pues se ha utilizado para infecciones causadas por hongos (Garza Gómez *et al.*, 2005).



Fig. 5 *Tagetes lucida*
www.conabio.gob.mx

***Tagetes lucida* Cav.**

Planta herbácea perenne, erecta, hasta 80 cm de alto, con olor de anís; tallos generalmente varios, partiendo desde la base, más o menos ramificados, glabros; hojas de 2 a 10cm de largo; flores liguladas 3 o 4, amarillas (G. & Rzdowski, 2005) (fig. 5).

T. lucida es una planta herbácea perenne común de la familia Asteraceae, se distribuye ampliamente en bosques de encino y pino mixto, en las laderas abiertas, en la región del altiplano mexicano, en América Central, pero también se ha introducido en África occidental, India y la Península Ibérica.

También conocida como flor de Santa María, hierba añil, naná uarhi, pericón, periquillo, Santa María, yerbanís esta especie es utilizada como insecticida y como planta ornamental (Mendez-Rodriguez, 2015) (Lim, 2014). Estudios realizados han demostrado que presenta efecto bactericida contra agentes causantes de infecciones respiratorias (Visbal *et al.*, 2010). Se ha determinado actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella sp*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y acción antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* y *Fusarium moniliforme*. Se han encontrado ciertos metabolitos, como son los flavonoides, cumarinas y terpenos en extractos crudos de la planta (Visbal *et al.*, 2010).



Fig. 6 *Reseda luteola*

***Reseda luteola* L.**

Hierba anual o bianual, más bien glabra, erecta, de 40 a 80 cm de alto; tallo simple o ramificado, hoja lineares o lanceoladas, de 2 a 12 cm de largo por sobre pedicelos cortos; flores de color amarillento; semillas globoso-reniformes, oscuras, lisas, brillantes, de 1 mm de largo (G. & Rzdowski, 2005) (Fig. 6).

Crece en los bordes de caminos y campos, en escombreras, cultivos, en zonas de sustrato arenoso, desde el nivel del mar a los 1700 m de altitud.

Aparece en Europa, el norte de África y al oeste de Asia. En la Península Ibérica está dispersa por la mayor parte del territorio (Angelini *et al.*, 2003).

Se utiliza en la industria textil por su fuente de pigmentos amarillos; la luteína, el más importante, se utiliza para teñir lana y seda (Angelini *et al.*, 2003).

7.2 Bacterias usadas en el bioensayo

Se utilizaron las cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas con diferentes grados de resistencia bacteriana, donadas por el Hospital Infantil de Morelia (HIM) y por la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, UNAM (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en los bioensayos de actividad antimicrobiana

Bacteria	Etiqueta	Tinción Gram	Resistencia
<i>Staphylococcus aureus</i> II	HIM	+	P(10)
<i>Staphylococcus aureus</i> III	HIM	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 13	FES	+	NA(30)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 14	FES	+	VA(30), FEP(30)
<i>Escherichia coli</i> 1249 2MR	HIM	-	NA(30), P(10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IV	HIM	-	VA(30)
<i>Proteus mirabilis</i> 12	FES	-	CC(2)
<i>Salmonella</i> sp HI(2) 15	FES	-	NA(30), CB(100)
<i>Vibrio cholerae</i> Tor 8	FES	-	NA(30)

P(10) penicilina, NA(30) ácido nalidíxico, VA(30) vancomicina, FEP(30) cefepime, CC(2) clindamicina, CB(100) carbencilina.

A las cepas utilizadas se les realizó un antibiograma para comprobar la resistencia al antibiótico y poder hacer el ensayo de resistencia bacteriana (Fig. 7).

Fig. 7 Antibiograma de *Klebsiella pneumoniae* 2HIM y *Salmonella* sp 1HIM.

7.3 Colecta del material vegetal

Cosmos bipinnatus se colectó en el mes de septiembre del 2014, en el municipio de Tarímbaro, Michoacán (19°46'03.7"N 101 ° 12' 24.2"W), aproximadamente 12 Kilogramos de planta fresca con raíz, tallo y flor, que se guardaron en bolsas de plástico que fueron llevadas al laboratorio para la extracción de su aceite esencial. Obtuvimos un total de 75mL de aceite esencial. Se preparó un ejemplar que se depositó en el herbario de la UMSNH y el número de registro está pendiente.

Tagetes erecta se compró en el mes de octubre del 2011 en el mercado de San Juan en Morelia Michoacán. La planta fresca (con tallo y flor) fue llevada al laboratorio para la extracción del aceite esencial. Se compró aproximadamente 15 Kg de planta y obtuvimos 50mL de mezcla que se concentró para eliminar el exceso de hexano obteniendo 10mL de aceite esencial. Se preparó un ejemplar que se depositó en el herbario de la UMSNH y el número de registro está pendiente.

Tagetes lucida fue colectada en el mes de octubre del 2013 en la carretera federal Pátzcuaro-Morelia en el kilómetro 22, en el estado de Michoacán. La planta se colectó fresca (con tallo y flor) y fue llevada al laboratorio para la extracción del aceite. Se colectó cerca de 12 Kg de planta y obtuvimos un total de 35.4mL de aceite. Se preparó un ejemplar que se depositó en el herbario de la UMSNH y el número de registro está pendiente.

Reseda luteola se recolectó el 10 de Febrero del 2015 en la carretera federal Pátzcuaro-Morelia en el estado de Michoacán (19 °32'12.7"N 101 °32' 05.7"O). Se colectaron aproximadamente 13 Kilogramos de planta fresca (con raíz, tallo y flor) que fueron llevadas al laboratorio para la extracción del aceite esencial obteniéndose 40mL (Fig. 7). Se preparó un ejemplar que se depositó en el herbario de la UMSNH y el número de registro está pendiente.

7.4 Extracción de los aceites esenciales

La extracción del aceite esencial de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola*; fue realizado por arrastre de vapor de agua en una autoclave marca Paragon modificada (Fig. 7). Esta técnica permite separar sustancias orgánicas insolubles en agua y solubles en solventes no polares. Utilizamos aproximadamente 3 kg de planta cortada con tijeras en trozos pequeños que se depositaron en el interior de la autoclave y se expusieron a los vapores de agua a una temperatura de 120°C, en un sistema abierto durante 2 horas. Se adaptó la autoclave en una de las válvulas de escape, se le adaptó un tubo de acero inoxidable en forma de bastón que estaba conectado a dos refrigerantes y estos a su vez a un embudo de separación con 20ml de hexano (Pimienta-Ramírez *et al.*, 2016)). Los compuestos no polares de la planta quedaron disueltos en 20ml de hexano, de tal forma que se obtuvieron entre 20 y 22 ml de aceite esencial por cada 3 kg de planta (Fig. 8).



Fig. 8 Destilación por arrastre de vapor en sistema abierto

7.5 Análisis químico de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* fueron analizados en un cromatógrafo de gases (HP Agilent 6890) acoplado a un detector selectivo de masas (HP MS 5973N). Se inyectaron 0.5 μ L del aceite esencial, usando una inyección con división de flujo (60:1) a una temperatura de 220 °C, con helio como gas acarreador con un flujo en columna de 1 mL/min, en una columna no polar ULTRA 2 Agilent (25 m x 0.2 mm x 0.33 μ m). El programa de la temperatura en el horno inició a 60°C por 5 minutos, aumentó a 5 °C/min hasta llegar a 200 °C y finalmente se aumentó a 25 °C/min hasta llegar a 300 °C. Las condiciones usadas en el detector selectivo de masas fueron: voltaje de ionización a 69.9 eV, temperatura de la interface a 280 °C, modo SCAN y un rango de masas de 30-550 m/z. La señal del detector fue procesada en el programa Enviromental ChemStation (Agilent Technologies), el cual permite la identificación automática de los compuestos analizados con los de la Biblioteca Nacional Institute of Standards and Technology (NIST05). Se aceptó únicamente la identificación de aquellos espectros que concordaban por arriba del 90% y cuya pureza de pico era de 1, es decir, compuestos puros. Se calcularon los Índices Kovats inyectando 1.0 μ l 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 (Fig. 8). Estos Índices Kovats (Tabla 4,5,6 y 7) se compararon con los reportados en la literatura (Adams, 2007).

La cuantificación de los compuestos fue hecha por el método de área bajo la curva; se sumaron todas las áreas de los componentes y se calculó el porcentaje de cada uno de los compuestos.



Fig. 9 Inyección de aceites esenciales en el cromatógrafo de gases HP Agilent 6890

Los aceites esenciales de *C. bippinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* fueron concentradas bajo una corriente suave de N_2 para disminuir la proporción de hexano. Posteriormente se inyectó en el cromatógrafo de gases conectado al detector de ionización de flama (FID) y se determinó el porcentaje de hexano en cada aceite: 5.30%, 0.47%, 12.94% y 7.4% para *C. bippinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* respectivamente; quedando un total de aceite de 11 mL, 10 mL, 7 mL y 2.5 mL.

7.6 Bioensayos preliminares de bioprospección de inhibición de resistencia a antibióticos

Se usó la prueba de Kirby-Bauer para probar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales *C. bippinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* y su inhibición de la resistencia bacteriana. Esta prueba se basa en la difusión en agar utilizando discos de papel seco impregnados de aceite a diferentes concentraciones (Hudzicki, 2009). Se seleccionaron varias colonias de la bacteria a probar, se preparó una suspensión del inóculo y se ajustó la turbidez comparándola con el estándar de McFarlan ($1-2(10)^8$ CFU/ml). Posteriormente se inoculó la placa y se emplearon discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con 5 μ l de aceite esencial y se colocaron en la placa inoculada. Se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h.

7.7 Diseño experimental

Como control positivo se usaron discos de antibióticos comerciales (Tabla 2) a los que la bacteria es susceptible y el control negativo se preparó con hexano que es donde está disuelto nuestro aceite esencial (Fig. 11).

Tabla 2. Concentración de los antibióticos y de los aceites esenciales usados en bioensayos.

Antibiótico	Símbolo	Concentración (µg)
Carbenicilina	CB(100)	100
Cefepime	FEP(30)	30
Cloramfenicol	C(30)	30
Clindamicina	CC(2)	2
Imipenem	IPM(10)	10
Ácido Nalidíxico	NA(30)	30
Penicilina	P(10)	10
Vancomicina	VA(30)	30
<i>C. bippinatus</i> 5µl	C.b	2,962.5
<i>T. erecta</i> 5µl	T.e	4,800
<i>T. lucida</i> 5µl	T.l	4,850
<i>R. luteola</i> 5µl	R.l	8,350

Resultados Interesantes

Tratamientos	Posibles Resultados Interesantes
•Blanco T1 •Control (-) T2 •Control (+) T3 •Antibiótico anulado T4 •Aceite esencial T5 •Antibiótico anulado + aceite esencial T6 •Control (+) + Aceite esencial T7	T5 = 0 y T4 = 0 T5 + T4 = Inhibición Inhibición de enzima de resistencia o proteína de eflujo.
	T5 = Inhibición y T4 = 0 T5 + T4 = Inhibición igual a T5 Aceite esencial con actividad antibiótica
	T5 = Inhibición y T4 = 0 T5 + T4 = Inhibición > T5 solo Aceite esencial con actividad antibiótica e inhibidora de la resistencia

Fig. 10 Diseño experimental: tratamientos de bioprospección y posibles resultados.

Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos utilizados en el bioensayo (Fig. 11).

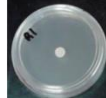
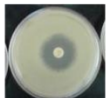
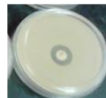
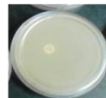
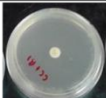
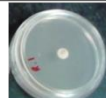
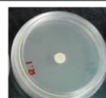
<i>Staphylococcus aureus</i> FES con el AE <i>Reseda luteola</i>				
				
a T1 0mm	b T2 0mm	c T3 37.6mm		
				
d T4 18.3	e T5 15.0	f T6 0		
				
g T3+T4 43.6	h T3+T5 50.0	i T3+T6 45.0		
AE de <i>R. luteola</i> con actividad antibiótica e inhibidores de resistencia				

Fig. 11 Bioensayo cualitativo para *Staphylococcus aureus* FES con AE *Reseda luteola*. (a) blanco, (b) control negativo, (c) aceite esencial *R. luteola*, (d) clindamicina 2 µg, (e)

vancomicina 30 µg, (f) cefepine 30 µg, (g) CC + AE *R. luteola*, (h) VA + AE *R. luteola*, (i) FEP + AE *R. luteola*.

7.8 Bioensayo para encontrar la CMI y la CBM

La estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se realizaron por el método de dilución en caldo. La CIM es la cantidad de aceite necesaria para observar un descenso importante en el crecimiento bacteriano después de 24 h. de incubación a 37 °C. La CMB es la cantidad de aceite que inhibe totalmente el crecimiento bacteriano en 24 h. a 37° C ± 2 °C.

