



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

“ α pineno y (-) β pineno: ¿Efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana?”

Tesis

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

JORGE SAUT REYES

DIRECTORA DE TESIS: DRA CLAUDIA TZASNA
HERNÁNDEZ DELGADO

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A mis padres Jorge Raúl Saut López y Adriana Reyes Moreno por ser mi apoyo, mi guía, mi sosten y fortaleza. Por enseñarme día a día el valor y la importancia del trabajo duro, por haber estado conmigo en los momentos más difíciles y tenderme la mano cuando creía que ya no existía una salida. A ellos les debo absolutamente todo lo que soy y tengo, éste regalo es para ustedes, que este sea solo el primero de muchos éxitos que por sus enseñanzas puedo alcanzar, porque sin ustedes yo no sería quien soy ahora. Los amo con todo mi corazón y no importa en donde me encuentre, siempre los llevaré dentro de mi.

A mi hermana Mariana Saut Reyes por todos los hermosos momentos a tu lado, por ser una de las personas que más quiero, gracias por todos tus consejos, tu apoyo, comprensión y las risas. Se que siempre podré contar y confiar en ti, justo como tu en mi. Te amo hermanita querida.

A mis abuelitos Gabriel Reyes Gaona (Torero de toreros y dueño de la raza Cahlé), Isabel Moreno Lázaro, Jorge Saut Alor y Elvira López Ortíz por todo el cariño, las risas, los buenos momentos y también los malos; es un honor que ustedes sean mis ancestros y día a día me sigo maravillando de las increíbles personas que son, porque siempre nos han apoyado, los amo.

A mis tios y primos porque con sus consejos y enseñanzas me mostraron formas alternativas de ver la vida, por estar al pendiente de mi familia, por tenerlos juntos, felices y mostrarnos su cariño sin medida.

A mis primos Gabriela Reyes Nuñez y Diego Tadeo Reyes Moreno por todos los momentos juntos, porque desde la infancia nos hemos querido y apoyado (a pesar de nuestros tropiezos), porque nuestro cariño lo puede todo, los amo con todo mi corazón.

A Don Pepe (Q.E.P.D.) y Sarita por haberme cuidado y procurado desde que era muy pequeño, por quererme tanto y ser mi guía. Por mostrarme el buen lado de la vida, por todas las anécdotas y hermosos momentos que viví a su lado.

A mi querida y adorada “Kappi”, Karina Vela Cariño, por toda tu amistad, por todo el cariño, por ser la persona que con cualquier cosa logra sacarme una sonrisa, por levantarme cuando estaba de rodillas, por elevarme cuando estaba de pie, por nunca dejarme caer. Eres mi amiga, mi confidente, mi apoyo, sin importar que estés lejos de mi, siempre te querré con todo mi corazón. Te adoro mi kappi.

A Daniela Balderas Cordero, por su incondicional apoyo desde que la conocí, por ser la persona que más he amado. Gracias por haber compartido tantos momentos, risas, sueños y esperanzas conmigo; por todos tus consejos y las largas charlas sobre nuestros temores y debilidades. Desde que te conocí cambiaste mi vida y me has ayudado a ser mejor persona día a día, te quiero mucho.

A mi amigo Adrian Estrada “Padrino”, con quien he compartido mi vida e inquietudes, quien me ha mostrado una amistad sincera. De las pocas personas en las que he podido confiar plenamente, gracias por tu amistad querido amigo, que esto continúe muchos años más.

A la profesora Ariadna Reyes Mata, mi colega y amiga que me enseñó las maravillas de esta hermosa carrera que es la biología, que me apoyó, me guió y siempre estuvo al pendiente de mi desarrollo como biólogo, gracias.

A la Dra. Claudia Tzasna (Doc. Nani) por haberme aceptado en su laboratorio, por confiar y creer en mi aún sin conocerme. Porque en usted encontré una tutora, amiga y ejemplo a seguir. Gracias por todas las oportunidades, enseñanzas que me brindó y las anécdotas que compartió conmigo, pero sobretodo por su confianza y cariño. La quiero mucho doc Nani y siempre llevaré su ejemplo de trabajo y ser humano conmigo.