Se preparó una suspensión del inóculo, seleccionando 3-5 colonias aisladas para la prueba, tomándolas con un hisopo estéril y se transfirieron en 10 ml de caldo Müller-Hinton. Se dejaron incubar a 37 °C ± 2 °C durante 24 h. Y posteriormente esta suspensión se estandarizó a 0.5 en la escala de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/ml). Se tomaron 10 µl de esta suspensión y se agregaron a un tubo con 10ml de solución salina al 0.08% (1×10^6 CFU). Se agitó vigorosamente en el vortex y se tomaron 100 µl de esta solución y se transfirieron a un tubo Eppendorf de capacidad 0.6 ml.

A su vez el aceite esencial a probar se diluyó en caldo Müller-Hinton, para obtener diez tratamientos con concentraciones que van de 2.0-0.01 mg/ml (Tabla 3). Estos tratamientos se prepararon para ajustar un volumen final de 3 ml de caldo Müller-Hinton y la cantidad necesaria de cada tratamiento para todas las diluciones (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones del aceite esencial del ensayo cuantitativo (CMI y CMB)

Tratamiento	Concentración mg/ml	Concentración en mg/200ul	Concentración mg/3ml
1	2.0	4.0	12.0
2	1.5	3.0	9.0
3	1.0	2.0	6.0
4	0.75	1.5	4.5
5	0.5	1.0	3.0
6	0.25	0.5	1.5
7	0.125	0.25	0.75
8	0.062	0.124	0.375
9	0.03	0.06	0.18
10	0.01	0.02	0.06
Testigo	0.0	0.0	0.0

Para preparar cada tratamiento, se tomaron en cuenta la densidad del aceite, la cual se calculó pesando cuatro veces 100 µl del aceite esencial. Este peso se promedió y se calculó la densidad, según su fórmula:

$$\rho = \frac{0.0827g}{0.1ml}$$

Una vez preparados los tratamientos y el testigo, se tomaron 100 µl y se mezclaron con 100 µl de la suspensión de bacterias en solución salina, obteniendo un volumen final de 200 µl. Esta mezcla se agitó y se incubó a 37° C ± 2 °C por 24 h.

Después de la incubación, se tomó 50 µl de la suspensión y se inoculó en cajas Petri con tres divisiones, rotuladas previamente con las 10 concentraciones que van de 0.1 a 2 mg/ml, y el testigo que no contiene aceite esencial. En la división marcada con el número “0” se depositaron 50 µl de la suspensión concentrada. Después, se tomaron

50 µl de la suspensión concentrada y se depositaron en un tubo con 5 ml de solución salina 0.08% y se mezclaron; se cambió de punta y se tomaron 50 µl y se depositaron en la división marcada con el número "1" (0.01 µl de la 1er solución). De esta primera dilución se tomaron 50 µl y se depositaron en un tubo con 5 ml de solución salina y se mezclaron; se cambió de punta y se tomaron 50 µl y se depositaron en la división marcada con el número "2" (1×10^{-4} µl de la 1er solución). De esta forma se obtuvieron dos diluciones que se dejaron incubaran a $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

Después de la incubación interpretamos los resultados para determinar la CMI y la CMB, tomando como CMI la concentración en donde observamos un descenso importante en el crecimiento bacteriano y la CMB la concentración en la que se inhibió totalmente el crecimiento bacteriano (Fig. 12).

Para el caso de aceite esencial de *R. luteola* este bioensayo cuantitativo se realizó con el aceite extraído de la segunda colecta del 10 de febrero del 2015; cuya concentración fue de 3,665 µg/ml.



Fig. 12 Biensayo cuantitativo de *Staphylococcus epidermidis* FES con el aceite esencial de *Reseda luteola*.

8. RESULTADOS

8.1 Composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales de *C. bipinnatus* tienen una composición abundante en monoterpenos y fenilpropanoides se encontraron 35 compuestos, cuyos compuestos mayoritarios representaron el 90.78% del total de la mezcla: *EE*-cosmeno, β -*trans*-Ocimeno, sabineno y 1,3,8-*p*-mentatrieno. 89 en *T. erecta*, los mayoritarios representaron el 63.01% de la mezcla total y fueron: *trans*-tagetona, β -*trans*-ocimeno, piperitona y terpinoleno. 94 en *T. lucida*, cuyos mayoritarios representaron el 97.47% del total de la mezcla: metil-eugenol, estragol, β -pineno y β -*cis*-ocimeno. y 104 en *R. luteola*, en donde predominaron el β -fenilpropionitrilo y β -feniletilisotiocianato. En las tablas 4, 5, 6 y 7 solo se muestran los compuestos que en porcentaje superó el 1% de espectro y que su pureza de pico fuera de 1. Los índices kovats teóricos son los reportados por la biblioteca Adams (Adams, 2007).

Tabla 4. Composición química del aceite esencial de *Cosmos bipinnatus* ordenados por su tiempo de retención (TR), índices Kovats experimentales (IK_{exp}) y teóricos (IK_{teo}).

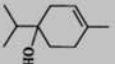
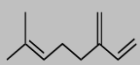
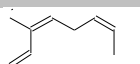
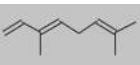
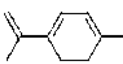
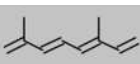
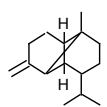
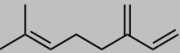
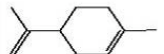
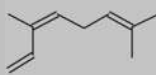
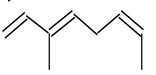
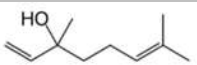
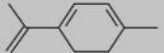
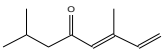
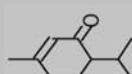
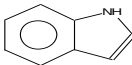
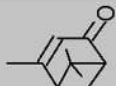
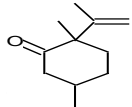
TR	COMPUESTO	ESTRUCTURA	%	IK_{exp}	IK_{teo}
5.67	Sabineno		10.38	975	969
5.76	β -Pineno		2,08	984	974
5.98	β -Mirceno		1.00	993	988
7.05	β -cis-Ocimeno		1,94	1037	1032
7.35	β -trans-Ocimeno		30,80	1050	1044
9.17	1,3,8- <i>p</i> -Mentatrieno		7,53	1123	1112
9.47	<i>E,E</i> -cosmeno		42,49	1135	1132
18.53	β -copaeno		3,79	1488	1430

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de *Tagetes erecta* ordenados por su tiempo de retención (TR), índices Kovats experimentales (IK_{exp}) y teóricos (IK_{teo}).

TR	Biblioteca	Estructura	%	IK_{exp}	IK_{teo}
5.98	β -Mirceno		1,75	991	988
6.88	D-Limoneno		4,96	1030	1029
7.05	β -cis-Ocimeno		6,09	1037	1032
7.31	β -trans-Ocimeno		15,02	1048	1044
8.34	Terpinoleno		9,98	1091	1086
8.57	β -Linalol		1.01	1100	1106
8.93	1,3,8-p-Mentatrieno		0.49	1114	1112
9.71	Trans-Tagetona		23,44	1144	1146
12.72	Piperitona		14,57	1259	1254
13.67	Indol		5,01	1295	1292
14.97	Verbenona		3,24	1345	1204
15.61	Isopulegona, 4-metil		1,31	1370	1306
17.02	Cariofileno		4,41	1426	1417

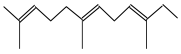
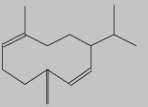
17.83	β - <i>trans</i> - Farneseno		0,67	1459	1454
18.52	Germacreno D		1,12	1487	1480
26.37	3-Eicosino		4,30	1841	1852

Tabla 6. Composición química del aceite esencial de *Tagetes lucida* ordenados por su tiempo de retención (TR), índices Kovats experimentales (IK_{exp}) y teóricos (IK_{teo}).

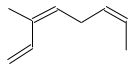
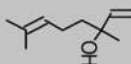
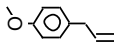
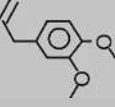
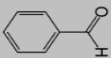
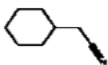
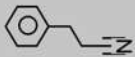
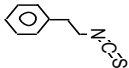
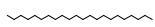
TR	COMPUESTO	ESTRUCTURA	%	IK_{exp}	IK_{teo}
6.03	β -pineno		9,61	994	974
7.33	β - <i>cis</i> -ocimeno		5,80	1049	1032
8.60	β -linalool		2,54	1102	1095
11.34	Estragol		34,47	1207	1195
16.76	Metil-eugenol		47,58	1416	1410

Tabla 7. Composición química del aceite esencial de *Reseda luteola* ordenados por su tiempo de retención (TR), índices Kovats experimentales (IK_{exp}) y teóricos (IK_{teo}), de la primera y segunda colecta.

RT	COMPUESTO	ESTRUCTURA	2014	1ra %	2da %	IK _{exp}	IK _{teo}
5.38	Benzaldehído			-	3.77	960	961
9.60	Bencil-nitrilo			-	1.82	1140	1143
12.29	β-Fenil-propionitrilo			47.49	71.82	1243	1244
18.10	β-fenil,etil-isotiocianato			41.95	13.78	1470	1465
30.19	Fitol			4.40	1.64	2114	2122
31.32	Tricosano			2.19	2.70	2307	2318

8.2 Bioensayos preliminares de bioprospección de inhibición de resistencia a antibióticos

Se realizaron un total de 54 experimentos en los que se probó el aceite esencial solo y la combinación del aceite esencial más el antibiótico con sus respectivas tres repeticiones, de los cuales el 42.6% (I) mostró inhibición bacteriana, el 18% (A) antagonismo y el 38% (E) ningún efecto (Tabla 8).

Tabla. 8 Inhibición bacteriana. Inhibición bacteriana (I), efecto antagónico (A) y sin ningún efecto (E).

Bacteria	Aceite esencial (5µL)	Ácido Nalidixico NA(30)	Carbenicilina CB(100)	Cefepine FEP(30)	Cloranfenicol C(30)	Clindamicina CC(2)	Imipenem IPM(10)	Penicilina P(10)	Vancomicina VA(30)
<i>Staphylococcus aureus</i> IIHIM	<i>T.lucida</i>	I			A	I		I	
	<i>R.luteola</i>				I	I		I	
<i>Staphylococcus aureus</i> IIIHIM	<i>T.lucida</i>	I		I	I				
<i>Staphylococcus aureus</i> FES	<i>C. bippinatus</i>	I				E	E		
	<i>T.lucida</i>	I				E	E		
	<i>R.luteola</i>					I	I		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FES	<i>C. bippinatus</i>			E		E			E
	<i>T.lucida</i>	I		I		I			E
	<i>R.luteola</i>	I		I		I			I
<i>Vibrio cholerae</i> 14	<i>C. bippinatus</i>	I			E	I			I
	<i>T.lucida</i>	I			E	E			A
	<i>R.luteola</i>				I	I			I
<i>Escherichia coli</i> 2MR	<i>T.lucida</i>	I	E		A		I	E	
	<i>R.luteola</i>	I	A		A		I	E	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IVHIM	<i>T. erecta</i>	I			A				E
	<i>T.lucida</i>	I			E				A
	<i>R.luteola</i>	I			E				I
<i>Proteus mirabilis</i> 19	<i>C. bippinatus</i>	I					E		
	<i>R.luteola</i>	I					E		
<i>Salmonella</i> sp HI(2)	<i>C. bippinatus</i>		E	E			E		
	<i>T.lucida</i>	I	E	A			I		

8.3 Efecto de bioprospección de inhibición de resistencia a antibióticos

El aceite esencial de *R. luteola* fue el que mostró interacción al combinarlo con los antibióticos anulados por la bacteria (P(10 µg), FEP(30 µg) y NA(30 µg)), así como con los controles positivos (CC(2 µg), C(30 µg), IPM(10 µg) y VA(30 µg)), inhibiendo la resistencia bacteriana de cinco cepas: dos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *V. cholerae*, y *K. pneumoniae* (Tabla 8). El aceite esencial *T. lucida* inhibió la resistencia bacteriana de *S. epidermidis* y *E. coli* al combinarlo con los controles positivos (CC(2 µg) y IPM(10 µg)); el aceite de *C. bipinatus* inhibió la resistencia bacteriana de *V. cholerae* al combinarlo con CC(2 µg) y el aceite de *T. erecta* solo mostró inhibición bacteriana con *K. pneumoniae* (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de inhibición (mm) de los aceites esenciales con los diferentes tratamientos. Los controles positivos fueron Cloranfenicol (30 µg), Clindamicina (2 µg), Imipenem (10 µg), Cefepime (30 µg).