A la M. en C. Marisol Avila Romero por el apoyo, dedicación y perseverancia en mi trabajo de tesis, por estar al pie del cañon conmigo, por nunca rendirse y por hacerme más amenos los largos días de trabajo en el laboratorio. Por ser una increíble persona que no solo se preocupaba por mi trabajo de tesis, sino por mi persona y mi sentir, en usted encontré una gran profesionista, una gran profesora

y una increíble amiga. Gracias maestra Marisol, siempre llevaré sus enseñanzas, consejos y a usted en mi corazón.

A la Dra. Ana María García Boreas (Doc. Anita) por todas sus valiosas aportaciones no solo a mi trabajo, sino también a mi vida, por ayudarme en momentos de crisis nerviosas, por las pláticas motivacionales, por los consejos en muchos ámbitos de mi vida, pero sobre todo por ser una persona tan linda conmigo. Por darme excelentes recomendaciones y siempre predicar con el ejemplo, mi más sincero cariño y admiración hacia usted.

A la Dra. Rocío Serrano Parrales por todas las charlas en el laboratorio, las risas y el apoyo. Gracias por confiar en mí y permitirme trabajar con usted, gracias por siempre procurar mejorar mi trabajo y ayudarme a ser un mejor estudiante y persona. Fue un placer haberla conocido.

Al Dr. Guillermo Avila por sus contribuciones a mi trabajo y a mi conocimiento, por las buenas charlas y la convivencia, por siempre compartir sus experiencias y vivencias, enseñándonos que solo hace falta creer para hacerlo realidad. Gracias por su apoyo y por compartirnos de esa alegría, energía y entusiasmo que lo caracterizan.

A las profesoras Vanny Cuevas y Angélica Mendoza por siempre estimular mi creatividad e imaginación, por ser tan lindas conmigo y por enseñarme a “salir de contexto”, por confiar en mi trabajo y en mí, por haberme dado todo su cariño y siempre hacerme sonreír, profesoras las quiero mucho a ambas, son un gran ejemplo de persona y profesional, siempre las llevaré conmigo y espero poder seguir contando con su valiosa presencia y amistad.

A la señora Bety, la Maestra July y la Dra. Montse por todos sus ánimos, por siempre inyectarme energía y entusiasmo, por convivir y compartir con todos nosotros el conocimiento, experiencias y anécdotas, por hacer nuestras tardes más amenas y agradables.

A todos mis colegas, compañeros y amigos de los laboratorios Farmacognosia-Fitoquímica, Fernanda, Kay, Pedro, Zul, Carito, Miguel, Karen, Itzia, Erick, Ernesto, Dr. Israel, Viri, Lucy, Andrea, Selene, Cristina, Angel, Sebastian y Miguel por apoyarme, ayudarme, enseñarme, animarme y hacer que mis días fueran únicos y muy divertidos, fue un placer para mi conocerlos y trabajar con ustedes.

A mis amigos de CUDEC: Irving, Richard, Johan, Andrea (mi wera querida), Laura, Daniela, Abigail y Viri gracias por siempre estar ahí conmigo, por sus palabras de aliento y su amistad, siempre estuvieron a mi lado y yo siempre estaré para ustedes.

A todos mis profesores, colegas y amigos de la carrera con quienes viví muchas experiencias; a los que quise y querré por siempre, que tengan mucho éxito en sus vidas y nada los detenga.

*Cuando el objetivo te parezca difícil, no cambies de objetivo,
busca un nuevo camino para llegar a él*

Confucio

*Por muy dura que nos parezca la vida, mientras haya vida, hay
esperanza...*

Stephen Hawking

Índice general	
Introducción	1
Antecedentes	6
Justificación	9
Hipótesis	9
Objetivo general	10
Objetivos particulares	10
Metodología	11
1. Obtención de los compuestos	11
2. Evaluación de la actividad antibacteriana	11
2.1 Microorganismos a utilizar	11
2.2 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	11
2.3 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	12
2.4 Curvas de crecimiento bacteriano	12
3. Evaluación de la actividad antifúngica	13
3.1 Microorganismos a utilizar	13
3.2 Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica	13
3.3 Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica	13
4. Evaluación de la interacción fármaco-dinámica entre compuestos	14
5. Evaluación de la toxicidad general	14
Resultados y análisis	15
Discusión	32
Conclusiones	45
Apéndices	46
Apéndice I. Estructura química de los compuestos	46
Apéndice II. Método de difusión en agar de Kirby-Baüer	46
Apéndice III. Técnica de macrodilución en caldo de Koneman	49
Apéndice IV. Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento	51
Apéndice V. Método de inhibición del crecimiento radial en hongos	52
Apéndice VI. Método de toxicidad general	53
Referencias	54

Índice de figuras

Figura 1a.	Efecto del α pineno sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i> .	21
Figura 1b.	Efecto del (-) β pineno sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i> .	21
Figura 2a.	Efecto del α pineno sobre la curva de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> .	22
Figura 2b.	Efecto del (-) β pineno sobre la curva de crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> .	23
Figura 3.	Actividad antifúngica cualitativa del α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ sobre las diferentes levaduras.	26
Figura 4.	Efecto del α pineno sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i>	28
Figura 5.	Efecto de (-) β pineno sobre la curva de crecimiento de <i>C. glabrata</i> .	28
Figura 6.	Porcentaje de sobrevivencia de las larvas de <i>A. salina</i> para α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$	30
Figura 7.	Toxicidad de (-) β pineno sobre <i>A. salina</i>	31

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Actividad antibacteriana de α pineno, (-) β pineno, α : β y cloramfenicol sobre las cepas bacterianas Gram positivas.	16
Cuadro 2.	Actividad antibacteriana de α pineno, (-) β pineno, α : β y cloramfenicol sobre las cepas bacterianas Gram negativas.	17
Cuadro 3.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de α pineno, (-) β pineno y α : β , sobre cepas bacterianas Gram positivas.	17
Cuadro 4.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de α pineno, (-) β pineno y α : β sobre cepas bacterianas gram negativas.	19
Cuadro 5.	Actividad antifúngica del α pineno, (-) β pineno y α : β sobre cepas de hongos levaduriformes.	25
Cuadro 6.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CFM) de α pineno, (-) β pineno y α : β sobre cepas de hongos levaduriformes.	27
Cuadro 7.	Toxicidad general de α pineno, (-) β pineno y α : β en modelo de <i>Artemia salina</i> y determinación de la CL_{50} .	30

RESUMEN

Los pinenos (α y β) son hidrocarburos monoterpénicos presentes en los aceites esenciales. Estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido vinculados con múltiples usos tales como insecticidas y antimicrobianos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de α y (-) β pineno, así como determinar el tipo de interacción que ejercen al combinarse en proporción 1:1 (α : β). La actividad antimicrobiana cualitativa se evaluó por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer sobre 20 cepas de bacterias y tres de hongos levaduriformes. La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se llevó a cabo por el método de dilución en caldo. Como resultado se obtuvo que α y (-) β pineno inhibieron el crecimiento de ocho cepas bacterianas Gram positivas. Los compuestos además inhibieron el crecimiento de bacterias Gram negativas (α pineno tres cepas; (-) β pineno cuatro cepas). La combinación de los compuestos α : β mostró actividad sobre cuatro cepas bacterianas Gram positivas y seis Gram negativas. Las especies bacterianas más susceptibles fueron *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Vibrio cholerae* ATCC 39540 (CMI = 1.5 mg/mL de ambos compuestos; 3.0 mg/mL de α -pineno; 1.0 mg/mL de (-) β pineno). Para la combinación 1:1 los valores de CMI sobre las cepas bacterianas susceptibles fueron mayores a 4.0 mg/mL; la especie más susceptible fue *Vibrio cholerae* ATCC 39540 (CMI = 2.0 mg/mL). Los compuestos mostraron actividad antifúngica al inhibir las tres cepas de hongos levaduriformes; *C. glabrata* fue la especie más susceptible (CMI = 0.75 mg/mL de α pineno; 0.5 mg/mL de (-) β pineno y 3.0 mg/mL de la combinación α : β). Los resultados muestran que los compuestos α y (-) β pineno presentan por separado mayor actividad antimicrobiana, en comparación con la combinación α : β , por lo cual dicha combinación de los compuestos evaluados presentan efectos antimicrobianos antagónicos y de indiferencia.

El ensayo de toxicidad general en modelo de *Artemia salina* reveló que α pineno y α : β son considerados como extremadamente tóxicos; por su parte (-) β pineno mostró una CL_{50} de 484.44 μ g/mL siendo catalogado como moderadamente tóxico.

INTRODUCCIÓN

El término “sinergismo” hace referencia a un tipo de interacción no simbiótica en la cual organismos, sustancias e incluso moléculas diferentes interactúan entre sí para potencializar su efecto sobre algún sustrato. Aunado a ello este concepto puede usarse para hablar de interacciones tanto farmacológicas como toxicológicas que aumenten el efecto biológico de las sustancias en cuestión (OMS, 1997; OSMAN, 1997; Pascuzzo-Lima, 2008).