Bacteria	Aceite esencial (5µL)	Inhibición del aceite (mm)	Control positivo (+)	AE + Control (+)	Antibiótico anulado (-)	AE + antibiótico (-)
<i>Staphylococcus aureus</i> IIHIM	<i>T. lucida</i>	7.3 ± 0.03	CC(2) 24.00 ± 0.00	28.33 ± 0.33	P(10) 11.50 ± 0.40	13.00 ± 0.00
			C(30) 23.00 ± 0.00	<u>20.50 ± 6.17</u>		
	<i>R. luteola</i>	0.00	CC(2) 24.00 ± 0.00	39.30 ± 1.20	P(10) 11.50 ± 0.40	15.00 ± 0.00
			C(30) 23.00 ± 0.00	30.00 ± 0.00		
<i>Staphylococcus aureus</i> IIIHIM	<i>T. lucida</i>	8.0 ± 0.00	FEP(30) 28.0 ± 0.00	27.00 ± 0.00	NPAA	NPAA
			C(30) 23.0 ± 0.00	24.33 ± 0.33		
<i>Staphylococcus aureus</i> FES	<i>C. bippinatus</i>	7.6 ± 0.03	CC(2) 22.66 ± 0.33	23.66 ± 0.33	NPAA	NPAA
			IMP(10) 23.00 ± 0.00	22.00 ± 0.00		
	<i>T. lucida</i>	9.0 ± 0.00	CC(2) 22.66 ± 0.33	23.00 ± 0.00	NPAA	NPAA
			IMP(10) 23.00 ± 0.00	23.00 ± 0.00		
	<i>R. luteola</i>	0.00	CC(2) 22.66 ± 0.33	30.00 ± 1.52	NPAA	NPAA
			IMP (10) 23.00 ± 0.00	35.00 ± 0.00		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FES	<i>C. bippinatus</i>	0	CC (2) 18.33 ± 0.33	18.66 ± 0.33	VA(30) 15.00 ± 0.00	15.00 ± 0.00
					FEP(30) 0.00	0.80 ± 0.00
	<i>T. lucida</i>	9.0 ± 0.00	CC (2) 18.33 ± 0.33	20.33 ± 0.33	VA(30) 15.00 ± 0.00	15.00 ± 0.00
					FEP(30) 0.00	11.00 ± 0.00
	<i>R. luteola</i>	37.66 ± 1.45	CC (2) 18.33 ± 0.33	43.66 ± 0.66	VA(30) 15.00 ± 0.00	50.00 ± 0.00
					FEP(30) 0.00	45.00 ± 0.00
<i>Vibrio cholerae</i> 14	<i>C. bippinatus</i>	8.3 ± 0.33	•CC (2) 26.33 ± 0.33	28.33 ± 0.33	NA(30) 15.33 ± 0.33	21.33 ± 0.33
			C (30) 23.33 ± 0.33	23.00 ± 0.00		
	<i>T. lucida</i>	8.3 ± 0.33	•CC(2) 26.33 ± 0.33	26.33 ± 0.33	NA(30) 15.33 ± 0.33	<u>10.66 ± 0.33</u>
			C(30) 23.33 ± 0.33	23.00 ± 0.00		
	<i>R. luteola</i>	0	•CC(2) 26.33 ± 0.33	55.00 ± 0.00	NA(30) 15.33 ± 0.33	21.00 ± 0.00
			C(30) 23.33 ± 0.33	30.00 ± 0.00		
<i>Escherichia coli</i> 2MR	<i>T. lucida</i>	8.0 ± 0.00	C(30) 19.30 ± 0.66	<u>16.50 ± 0.40</u>	NA(30) 14.00 ± 0.00	14.00 ± 0.00
			IMP(10) 30.70 ± 0.66	33.00 ± 0.00	P(10) 0.00	0
	<i>R. luteola</i>	11.00 ± 0.00	C(30) 19.30 ± 0.66	<u>17.00 ± 0.00</u>	NA(30) 14.00 ± 0.00	<u>0</u>
			IPM(10) 30.70 ± 0.66	33.33 ± 0.33	P(10) 0.00	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IVHIM	<i>T. erecta</i>	17.30 ± 0.33	C(30) 21.00 ± 0.00	<u>19.66 ± 0.33</u>	VA(30) 0.00	8.0 ± 0.00
	<i>T. lucida</i>	12.00 ± 0.57	C(30) 21.00 ± 0.00	21.33 ± 0.33	VA(30) 0.00	12.00 ± 0.00
	<i>R. luteola</i>	11.66 ± 0.33	C(30) 21.00 ± 0.00	<u>18.33 ± 1.66</u>	VA(30) 0.00	12.00 ± 0.00
<i>Proteus mirabilis</i> 19	<i>C. bippinatus</i>	20.00 ± 0.00	IMP(10) 25.00 ± 0.00	<u>23.00 ± 0.00</u>	NPAA	NPAA
	<i>R. luteola</i>	8.0 ± 0.00	IMP(10) 25.00 ± 0.00	<u>23.33 ± 1.33</u>	NPAA	NPAA
<i>Salmonella</i> sp HI(2)	<i>C. bippinatus</i>	0	IMP(10) 25.0 ± 0.00	24.00 ± 0.00	NA(30) 0.00	0
					CB(100) 17.00 ± 0.00	18.00 ± 0.00
	<i>T. lucida</i>	8.3 ± 0.03	IMP(10) 25.0 ± 0.00	26.00 ± 0.00	NA(30) 0.00	0
					CB(100) 17.00 ± 0.00	<u>15.00 ± 0.00</u>

*No se probó con el antibiótico anulado (NPAA).

8.4 Resultados del bioensayo cualitativo de inhibidores de resistencia bacteriana.

La cepa *S. aureus* IIHIM que se probó con dos aceites *T. lucida* y *R. luteola*; se observó que el aceite esencial *T. lucida* al combinarlo con el control positivo clindamicina CC(2 µg) mostró mayor efecto de inhibición (Fig. 13). Con el aceite esencial *R. luteola* el efecto se potenció al combinarlo con el antibiótico anulado por la bacteria, penicilina P(10 µg) así como con los controles positivos clindamicina CC(2 µg) y cloramfenicol C(30 µg) (Fig.14).

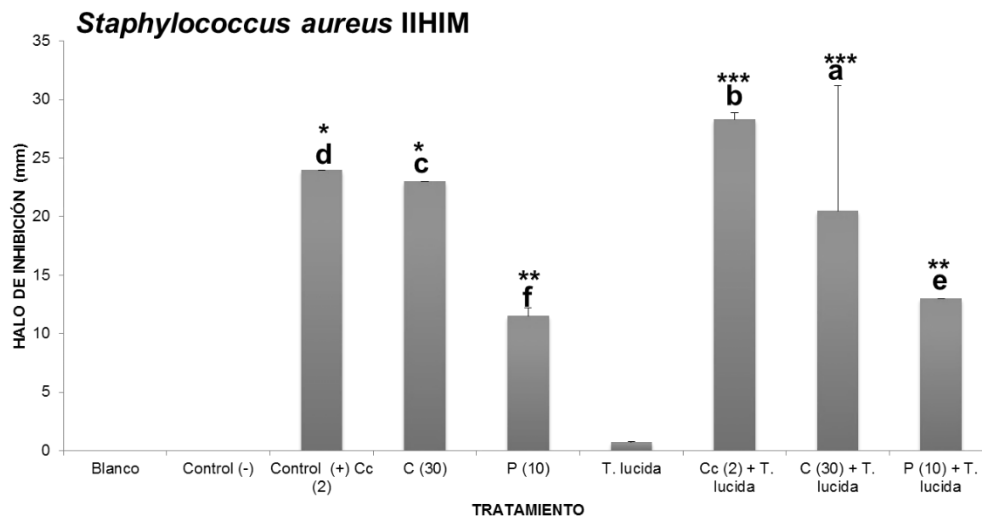


Fig. 13 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus aureus* IIHIM con el aceite esencial *T. lucida*. Como controles positivos se usaron Clindamicina CC(2 µg), y Cloranfenicol C(30 µg) y penicilina P(10 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$ y * $P \leq 0.05$

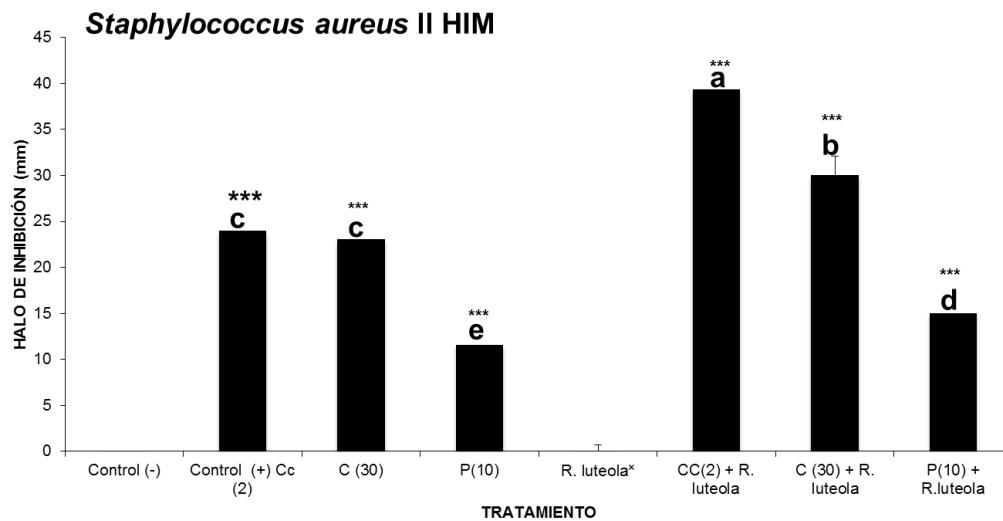


Fig. 14 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus aureus* IIHIM con el aceite esencial *R. luteola*. Como controles positivos se usaron clindamicina CC (2 µg), y cloranfenicol C (30 µg) y penicilina P (10 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

La cepa *S. aureus* III HIM solo se probó con el aceite esencial de *T. lucida* pero se observó una mayor inhibición al combinar el aceite esencial con el control positivo cloramfenicol C (30 µg) (Fig. 15).

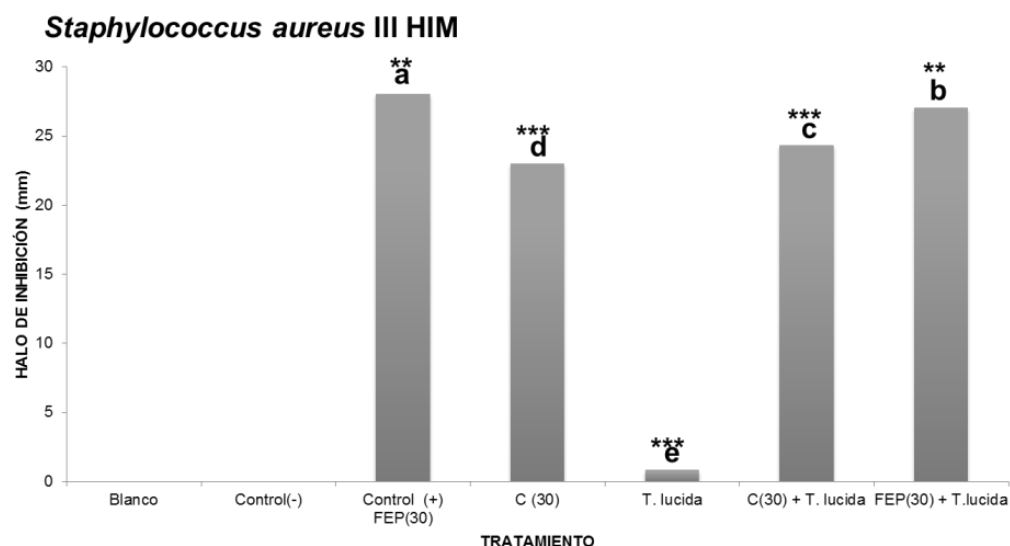


Fig. 15 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus aureus* IIHIM con el aceite esencial *T. lucida*. Como controles positivos se usaron cefepime FEP (30 µg), y cloramfenicol C (30 µg); y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$ y ** $P \leq 0.01$.

La cepa de *S. aureus* FES se probó con los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. lucida* y *R. luteola* y solo se probó con el control positivo. Con el aceite esencial *C. bipinnatus* solo mostró una mayor inhibición al combinar el aceite con el control imipenem IPM (10 µg) (Fig. 16). Y con el aceite esencial *T. lucida* mostró una ligera inhibición bacteriana (Fig. 17). Con el aceite esencial de *R. luteola* se observó una potenciación al combinarlo con los controles positivos imipenem IPM (10 µg) y cloramfenicol C (30 µg) (Fig. 18).

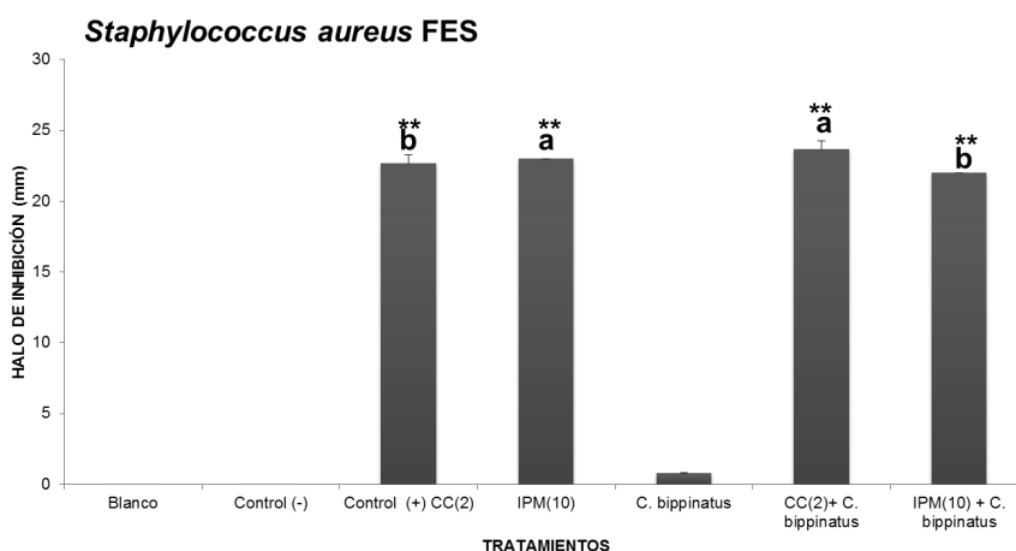


Fig. 16 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus aureus* FES con el aceite esencial *C. bipinnatus*. Como controles positivos se usaron clindamicina CC (2 µg), e imipenem IPM (10 µg); y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$ y ** $P \leq 0.01$

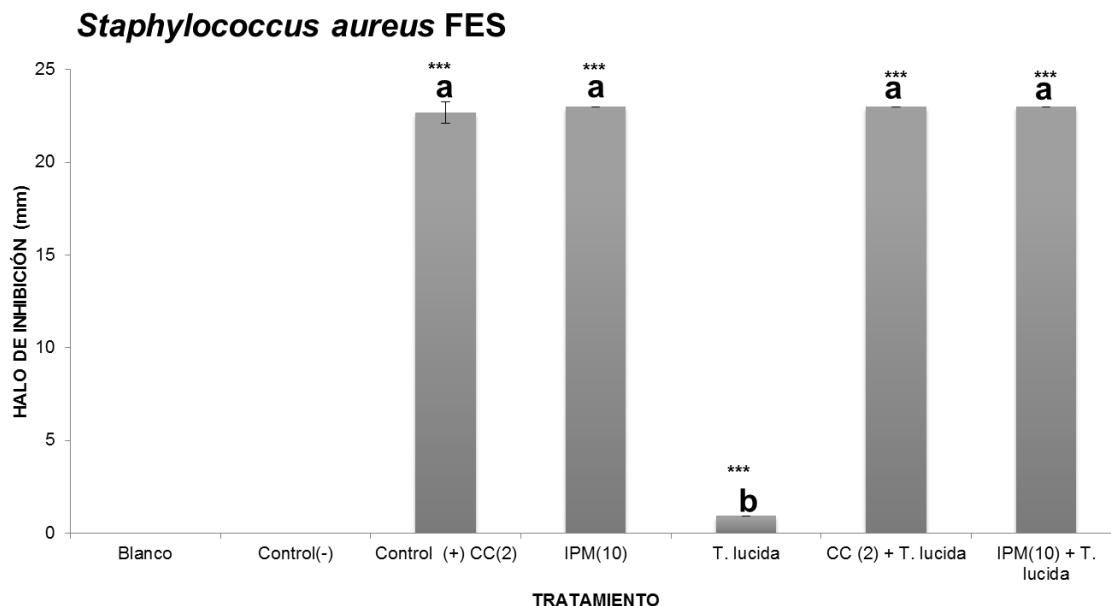


Fig. 17 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus aureus* FES con el aceite esencial *T. lucida*. Como controles positivos se usaron clindamicina CC (2 µg), e imipenem IPM (10 µg); y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

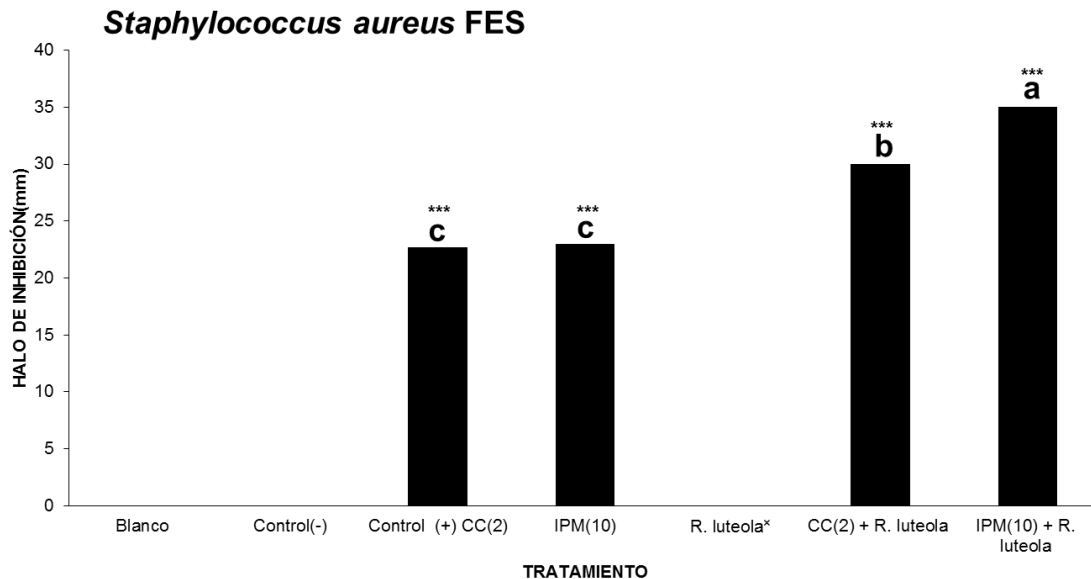


Fig. 18 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus aureus* FES con el aceite esencial *R. luteola*. Como controles positivos se usaron clindamicina CC (2 µg), e imipenem IPM (10 µg); y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

La cepa de *S. epidermidis* FES se probó con los aceites esenciales *C. pipinnatus*, *T. lucida* y *R. luteola*. Con el aceite esencial de *C. bipinnatus* no se observó ningún efecto (Fig. 19). Con el aceite esencial *T. lucida* se observó una mayor inhibición al combinarlo con el control positivo clindamicina CC(2 µg) y con el antibiótico anulado por la bacteria cefepime FEP(30 µg) (Fig. 20). Con el aceite esencial *R. luteola* por si solo mostró inhibición bacteriana; al combinarlo con los controles positivos clindamicina CC(2 µg) y vancomicina VA(30 µg) mostró mayor inhibición por lo que se produjo un efecto de potenciación con el antibiótico anulado cefepime FEP(30 µg) (Fig. 21).

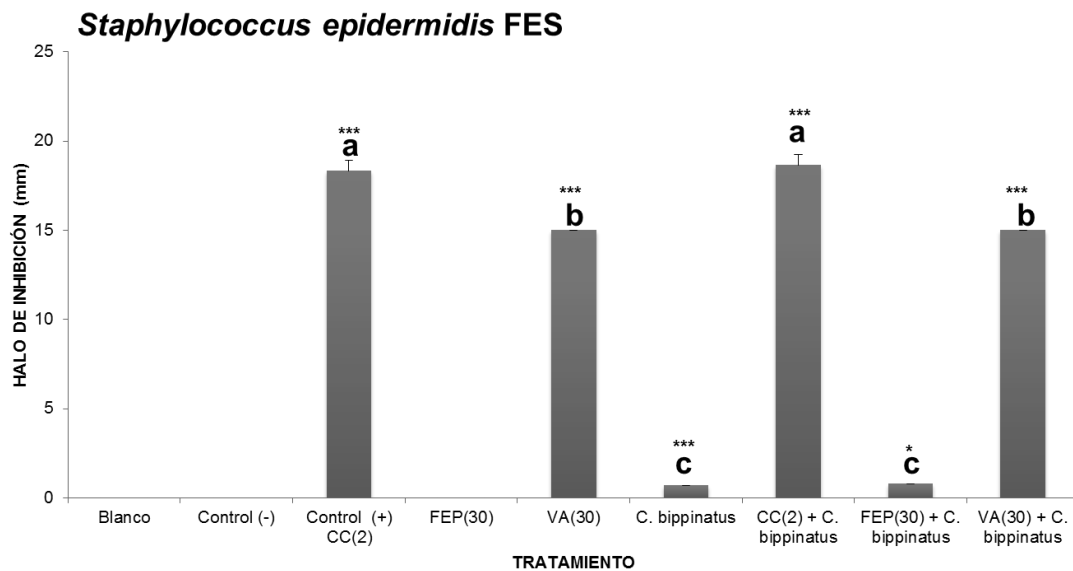


Fig. 19 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus epidermidis* FES con el aceite esencial *C. bipinnatus*. Como controles positivos se usaron clindamicina CC(2 µg), y vancomicina VA(30 µg) y cefepime FEP(30 µg) como antibiótico anulado; y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$.

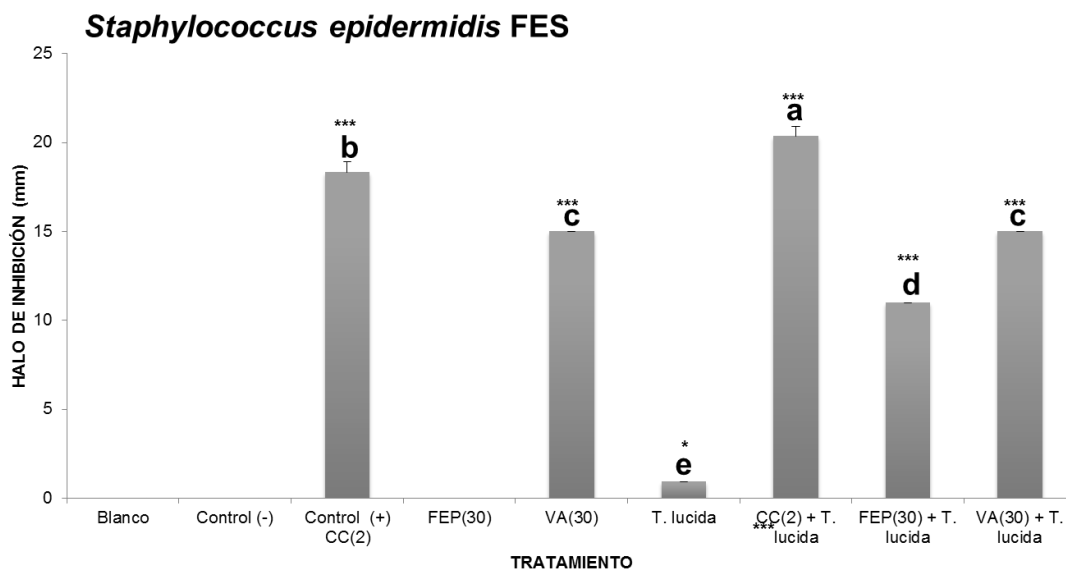


Fig. 20 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus epidermidis* FES con el aceite esencial *T. lucida*. Como controles positivos se usó clindamicina CC(2 µg), y vancomicina VA(30 µg) y cefepime FEP(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$ y * $P \leq 0.05$

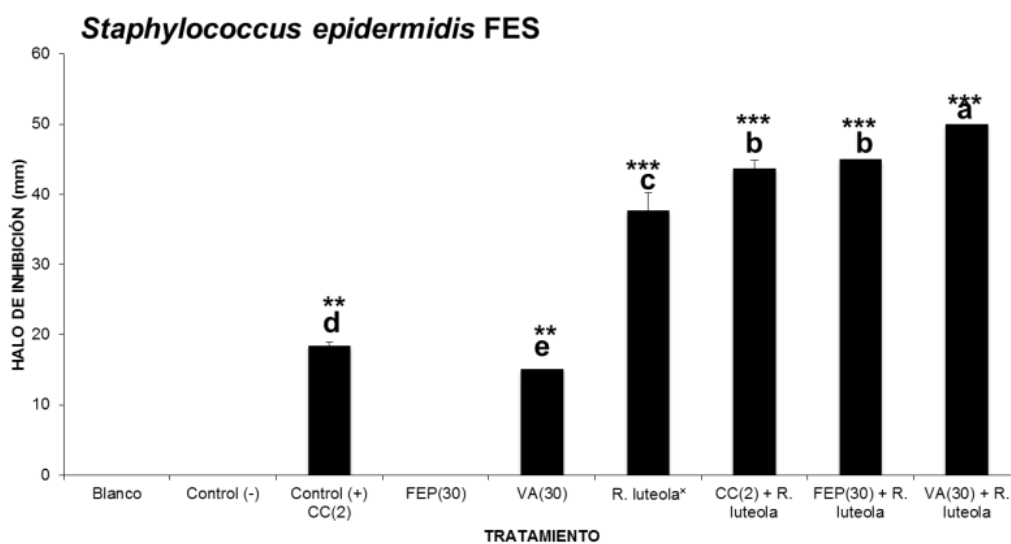
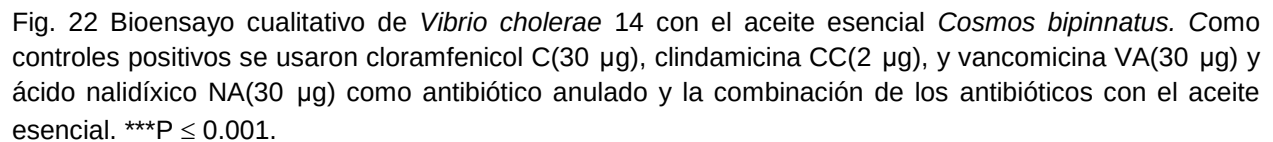


Fig. 21 Bioensayo cualitativo de *Staphylococcus epidermidis* FES con el aceite esencial *R. luteola*. Como controles positivos se usaron clindamicina CC(2 µg), y vancomicina VA(30 µg) y cefepime FEP(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$ y ** $P \leq 0.01$.