El estudio de la interacción entre diversas sustancias y moléculas han cobrado un gran auge en años recientes, esto debido a la creciente necesidad de encontrar tratamientos más eficaces para combatir las numerosas enfermedades bacterianas y fúngicas que en la actualidad continúan teniendo repercusión en la salud de los humanos.

Las enfermedades microbianas son hoy en día un importante problema de salud pública, ya que algunas de ellas se encuentran dentro de las diez principales causas de muerte tanto en México como a nivel mundial (INEGI, 2013).

Las infecciones diarreicas, respiratorias inferiores y la tuberculosis son tres de las diez principales causas de mortalidad en el mundo; además en México y diversos países en vías de desarrollo tenemos a estas mismas enfermedades, solo reemplazando la tuberculosis por la neumonía como las más destacadas causas de morbilidad y mortalidad (Solórzano-Santos y Miranda-Novales, 1998; OMS, 2012).

Las enfermedades bacterianas actualmente se tratan con agentes antimicrobianos, los cuales pueden definirse como sustancias producidas de manera natural por una o varias especies de microorganismos (ya sean hongos, bacterias o actinomicetos), o artificialmente por medios químicos. Estos agentes suprimen el crecimiento de otros organismos (bacteriostáticos) y eventualmente pueden destruirlos (bactericidas) (Camacho, s/a; Forbes *et al.*, 2009).

Cada antimicrobiano cuenta con un sitio de acción para atacar a la célula bacteriana; siendo tan diversos los sitios de acción como los tipos de antimicrobianos existentes; no obstante los mecanismos y estructuras microbianas más afectadas por estos son la síntesis de la pared celular, la membrana celular, la síntesis de proteínas, DNA y RNA. Es por ello que se emplean para inhibir el crecimiento y eliminar la población bacteriana perjudicial (Forbes *et al.*, 2009).

En los años recientes se han desarrollado diversos antimicrobianos con mecanismos de acción y espectros de actividad variados. No obstante, las infecciones bacterianas siguen siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial; esto se debe a un fenómeno denominado resistencia bacteriana. La resistencia se da por alteraciones fisiológicas y/o estructurales de la célula a causa de cambios en la composición genética habitual de un microorganismo (resistencia adquirida) o por el estado normal genético, estructural o fisiológico de un microorganismo sin que este sufra ninguna alteración (resistencia intrínseca) (Daza, 1998; Sussmann *et al.*, s/a).

Las bacterias utilizan diferentes vías que les permiten tener resistencia a los agentes antimicrobianos; estas vías generalmente involucran la destrucción, alteración enzimática, disminución de la captación, acumulación intracelular o modificación del sitio de acción del fármaco administrado (Daza, 1998; Forbes *et al.*, 2009).

Las alteraciones en las células bacterianas son en gran parte resultado del abuso y mala utilización de los agentes antimicrobianos durante años, lo cual trae como resultado la resistencia de las mismas frente a diversos antimicrobianos; este hecho ha propiciado el empleo de sustancias microbicidas de última generación e inclusive mezclas de los mismos para potencializar sus efectos (Romero, 2007). Sin embargo los costos de los medicamentos así como sus múltiples efectos adversos, que pueden ir desde una pequeña intolerancia gastrointestinal hasta un elevado grado de hepatotoxicidad, anemia e insuficiencia renal, vuelven a los medicamentos combinados una alternativa poco confiable y costosa (ReAct, 2014).

Las plantas medicinales han constituido el tratamiento tradicional por excelencia a nivel mundial y su estudio puede desembocar en el descubrimiento de nuevos principios activos que permitan combatir las diferentes enfermedades microbianas que aún persisten en la actualidad con gran incidencia e impacto (Hernández *et al.*, 2006).

Los habitantes del Valle de Tehuacán-Cuicatlán tienen un gran conocimiento de las plantas medicinales de la zona. Aunado a ello, este lugar cobra importancia por contener entre el 10 y el 11.4% de la flora mexicana, de la cual, más de una cuarta parte tiene algún uso por parte de las comunidades indígenas que ahí habitan (Hernández *et al.*, 2006).

El estudio de las plantas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán se ha enfocado principalmente en la búsqueda de compuestos con potente efecto antimicrobiano que representen una opción viable de tratamiento para las personas de escasos recursos. Algunas de las que han demostrado actividad antimicrobiana son *Lantana achyranifolia*, *Lippia graveolens*, *Acalypha monostachya*, *Alternanthera caracasana* y *Caesalpinia melanadenia* entre otros (Hernández *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006).

Debido a la gran cantidad de plantas aromáticas, medicinales y lo mencionado anteriormente, en los últimos años se ha propiciado una exhaustiva investigación y búsqueda de compuestos naturales, derivados del conocimiento empírico y uso tradicional de las plantas, que permitan combatir las diversas enfermedades de posible origen infeccioso, de manera más eficaz, segura y con menos efectos adversos a un costo relativamente bajo.

Las plantas medicinales, como se ha venido mencionando, representan una alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades de origen microbiano; estas sintetizan una variedad de moléculas conocidas como “metabolitos secundarios”. Estos compuestos pueden tener funciones ecológicas tales como: atrayentes o repelentes de animales e insectos, proteger a las plantas contra la

herviboría confiriéndoles sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas y actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

Los aceites esenciales son una mezcla de metabolitos secundarios de bajo peso molecular constituidos por fenoles, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres e hidrocarburos; son productos volátiles de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los cuales les confieren un aroma agradable (Bassolé y Juliani, 2012). Se caracterizan por ser lipofílicos y solubles en solventes orgánicos, generalmente son incoloros, su densidad es menor que la del agua, presentan índices de refracción elevados, se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos (Kuklinski, 2000).

La importancia de los aceites esenciales no solo es por su valor y papel ecológico para beneficio de las plantas; estos tienen un importante valor económico y medicinal por utilizarse en la industria alimentaria, en la perfumería y en productos de limpieza por sus propiedades aromáticas. Además de esto, sus propiedades farmacológicas como antisépticos, antiespasmódicos, sedantes, cicatrizantes, analgésicos y más importante aún, como antimicrobianos los vuelven sustancias de gran interés para la industria farmacéutica (Kuklinski, 2000).

El grupo de metabolitos secundarios que compone mayoritariamente a los aceites esenciales son los terpenos, los cuales se ha reportado que son los más abundantes con más de 4,000 moléculas distintas; estos a su vez se dividen en 5 subtipos y su división está ligada con el número de carbonos presentes en su estructura, teniendo así a hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, di, tri y tetraterpenos con 5, 10, 15, 20, 30 y 40 carbonos respectivamente. No obstante, los aceites esenciales solo se encuentran terpenos de cadenas cortas como lo son los monoterpenos y los sesquiterpenos (Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Medina, 2011).

Los hidrocarburos monoterpénicos son las moléculas más representativas en los aceites esenciales por constituir el 90% de ellos. En la actualidad se tiene el registro y conocimiento de más de mil moléculas distintas; es por ello y por sus

propiedades curativas, que los hidrocarburos cobran una alta relevancia (Medina, 2011).

Dentro de los hidrocarburos monoterpénicos se encuentran los pinenos (como el α -pino y el β -pino), los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza. α pino es considerado el monoterpeno más abundante y químicamente explotado por varias industrias; no obstante se ha visto que ambos se encuentran especialmente en las esencias obtenidas de los organismos del género *Pinus* (Cruz *et al.*, 2014).

Los pinenos han sido vinculados con múltiples aplicaciones dentro de las que destacan: su actividad insecticida contra un importante número de plagas agrícolas, su actividad fungicida y antimicrobiana; además son utilizados para producir fragancias y saborizantes útiles para la industria alimenticia (Rivas *et al.*, 2012).

La importancia, abundancia y actividad antimicrobiana mostrada por estos dos compuestos frente a bacterias Gram positivas y negativas, así como las interacciones probadas con compuestos como el limoneno (Cruz *et al.*, 2014), hace de los pinenos un objeto de estudio relevante para comprobar tanto su actividad antimicrobiana como su posible efecto sinérgico contra infecciones bacterianas.

Por lo tanto en el presente trabajo se pretende usar estos compuestos para potencializar su efecto debido a la similitud en su estructura química, ya que por un lado se ha demostrado que compuestos con estructuras químicas similares presentan mecanismos de acción parecidos, lo cual podría incrementar su efecto (Bassolé y Juliani, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que combinaciones de hidrocarburos monoterpénicos muestran un efecto de adición o sinergismo bacteriano (García-García y Palou-García, 2008).