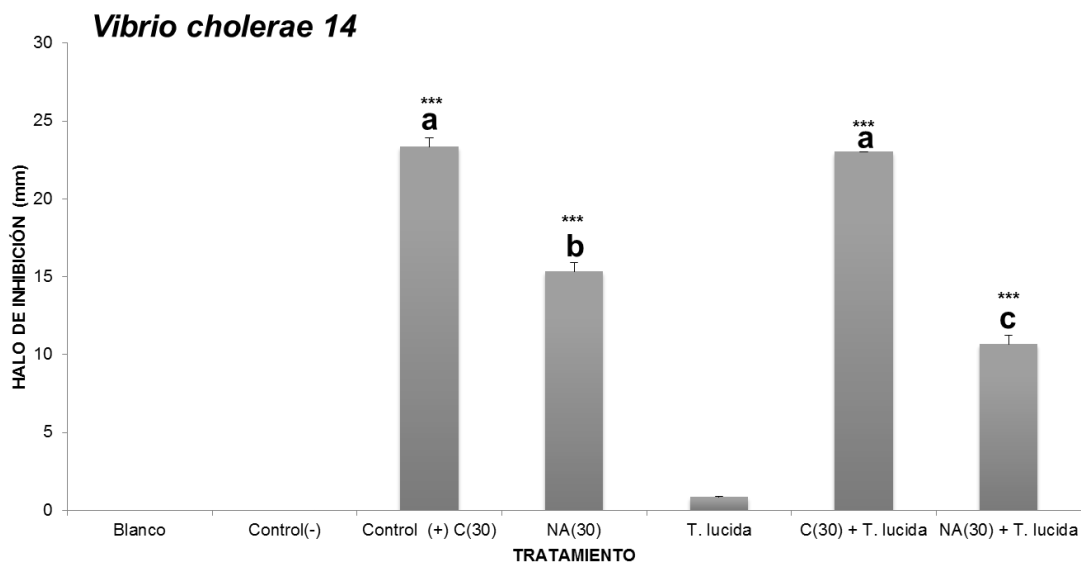


Fig. 23 Bioensayo cualitativo de *Vibrio cholerae* 14 con el aceite esencial *Tagetes lucida*. Como controles positivos se usaron cloramfenicol C(30 μ g), clindamicina CC(2 μ g), vancomicina VA(30 μ g) y ácido nalidíxico NA(30 μ g) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial $P \leq 0.001$.

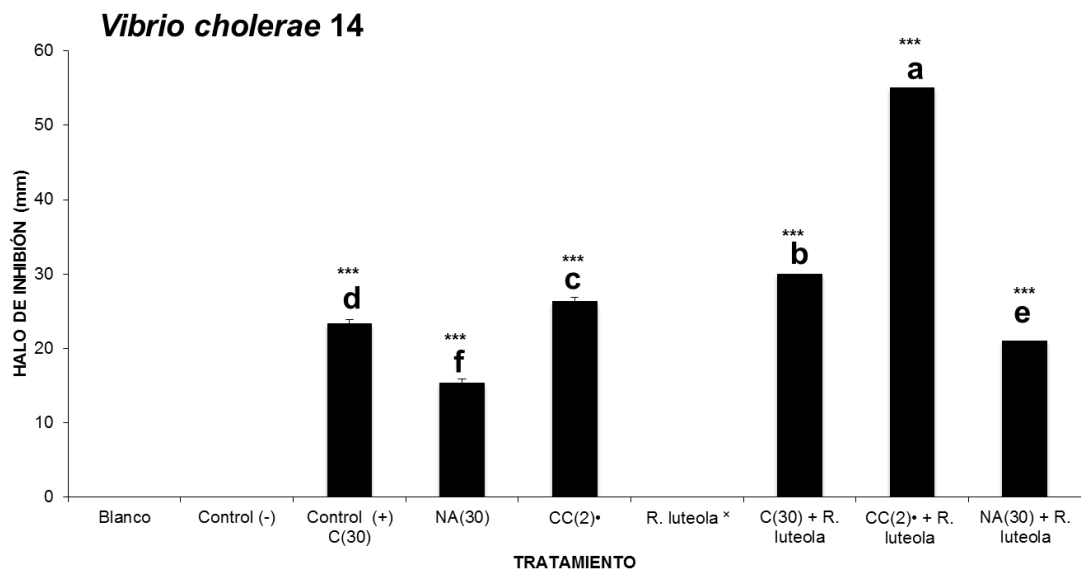


Fig. 24 Bioensayo cualitativo de *Vibrio cholerae* 14 con el aceite esencial de *Reseda luteola*. Como controles positivos se usó cloramfenicol C(30 μ g), clindamicina CC(2 μ g), vancomicina VA(30 μ g) y ácido nalidíxico NA(30 μ g) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial $P \leq 0.001$.

La cepa *E. coli* 2 MR se probó con los aceites esenciales *T. lucida* y *R. luteola*. Con el aceite esencial *T. lucida* se presentó una mayor inhibición al combinarlo con el control positivo imipenem IPM(10 µg) y un antagonismo con cloramfenicol C(30 µg) (Fig. 25). Con el aceite esencial *R. luteola* mostró inhibición bacteriana, y al combinar el aceite con el control positivo imipenem IPM(10 µg) mostró una mayor inhibición bacteriana y un antagonismo con los antibióticos cloramfenicol C(30 µg) y ácido nalidíxico NA(30 µg) (Fig. 26).

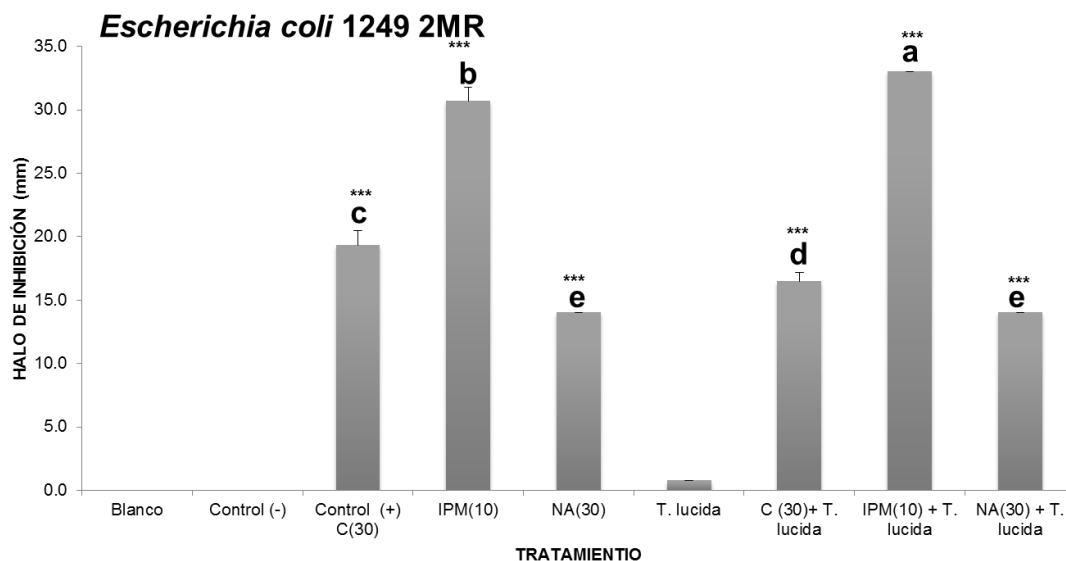


Fig. 25 Bioensayo cualitativo de *Escherichia coli* 1249 2MR con el aceite esencial de *Tagetes lucida*. Como controles positivos se usó cloramfenicol C(30 µg), imipenem IPM(10 µg), y ácido nalidíxico NA(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

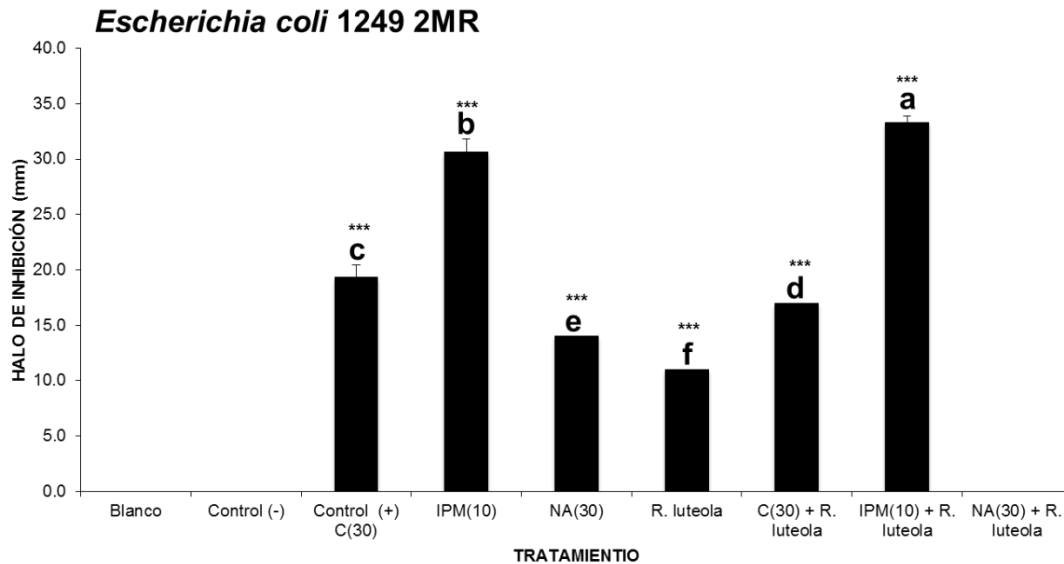


Fig. 26 Bioensayo cualitativo de *Escherichia coli* 1249 2MR con el aceite esencial de *Reseda luteola*. Como controles positivos se usó cloramfenicol C(30 µg), imipenem IPM(10 µg), y ácido nalidíxico NA(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

La cepa *K. pneumoniae* IV HIM se probó con los aceites esenciales *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola*. Con el aceite esencial de *T. erecta* solo mostró actividad antibacteriana; pero al combinar el aceite con el control positivo cloramfenicol C(30 µg) presentó antagonismo (Fig. 27). Con el aceite esencial *T. lucida* presentó inhibición antibacteriana (Fig. 28). Y con el aceite esencial *R. luteola* inhibió el crecimiento de la bacteria, pero en combinación con el control positivo cloramfenicol C(30 µg) hubo antagonismo (Fig. 29).

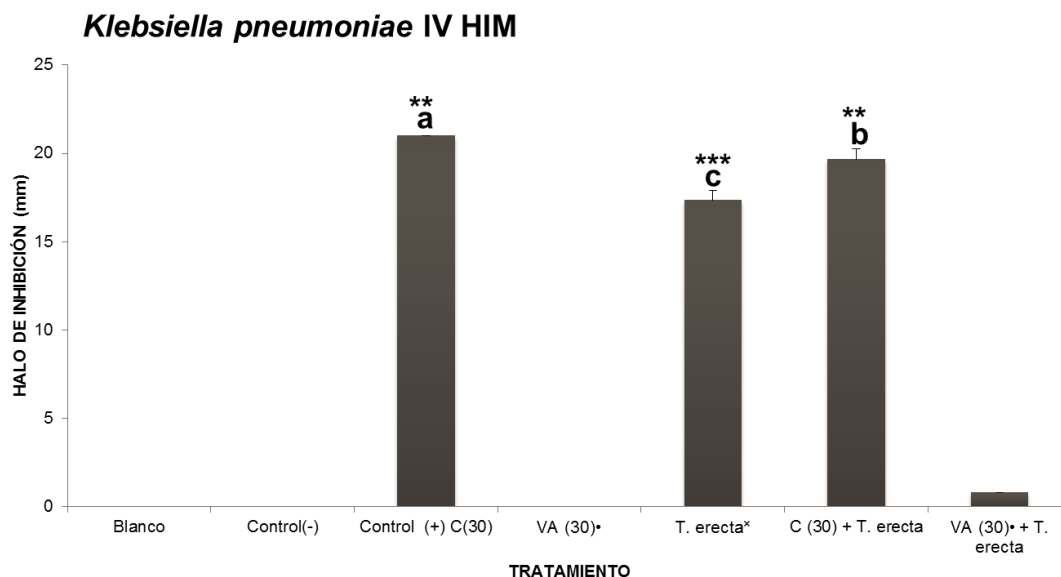


Fig. 27 Bioensayo cualitativo de *Klebsiella pneumoniae* IVHIM con el aceite esencial *Tagetes erecta*. Como controles positivos se usó cloramfenicol C(30 µg) y vancomicina VA(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$ y ** $P \leq 0.01$.

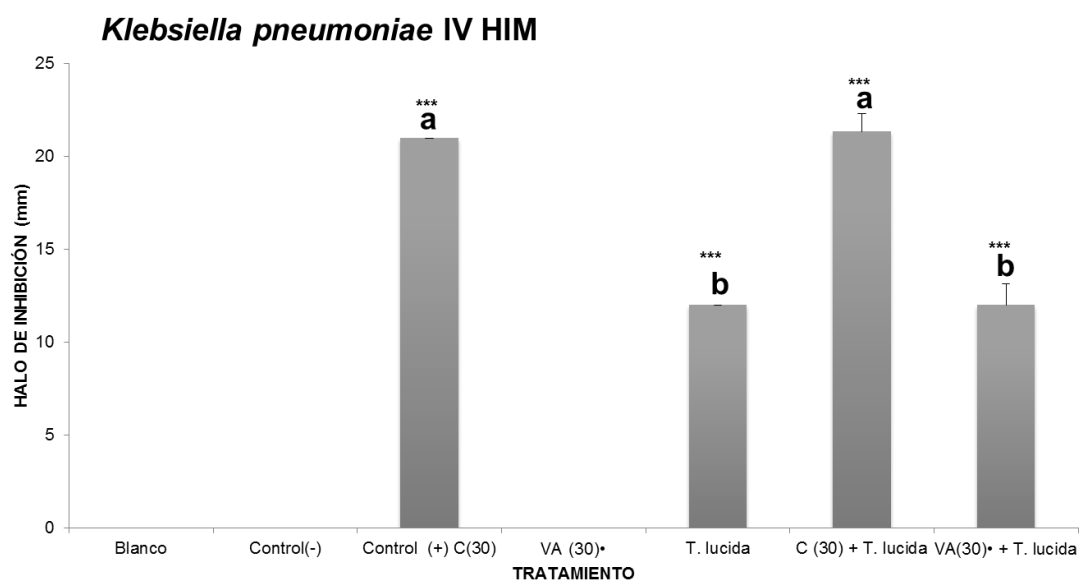


Fig. 28 Bioensayo cualitativo de *Klebsiella pneumoniae* IVHIM con el aceite esencial *Tagetes lucida*. Como controles positivos se usó cloramfenicol C(30 µg) y ácido vancomicina VA(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$

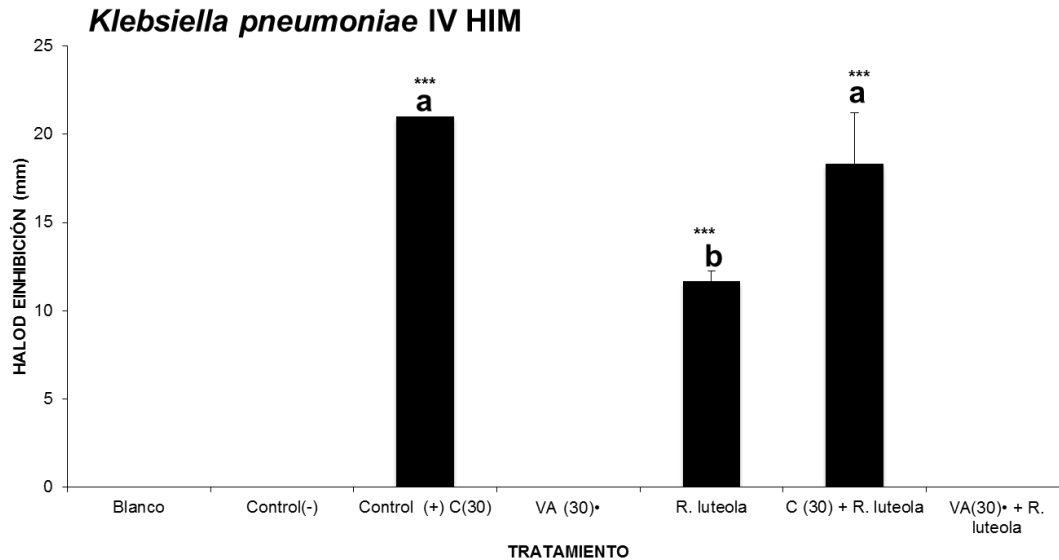


Fig. 29 Bioensayo cualitativo de *Klebsiella pneumoniae* IVHIM con el aceite esencial *Reseda luteola*. Como controles positivos se usó cloramfenicol C(30 µg) y vancomicina VA(30 µg) como antibiótico anulado y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$

La bacteria *Proteus mirabilis* 19 se probó con los aceites esenciales de *C. bipinnatus* y *R. luteola*. El aceite esencial *C. bipinnatus* inhibió a la bacteria; pero en combinación con los antibióticos no hubo diferencia (Fig. 30). Y el aceite esencial de *R. luteola* no inhibió el crecimiento bacteriano. No hubo diferencia al combinarlo con los antibióticos (Fig. 31).

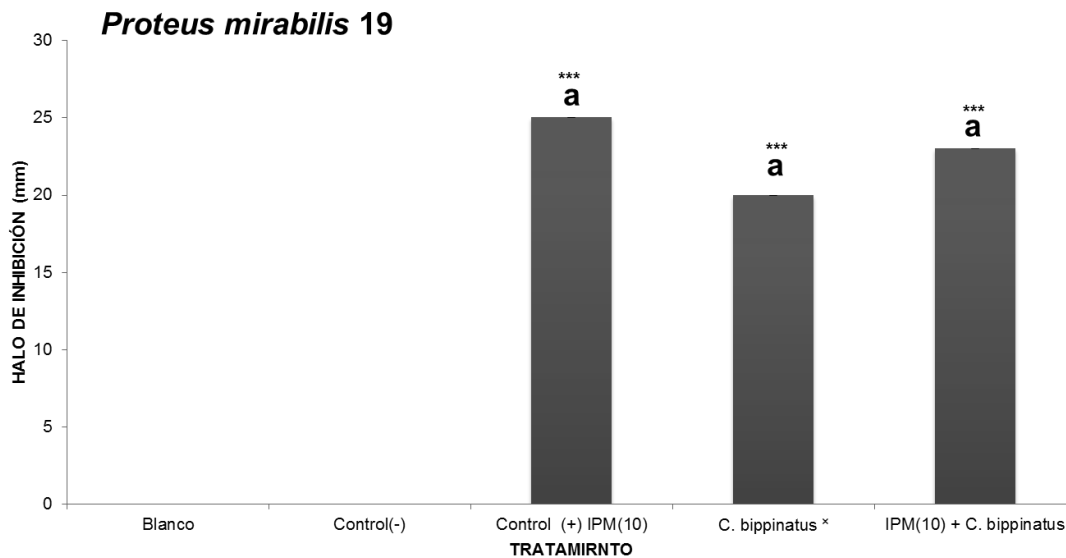


Fig. 30 Bioensayo cualitativo de *Proteus mirabilis* 14 con el aceite esencial *Cosmos bipinnatus*. Como controles positivo se usó imipenem IMP(10 μ g) y la combinación del antibiótico con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

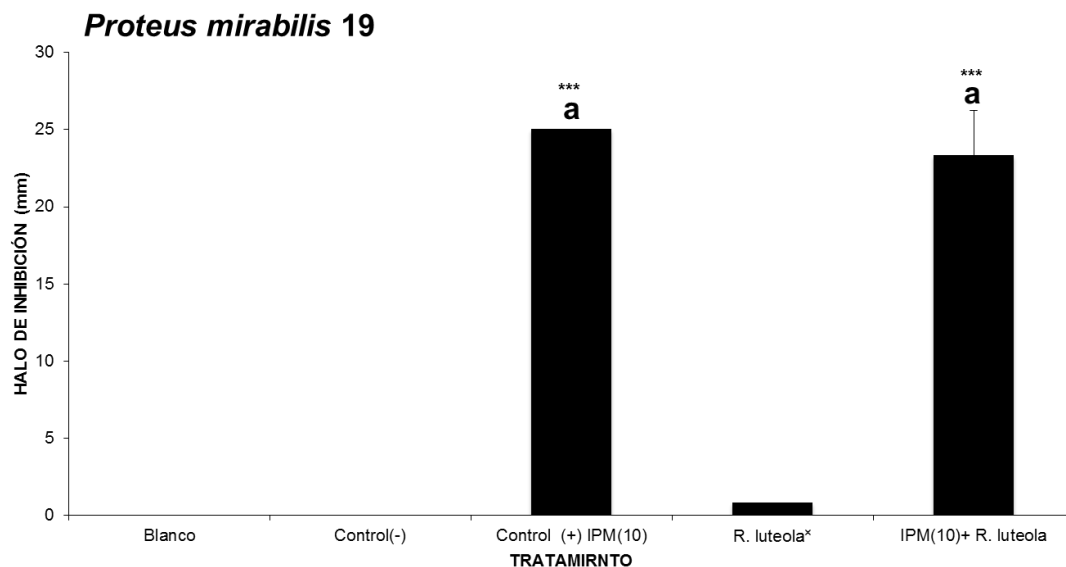


Fig. 31 Bioensayo cualitativo de *Proteus mirabilis* 14 con el aceite esencial *Reseda luteola*. Como controles positivo se usó imipenem IMP(10) y la combinación del antibiótico con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

La bacteria *Salmonella* sp HI (2) se probó con los aceites esenciales de *C. bipinnatus* y *T. lucida*. El aceite esencial de *C. bipinnatus* no inhibió a la bacteria y al combinarlos con los antibióticos hubo un antagonismo con carbencilina CB(100 μ g) (Fig. 32). El

aceite esencial *T. lucida* presentó una ligera inhibición bacteriana y al combinarlo con los antibióticos; con carbencilina CB(100 µg) presentó antagonismo (Fig. 33).

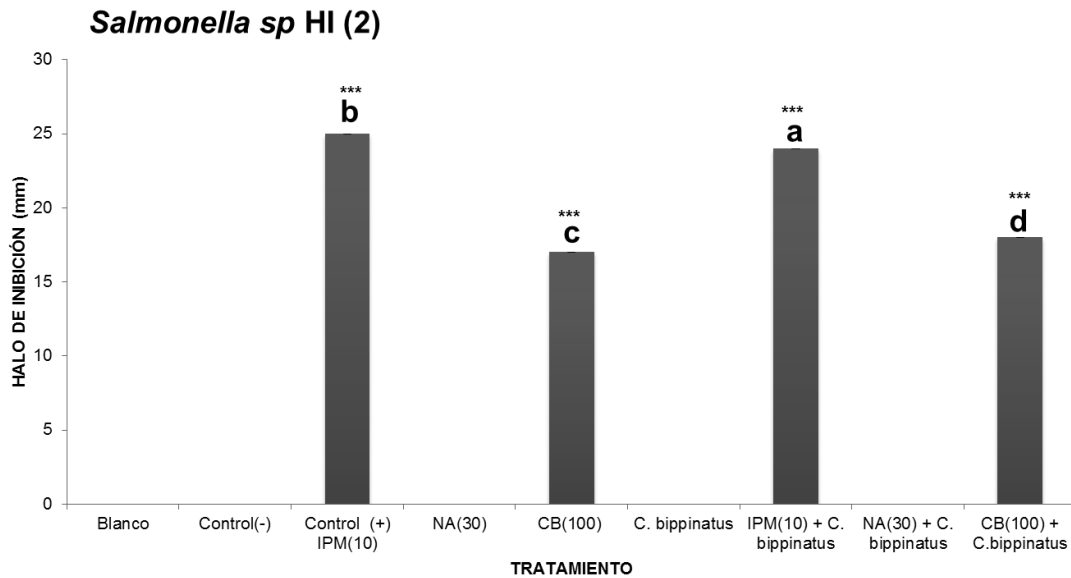


Fig. 32 Bioensayo cualitativo de *Salmonella* sp HI (2) con el aceite esencial *Cosmos bipinnatus*. Como controles positivos se usó imipenem IMP(10 µg), carbenicilina CB(100 µg) y ácido nalidíxico NA(30 µg), y la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$