ANTECEDENTES

Algunos trabajos reportados en los que se evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos α y β pineno (Apéndice 1), así como pruebas hechas con aceites esenciales en los que estos compuestos son los más abundantes o principales constituyentes, así como un trabajo de interacción entre el α pineno y el limoneno.

Cruz y cols. en el 2014 realizaron una evaluación de los compuestos de aceites esenciales α pineno y limoneno contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* utilizando concentraciones de 5% y 15% de los compuestos por separado y en conjunto. Como resultados se obtuvo que el tratamiento con α pineno al 15% fue el tratamiento más efectivo contra *S. aureus*. Además se menciona que la combinación presentó un efecto antagonista, ya que al realizar las combinaciones el efecto inhibitorio fue menor al mostrado por el α pineno de manera individual.

Dai y colaboradores en el 2013 determinaron la composición química así como la actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de *Wedelia prostrata* en el cual determinaron un total de 70 compuestos en el aceite, siendo el limoneno y el α -pineno los dos más abundantes. Motivo por el cual se comparó el efecto de manera individual mostrando que el α -pineno tiene actividad antimicrobiana mayor que la del aceite esencial con halos de inhibición de 20.7 a 22.3 mm y una concentración mínima inhibitoria (CMI) con valores de 62.5 a 125 $\mu\text{g/mL}$.

Rivas y cols. en el 2012 realizaron un trabajo sobre la actividad biológica de los enantiómeros del α y β pineno. Estos mostraron efecto antimicrobiano contra bacterias y hongos con una CMI con rango de 117 a 1,450 $\mu\text{g/mL}$, por su parte el efecto bactericida se mostró a partir de las 6 horas en *S. aureus* resistente a la metilicina.

Afolayan y Ashafa en el 2009 determinaron la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Chrysocoma ciliata* L. En el

determinaron que el aceite estaba compuesto por 37 compuestos, siendo el α y el β pineno los más abundantes porcentualmente hablando. El aceite inhibió el crecimiento del 70% de las bacterias a concentraciones relativamente bajas, siendo la CMI de 0.08 a 2.5 mg/mL.

Jamshidi y colaboradores en 2009 estudiaron la composición química de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L. entre 2 zonas geográficas de Irán. Encontraron que α -pineno es el componente más abundante en el aceite, representando entre 43 y 46% de abundancia. Por su parte, el β -pineno se presenta como un componente minoritario cuya abundancia en los aceites es de 1.9%.

Jeong-Ho y colaboradores en el 2008 realizaron un estudio sobre la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de los conos de *Pinus koraiensis*. El aceite esencial fue usado contra bacterias Gram positivas, negativas y hongos, además se identificaron un total de 87 compuestos siendo el limoneno (27.90%), α pineno (23.89%), β pineno (12.02%), 3-careno (4.95%) y β -mirceno (4.53%) los más abundantes dentro del aceite esencial. Para concluir el aceite esencial tuvo una actividad antimicrobiana significativa contra *Cryptococcus neoformans* y *Candida glabrata* en concentraciones de 0.136 y 0.545 mg/mL respectivamente.

Hernández y colaboradores en el 2008 realizaron un trabajo sobre la actividad antifúngica del aceite esencial de dos verbenáceas: *Lantana achyranthifolia* y *Lippia graveolens* de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Encontraron que el aceite de *L. graveolens* presentó mayor actividad y que 2.54% del aceite esencial correspondía al β -pineno, siendo el quinto compuesto más abundante.

Medeiros y cols. en el 2007 evaluaron el efecto inhibitorio de β -pineno, α -pineno y eugenol en el crecimiento de la infección potencial de endocarditis causada por bacterias Gram positivas utilizando soluciones que van de los 160 a los 1.25 μ L/mL. La CMI oscila entre los 2.5 y los 40 μ L/mL. Aunado a ello, los efectos inhibitorios más intensos se mostraron por parte del β -pineno y el eugenol, los

cuales causaron la eliminación total del inóculo inicial a las ocho horas de exposición.

Sonboli y colaboradores en el 2006 realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana de seis constituyentes del aceite esencial de *Salvia santolinifolia*, teniendo como compuestos más abundantes al α -pineno (72.4%), β -pineno (6.6%) y limoneno (5.3%) respectivamente. Además se determinó la actividad antimicrobiana del α -pineno sobre *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* y del β -pineno sobre las mismas bacterias además de *Enterococcus faecalis* con una CMI de 2.5 mg/mL.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que pocos son los estudios que se han realizado sobre el α -pineno y el β -pineno se tiene comprobado su efecto antimicrobiano sobre bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas y algunos hongos, no obstante aún no se conoce como estos compuestos pueden comportarse al ser mezclados y utilizados contra diversas cepas bacterianas.