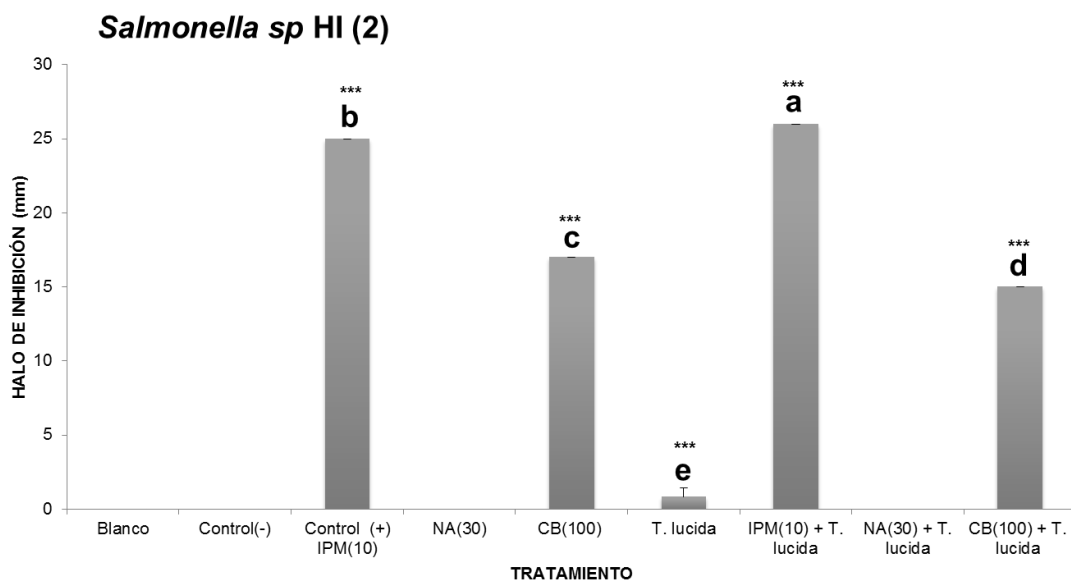


Fig. 33 Bioensayo cualitativo de *Salmonella* sp HI (2) con el aceite esencial *Tagetes lucida*. Como controles positivos se usó imipenem IMP(10 µg), carbenicilina CB(100 µg) y ácido nalidíxico NA(30 µg) como antibiótico anulado, la combinación de los antibióticos con el aceite esencial. *** $P \leq 0.001$.

8.5 Efecto de inhibición bacteriana cuantitativo

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites esenciales *T. lucida* y *R. luteola*; y la combinación de *R. luteola* más FEP (30 µg) para *S. epidermidis* FES (Tabla10). El aceite esencial de *R. luteola* utilizado para el método cuantitativo se realizó con la 2ª extracción.

Tabla 10. La estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los aceites esenciales *T. lucida* y *R. luteola*

Bacteria	Aceite	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)
<i>K. pneumoniae</i> IVHIM	<i>T. lucida</i>	1.0	2.0
<i>S. aureus</i> FES	<i>R. luteola</i>	2.0	-
<i>S. aureus</i> IIHIM	<i>R. luteola</i>	1.0	2.0
<i>S. epidermidis</i> FES	<i>R. luteola</i>	0.5	1.0
<i>E. coli</i> 1249 2MR	<i>R. luteola</i>	1.0	1.5
<i>V. cholerae</i> 14	<i>R. luteola</i>	1.0	1.5
<i>S. epidermidis</i> FES + FEP	<i>R. luteola</i>	0.125	0.5

9. DISCUSIÓN

9.1 Composición química de los aceites esenciales

El aceite esencial de *C. bipinnatus* mostró tener 35 compuestos diferentes. Esta composición del aceite es muy variada en abundancia, así como en la ausencia de algunos de los compuestos en comparación con otros trabajos. La actividad antibacteriana de este aceite se le atribuye a los compuestos de β -trans-ocimeno y D-germacreno ya que han sido reportados en distintas investigaciones como agentes antibacterianos, como lo muestra un estudio que se hizo en Sudáfrica, para probar actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Olajuyigbe & Ashafa, 2014).

En el aceite esencial *T. erecta* se identificaron 89 compuestos. Se ha demostrado que el aceite esencial de *T. erecta* contiene moléculas bioactivas con diversos usos terapéuticos, como antibiótico, antimicrobiano, antiparasitario y antiséptico. La composición química es variable debido a su extracción metanólica (Devika & Justin, 2014). Y en un estudio antibacteriano que se realizó en la India, demostraron que el aceite esencial de *T. erecta* inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas que causan infecciones en la piel, en cuanto a su composición química predominan el limoneno, ocimeno, tagetone y el ácido valérico (Dasgupta *et al.*, 2012).

En el aceite esencial *T. lucida* se encontraron 94 compuestos. Se ha documentado que el aceite esencial de *T. lucida* tiene actividad antimicrobiana en contra de varias cepas patógenas en humanos (Capunzo *et al.*, 2003). Se ha demostrado que la planta de *T. lucida* tiene mucha actividad antibacteriana y que su composición es muy variada dependiendo de la extracción de sus compuestos, por ejemplo usando una extracción con metanol y cloruro de metileno, se pueden obtener varias cumarinas con gran actividad antibacteriana en cepas Gram negativas como Gram positivas, así como actividad antifúngica (Céspedes *et al.*, 2006).

En el aceite esencial *R. luteola* del año 2014 se identificaron 104 compuestos, en el de la segunda colecta de 2015, 94 compuestos, sin embargo predominaron en ambas

mezclas β -fenilpropionitrilo y β -feniletilisotiocianato. Se ha demostrado que algunos extractos de *R. luteola* contiene compuestos que pueden tener actividad antimicrobiana (Yildirim-Arzu *et al.*, 2013).

9.2 Incidencia de actividad antibacteriana y de inhibición de resistencia a antibióticos

En este estudio preliminar que se realizó concuerda con nuestra hipótesis de que los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* contienen metabolitos secundarios que inhiben los mecanismos de resistencia bacteriana. Los experimentos realizados con los aceites esenciales demostraron su efecto antibacteriano y en combinación con los antibióticos comerciales a los que la bacteria era resistente, se observó un halo de inhibición mayor que con el aceite esencial solo, y en algunos casos el efecto se potenció; por lo que se cumple parte de nuestra predicción; porque si bien no fue para todos los casos, sí para el 42% del total de los bioensayos realizados.

De acuerdo a las estadísticas de las Farmacéuticas, que por cada 5000 moléculas evaluadas tan solo una es activa y puede llegar al mercado, nuestras expectativas eran bajas para encontrar moléculas bioactivas. Sin embargo, en nuestro estudio preliminar de los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* encontramos metabolitos secundarios que no solo mostraron actividad antimicrobiana, sino que también pueden inhibir la resistencia bacteriana a antibióticos de: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *Salmonella sp* y *V. cholerae*. Aun así nos falta identificar el metabolito o metabolitos causantes de esta actividad antibacteriana e inhibidora de la resistencia bacteriana.

En este estudio preliminar de inhibición de la resistencia bacteriana se obtuvieron 54 combinaciones con sus respectivas tres repeticiones de las cuales, el 42.5% fue suficiente para obtener un halo de inhibición mucho mayor que el del aceite o el antibiótico por si solos. En algunos casos se potenció este efecto, que atribuimos a los metabolitos secundarios de los aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida*

y *R. luteola*. Es posible que este efecto se deba a la interacción entre el aceite esencial y el antibiótico, pues en algunos casos el aceite por sí solo no inhibió y al combinarlo con él antibiótico anulado por la bacteria fue capaz de producir un halo de inhibición y en algunos casos potenció el efecto. Por lo que parsimoniosamente indica que estas combinaciones lograron inhibir algunos de los mecanismos de resistencia de la bacteria.

En nuestro sentido contrario, también encontramos antagonismo pues el 18.5% de los resultados mostró una disminución en el halo de inhibición al combinar el antibiótico más el aceite esencial. Es posible que la bacteria se defiende de los aceites esenciales utilizando sus mecanismos de resistencia, o tal vez la combinación entre el aceite esencial y el antibiótico anule algún mecanismo de acción de los antimicrobianos que se utilizaron en los experimentos. Es algo que a un nos queda por investigar.

En el 38.8% de los casos los resultados fueron nulos; esto quiere decir que no obtuvimos ningún efecto positivo ni negativo por parte de las combinaciones que se realizaron en los experimentos. Esto se puede deber a una cantidad insuficiente de aceite esencial para observar un efecto, o bien por las condiciones en las que se llevó acabo el experimento, ya que el aumento de temperatura era inevitable para asegurar las condiciones de esterilidad, provocando que la muestra se perdiera por su volatilidad. También pudo deberse a que la muestra se degradara por exposición a la luz, ya que algunos compuestos eran fotosensibles. Y si bien se ha demostrado que los factores químicos y físicos pueden afectar la cantidad y composición de los aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas (Mayo-Hermenegildo, 2014). Por consecuente cambian las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales, ya que depende del tipo, la composición, la concentración, la extracción y las condiciones de almacenamiento, así como del tipo de inóculo a utilizar (Olajuyigbe & Ashafa, 2014). Otra explicación en la variación de los resultados, puede deberse a la variación en la resistencia de las cepas utilizadas, pues trabajamos con bacterias con la capacidad de anular a uno o a dos antibióticos o hasta más. Otras de las posibles explicaciones por las cuales no obtuvimos un patrón de inhibición consistente en los resultados, es por el modo de crecimiento de las bacterias, pues estudios demuestran que tienen diferente

capacidad de resistencia a antibióticos como al sistema inmune una bacteria plantónica que una bacteria que crece en biopelículas debido al fenotipo mucóide que desarrollan (Bagge *et al.*, 2004). Esta capacidad de formar un biofilm no se restringe a ningún microorganismo, se considera en condiciones ambientales adecuadas la gran mayoría de las bacterias sin importar la especie puede existir dentro de biofilms adheridos a una superficie, en una interface sólido/líquida, como se ha observado en distintas enfermedades causadas por *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* (Nazar, 2007).

De acuerdo a los porcentajes positivos mencionados anteriormente los resultados más interesantes los encontramos al combinar el aceite esencial de *R. luteola* con los antibióticos anulados por *S. aureus* IHHM, así como con los controles positivos, pues se logró observar una mayor inhibición bacteriana y en muchos de los casos se produjo un efecto de potenciación (Fig. 15).

Para el caso de *S. aureus* FES, no se observó actividad antimicrobiana por parte del aceite esencial *R. luteola*, pero si se observó una disminución en la concentración de la densidad bacteriana. Para este caso solo se probó con los controles positivos clindamicina e imipenem; que al combinarlos con el aceite mostraron una potenciación del efecto antibacteriano. La cepa *Staphylococcus epidermidis* FES también fue inhibida por el aceite esencial de *R. luteola* con un halo de inhibición de 37.6 mm, y al combinarlo con el aceite esencial se produjo una interacción aditiva ya que el efecto del aceite y del antibióticos se sumó produciendo un halo de inhibición mayor que por sí solos. Con cefepime, el antibiótico anulado por la bacteria, si hubo una interacción de potenciación al combinarlo con el aceite esencial de *R. luteola*, pues el halo de inhibición incrementó a 45.0 mm. Por lo que podemos decir que el aceite esencial de *R. luteola* no solo tiene efecto antibacteriano sino que además puede contener inhibidores de resistencia bacteriana (Tabla 9), pero a un nos falta comprobar esta teoría.

En la cepa de *V. cholerae* 14, la actividad antibacteriana del aceite de *R. luteola* no se midió, debido a que no se presentó un halo de inhibición, solo se observó un descenso en la concentración de la densidad bacteriana en la placa. Con la combinación de los antibióticos más el aceite tuvimos resultados interesantes, con cloranfenicol presentó

una mayor inhibición bacteriana; con clindamicina que aunque no es específico para bacterias Gram (-) presentó un halo de inhibición dos veces mayor que el antibiótico solo; con ácido nalidíxico que tiene resistencia intermedia en combinación con aceite aumentó 7 mm más por lo que queda demostrado que el aceite esencial *R. luteola* tiene un efecto antibacteriano y además puede contener inhibidores de resistencia bacteriana (Fig. 25).

Lo interesante del aceite esencial de *R. luteola* es que hay pocas investigaciones en cuanto a la actividad antibacteriana del aceite por lo que no se han realizado experimentos con los compuestos mayoritarios, que son a los que les atribuimos la actividad antibacteriana: β -Fenil-propionitrilo y β -Fenil-etil- isotiocianato, y que estuvieron presentes en las dos muestras con las que trabajamos aunque en distintas concentraciones.