Aunado a ello, esto permite tener una idea de la forma en la que los compuestos podrían interaccionar entre sí en el tratamiento de diferentes enfermedades y si este efecto aumenta o disminuye en comparación con el uso de los compuestos utilizados por separado.

HIPÓTESIS

Si el α -pineno y el β -pineno presentan actividad antimicrobiana confirmada, se ha visto que compuestos estructuralmente similares presentan mecanismos de acción antimicrobiana muy parecido y que los hidrocarburos monoterpénicos muestran efectos sinérgicos al ser combinados, entonces se espera que el tratamiento con una mezcla de α -pineno y (-) β pineno tenga un efecto sinérgico y su efecto antimicrobiano por ende se potencialice.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el posible efecto sinérgico de los compuestos α -pineno y (-) β pineno en la actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✘ Determinar cualitativa y cuantitativamente el efecto antibacteriano del α pineno y (-) β pineno.
- ✘ Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad antifúngica de α pineno y (-) β pineno en levaduras y hongos miceliados.
- ✘ Identificar el efecto del α pineno y (-) β pineno sobre las curvas de crecimiento de poblaciones de cepas Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos miceliados más sensibles.
- ✘ Determinar de manera cualitativa la actividad antimicrobiana de una combinación de α pineno y (-) β pineno en proporción 1:1.
- ✘ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de la combinación 1:1
- ✘ Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM) de la combinación 1:1
- ✘ Identificar el tipo de interacción entre los compuestos y obtener el Índice de Correlación Fraccionada (ICF).
- ✘ Analizar la toxicidad del α pineno, (-) β pineno y la combinación 1:1.

METODOLOGÍA

Obtención de α y β -Pino

El α y (-) β pino fueron obtenidos de "Sigma Aldrich", los cuales presentan los siguientes números de catálogo: α -pino (#CAT 147524) y (-) β pino (#CAT 112089).

BIOENSAYOS

Actividad antibacteriana

Microorganismos a utilizar

Las bacterias empleadas en los bioensayos pertenecen al Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, las cepas a utilizar son

Bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 14756, *S. aureus* 23MR, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* cc, *S. aureus* CUSI y *S. aureus* FES-C; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *S. epidermidis* FES-C; *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 y *Micrococcus luteus* ATCC 10240a

Bacterias Gram-negativas: *Vibrio cholerae* ATCC 39540, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Enterobacter gergoviae* ATCC 33028, *Escherichia coli* CUSI y *E. coli* 82M; *Salmonella tify* ATCC 19430, *Salmonella enterica* ATCC 7251, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Serratia marcescens* ATCC 14756.

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en agar Kirby-Bauer (Koneman, 1996) y cada ensayo se realizó por triplicado. Los sensibilizadores fueron impregnados con 3.432 mg de α -pino y (-) β pino por separado; estos miligramos estuvieron contenidos en 4 μ L de los

compuestos puros, como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo se usaron 3 µL de aceite de oliva estéril (Apéndice 1). Para el ensayo de interacción entre los compuestos se utilizó la misma concentración de 3.432 mg/mL por sensidisco, solo que se agregaron a los sensidiscos una mezcla de ambos compuestos con la proporción 1:1 (α : β), siendo los 4 µL el volumen total y teniendo 2 µL de cada compuesto.

Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM), se determinó utilizando la técnica de dilución en caldo (Picazo, 2000). Cada ensayo se realizó por triplicado. Las concentraciones para cada bioensayo fueron de 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.06 mg/mL de α -pineno y (-) β pineno por separado. Para el ensayo de interacción entre ambos componentes se utilizaron las mismas concentraciones pero utilizando ambos compuestos en una proporción de 1:1 (α : β). El cloramfenicol fue utilizado como control positivo a diferentes concentraciones (Apéndice 2).

Efecto de los compuestos α y (-) β pineno sobre la curva de crecimiento de microorganismos

Para la evaluación de las curvas de crecimiento se llevó a cabo el método propuesto por Kubo y colaboradores en 1996 (Modificado por Ávila en 1996). En ella se evaluaron las dos cepas bacterianas más sensibles (una Gram positiva y otra Gram-negativa) contra la $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM además de un testigo; contabilizando el número de sobrevivientes por UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en un total de 24 horas divididas en 9 tiempos para los compuestos separados (Apéndice 3).