Existen diversos trabajos que demuestran la actividad antibacteriana del aceite esencial *T. lucida*; y han probado su actividad con diferentes extractos como el del extracto metanólico donde resulto efectivo en contra de *S. aureus* (Menchaca-Vega & Carmen-María, 2013).

El aceite esencial *T. lucida* mostró poca actividad antibacteriana y poca interacción al combinarlos con los antibióticos como sucedió con *S. aureus* IHHM. Solo al combinar el control positivo (clindamicina) con el aceite esencial de *T. lucida* hubo una potenciación del efecto. Y con la cepa *E. coli* 2MR no se observó inhibición por parte del aceite esencial *T. lucida* pero al interactuar con imipenem, el control positivo, el aceite produjo mayor inhibición, lo que indica que el aceite esencial *T. lucida* puede contener inhibidores de resistencia bacteriana.

Se demostró la actividad antibacteriana del aceite esencial *C. bipinnatus* pues logro inhibir a *P. mirabilis* 19; y con *V. cholerae* 14, y al combinarlo con clindamicina uno de los controles positivos, se observó un halo inhibición mayor que con el antibiótico por sí solo.

Y por último el aceite esencial de *T. erecta* solo mostró inhibición bacteriana en contra de *K. pneumoniae* IVHIM.

9.3 Ensayos para encontrar la CMI y CMB

Se logró determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida de los aceites esenciales *T. lucida* y *R. luteola*.

Para la cepa *K. pneumoniae* IVHIM se encontró que el aceite esencial *T. lucida* tiene una CMI: 1.0 y CMB: 2.0; lo que nos indica que este aceite esencial tiene una actividad antimicrobiana. En otras investigaciones han logrado determinar la CMI para el aceite esencial de *T. lucida* pero con diferentes extractos como con MeOH / CH₂Cl₂ (Céspedes *et al.*, 2006).

El aceite esencial de *R. luteola* demostró tener mayor actividad antimicrobiana: contra *S. aureus* IHHIM obtuvimos CMI: 1.0 y CMB: 2.0. Para *S. epidermidis* FES encontramos una CMI: 0.5 y una CMB: 1.0. Para *E. coli* 1249 2MR mostró una CMI: 1.0 y una CMB: 1.5. Y para *V. cholerae* 14 una CMI: 1.0 y CMB: 1.5. A pesar que hay muy poca investigación de *R. luteola*, de su actividad antibacteriana en este trabajo resultó ser muy activa.

Con la cepa *S. epidermidis* FES se determinó la CMI y CMB en combinación del aceite esencial y el antibiótico anulado (*R. luteola* + FEP(100)); obtuvimos una CIM de 0.125 y una CMB de 0.5; con estos resultados se demuestra la hipótesis que planteamos, que el aceite esencial de *R. luteola* tiene actividad antimicrobiana y además puede contener inhibidores de resistencia bacteriana. La CMI y la CMB fueron menores cuando se combinó el aceite esencial de *R. luteola* más el antibiótico anulado, en comparación con el bioensayo cuantitativo donde solo se utilizó el aceite esencial de *R. luteola* con la misma cepa de *S. epidermidis* FES.

10. CONCLUSIÓN

Se demostró el efecto antibacteriano de los aceites esenciales *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas. También se demostró que al combinar los aceites esenciales con antibióticos comerciales el efecto se puede incrementar y en el mejor de los casos potenciar. Aunque también podemos tener un efecto antagónico. Y de acuerdo con nuestros resultados obtenidos podemos decir parsimoniosamente que nuestros aceites esenciales de *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* contienen inhibidores de resistencia bacteriana, aunque a un nos falta realizar pruebas confirmatorias que avalen esta hipótesis, por lo que tenemos mucho trabajo por realizar y más que investigar.

11. PERSPECTIVA

Algunas recomendaciones para continuar con este proyecto son: realizar fracciones de los aceites *C. bipinnatus*, *T. erecta*, *T. lucida* y *R. luteola* esenciales para observar qué metabolito o metabolitos son los responsables del efecto antimicrobiano o probar los compuestos si es que ya están a la venta y realizar los bioensayos cualitativos en contra de bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como realizar las pruebas confirmatorias de que realmente nuestros aceites esenciales contienen inhibidores de resistencia bacteriana. Y por último determinar la CMI y la CMB de la combinación del aceite esencial más los antibióticos comerciales en contra de bacterias Gram positivos y Gram negativos.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*.
- Anaya-Lang, A. L., & Espinosa-García, F. J. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*(083), 4 -13.
- Angelini, L. G., Bertoli, A., Rolandelli, S., & Pistelli, L. (2003). Agronomic potential of *Reseda luteola* L. as new crop for natural dyes in textiles production. *Industrial crops and products*, 17(3), 199 -207.
- Aumeeruddy-Elalfi, Z., Gurib-Fakim, A., & Mahomoodally, F. (2015). Antimicrobial, antibiotic potentiating activity and phytochemical profile of essential oils from exotic and endemic medicinal plants of Mauritius. *Industrial Crops and Products*, 71, 197-204. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.03.058
- Bagge, N., Schuster, M., Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E. P., et al. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(4), 1175 -1187.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44 - 52. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Canales, M., Hernández, T., Rodríguez-Monroy, M. A., Jiménez-Estrada, M., Flores, C. M., Hernández, L. B., et al. (2008). Antimicrobial activity of the extracts and essential oil of *Viguiera dentata*. *Pharmaceutical Biology*, 46(10 -11), 719 -723.

- Capunzo, M., Brunetti, L., Cavallo, P., Boccia, G., De Caro, F., & Ieluzzi, M. (2003). Antimicrobial activity of dry extracts of *Tagetes lucida* from Guatemala. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 44, 85-97.
- Céspedes-L, C., & Loaiza-Marín, J. C. (2007). Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*.
- Céspedes, C. L., Avila, J. G., Martínez, A., Serrato, B., Calderón-Mugica, J. C., & Salgado-Garciglia, R. (2006). Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(10), 3521 -3527. doi: 10.1021/jf053071w
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, 3(9), 541 -548.
- Cornaglia, G., & Rossolini, G. (2009). Forthcoming therapeutic perspectives for infections due to multidrug ,resistant Gram ,positive pathogens. *Clinical Microbiology and infection*, 15(3), 218 -223.
- Dasgupta, N., Samuel, R., Saha, P., Jain, R., Malhotra, S., & Arabi-Mohamed, S. M. (2012). Antibacterial activity of leaf extract of Mexican marigold (*Tagetes erecta*) against different gram positive and gram negative bacterial strains. *J Pharm Res*, 5(8), 4201 -4203.
- de Aguiar, U. N., de Lima, S. G., Rocha, M. D. S., Citó, A. M. D. G. L., Sousa, A. J. P., Silva, R. M., et al. (2015). Chemical composition and modulation of antibiotic activity of essential oil of *Lantana caatingensis* M. (Verbenaceae). *Industrial Crops and Products*, 74, 165-170. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.04.011
- Del Villar-Martinez, A. A., Serrato-Cruz, A. M., Solano-Navarro, A., Arenas-Ocampo, L. M., Quintero-Gutierrez, G. A., Sanchez-Millan, L. J., et al. (2007). Carotenoids

- in *Tagetes erecta* L. genetic modification as an option. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2), 109 -118.
- Devika, R., & Justin, K. (2014). Screening And Evaluation Of Bioactive Components Of *Tagetes erecta* L. By GC + MS Analysis *Asian Journal of Farmaceutical and Clinical Research*, 7, 58-60.
- Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K., & Echániz, G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Pública de México*, 50, S480-S487.
- Espinosa, G. F. J., & Sarukhán, J. (1997). Manual de malezas del Valle de México. *Ediciones Científicas Universitarias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF*.
- Evrendilek, G. A. (2015). Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 202, 35-41.
- Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 0 -0.
- França Orlanda, J. F., & Nascimento, A. R. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany*, 99, 103-106. doi: 10.1016/j.sajb.2015.03.198
- G., C.-d. R., & Rzdowski, J. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México* (A. C. y. C. N. p. e. c. y. U. d. I. B. Instituto de Ecología Ed. Segunda edición ed.). Pátzcuaro (Michoacán).

- Garza Gómez, I., Canto Aguilar, G., Bravo López, G. Y., Avilés Flores, M., & Fuentes Mata, M. (2005). 190. Del descenso al inframundo; Una breve mirada acerca de la historia de Tlatenchi; LOS CEMPOAXÓCHITL o FLOR DE MUERTO.
- Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance -strengths, weaknesses and opportunities. *Planta medica*, 74(6), 594 -602.
- Gradinaru, A. C., Aprotosoiaie, A. C., Trifan, A., Spac, A., Brebu, M., & Miron, A. (2014). Interactions between *Cardamom* essential oil and conventional antibiotics against *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Farmacia*, 62(6), 1214-1222.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., García, A. M., Martínez, A., Caballero, J., et al. (2005). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf.(Verbenaceae). *Journal of ethnopharmacology*, 96(3), 551-554.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J. G., García, A. M., Meraz, S., Caballero, J., et al. (2009). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* HBK (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 295 -300.
- Hernández, T., Canales, M., Teran, B., Avila, O., Duran, A., Garcia, A. M., et al. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 137 - 141.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby -Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiol.*
- Krimat, S., Dob, T., Toumi, M., Lamari, L., & Dahmane, D. (2015). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Salvia*

chudaei Batt. et Trab. endemic plant from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. doi: 10.1080/10412905.2015.1025921

Lim, T. K. (2014). *Tagetes lucida* Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants (pp. 448-455): Springer.

Liu, S. J., Liao, Z. X., Liu, C., & Sun, J. Y. (2015). Chemical constituents, anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Anaphalis lacteal* grown in Qinghai-Tibet Plateau. *Natural Product Research*, 29(14), 1369 - 1371. doi: 10.1080/14786419.2014.997728

Mayo-Hermenegildo, H. (2014). *Evaluación de los ésteres de forbol de variantes tóxicas de Jatropha curvas L. como agentes antifúngicos*. (Licenciatura), Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

Menchaca-Vega, & Carmen-María, d. (2013). *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.

Mendez-Rodriguez, C. (2015). *Evaluación del aceite esencial del pericón (tagetes lucida*

cav. como bioplaguicida contra insectos de maíz

almacenado. (Licenciatura), Universidad Michoacana de San

Nicolas de Hidalgo.

Moreno-M, C., González-E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69, 185-192.

Muñoz, K., Arango, G. J., & Jaramillo, M. C. (2009). Los antibióticos y su situación actual. *Vitae*, 11(1).

- Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1), 161 -172.
- Olajuyigbe, O., & Ashafa, A. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Cosmos bipinnatus* Cav. Leaves from South Africa. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4), 1415 -1421.
- Pérez-Urria, C. E., & Ávalos-García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3), 119 -145.
- Pimienta-Ramírez, L., García-Rodríguez, Y. M., Ríos-Ramírez, E. M., Lindig-Cisneros, R., & Espinosa-García, F. J. (2016). Chemical composition and evaluation of the essential oil from *Eupatorium glabratum* as biopesticide against *Sitophilus zeamais* and several stored maize fungi. *Journal of Essential Oil Research*, 28(2), 113-120.
- Portillo, A., Lantero, M., Zarazaga, M., Gastañares, M. J., Olarte, I., Undabeitia, E., et al. (2000). Resistencia a Antibióticos Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas y Mecanismos Implicados en Cepas Clínicas de *Streptococcus spp.* En la Rioja. *Zubía*, 11(12), 11 -26.
- Rodríguez, A., Harker, M., Quezada-Solís, A., & Casillas-Gaeta, S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del género *Cosmos* Cav.(Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la investigación Científica en el CUCBA: XVII Semana de la Investigación Científica. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Jalisco, México*, 610-619.
- Sousa, E. O., Rodrigues, F. F., Coutinho, H. D., Campos, A. R., Lima, S. G., & Costa, J. G. (2011). Chemical composition and aminoglycosides synergistic effect of *Lantana montevidensis* Briq.(Verbenaceae) essential oil. *Rec. Nat. Prod*, 5, 60-64.

- Sussmann-Otto, A., Mattos, L., & Restrepo, A. (2002). Resistencia bacteriana. *Univ Med*, 43(1), 20 -26.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217 -226.
- Torres, O. D., & Velho, L. (2010). La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação*, 38(3).
- Trejo-Tapia, G. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro. *Interciencia*, 32(10), 669 -674.
- Visbal, T., Rojas, L. B., R.Y., C., A.J., C., M., M., & A., U. (2010). Componentes volátiles de *Tagetes lucida* Cav (Asteraceae) (Cordero edo Táchira. Venezuela). *Fac Farm*, 52(1), 2 -4.
- Yildirim-Arzu, B., Karakas-Fatma, P., & Turker-Arzu, U. (2013). In vitro antibacterial and antitumor activities of some medicinal plant extracts, growing in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(8), 616 -624. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60106-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60106-6)