Actividad antifúngica

Microorganismos a utilizar:

Los hongos filamentosos y levaduras utilizados en los bioensayos pertenecen al Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM teniendo las siguientes:

Hongos miceliados:

Trichophyton metagrophytes CDBB-H-1112, *Aspergillus niger* Fisiología vegetal FESI, *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265 y *F. sporitrichum* Fisiología vegetal FESI.

Levaduras:

Candida albicans 17 MR, *Candida glabrata* cc y *C. tropicalis* cc.

Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

Para esta prueba se realizó el método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002); para ello se utilizaron sensidiscos impregnados con 3.432 mg de los compuestos puros contenidos en 4 μ L, el control negativo fueron 3 μ L de aceite de olivo estéril; como control positivo se colocaron 10 μ g de ketoconazol (Apéndice 4). Finalmente, para la evaluación de la actividad antifúngica sobre los hongos levaduriformes se llevaron a cabo los mismos métodos que para bacterias pero usando medio “agar papa dextrosa” (PDA) y como control positivo nistatina (20 μ g /disco).

Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica

Para la evaluación de la actividad antifúngica cuantitativa sobre los hongos levaduriformes se llevó a cabo el mismo método que para las bacterias pero utilizando como medio de cultivo el agar PDA.

Evaluación de la interacción entre los compuestos α y (-) β pineno

Para determinar el tipo de interacción entre α y (-) β pineno al combinarlos en el tratamiento $\alpha:\beta$ se utilizó el Índice de Correlación Fraccionada (ICF) (Sierra *et al.*, 2011) A continuación se muestra la fórmula del ICF :

$$\Sigma ICF = \frac{CMI \text{ de } \alpha: \beta}{CMI \text{ de } \alpha - \text{ pineno}} + \frac{CMI \text{ de } \alpha: \beta}{CMI \text{ de } (-)\beta - \text{ pineno}}$$

Dependiendo del valor obtenido, se considerará:

Sinergismo si $ICF \leq 0.5$, adición si $ICF > 0.5$ y ≤ 1.0 , indiferencia si $ICF > 1$ y < 4 , finalmente antagonismo si $ICF \geq 4$.

Evaluación de la toxicidad general por el modelo de *Artemia salina* (Leach).

El ensayo se realizó con larvas nauplio de *Artemia salina* (Leach), colocando 10 larvas en frascos de vidrio transparente con 10 mL de solución de NaCl 0.5% cada uno. En ellos se agregaron las concentraciones de 10, 100 y 1,000 $\mu\text{g/mL}$ de α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ respectivamente, todos los ensayos se realizaron por triplicado. Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado para disolver los compuestos problema. Los cultivos se mantuvieron bajo luz blanca durante 24 hrs a temperatura ambiente (23- 25 °C).

Las larvas sobrevivientes fueron cuantificadas, finalmente se obtuvo la concentración letal media (CL_{50}) para cada compuesto, graficando el porcentaje de sobrevivencia contra la concentración en $\mu\text{g/mL}$ a través del análisis de regresión lineal (McLaughlin *et al.*, 1991) (Apéndice 5).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Evaluación de la actividad antibacteriana

Evaluación cualitativa

Los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se muestran en los cuadros 1 y 2. Se pueden apreciar las bacterias que presentaron susceptibilidad a los compuestos α pineno, (-) β pineno, así como una combinación 1:1 de ambos (α : β) y el control positivo utilizado.

De las 21 cepas bacterianas probadas solo 16 mostraron halos de inhibición; de ellas, 8 cepas bacterianas son Gram negativas y 8 Gram positivas; estas últimas se encuentran representadas en su mayoría por el género *Staphylococcus*.

La actividad antibacteriana de α : β es ligeramente menor que sus componentes separados, siendo activo sobre 10 cepas bacterianas. α y (-) β pineno fueron activos sobre 11 y 12 cepas respectivamente, pero las bacterias sobre las que tuvieron efecto los tres tratamientos no son las mismas.

Las cepas bacterianas sobre las cuales α y (-) β pineno tuvieron efecto son prácticamente las mismas, solamente difieren en *S. marcescens* que fue inhibida por α pineno y no por (-) β pineno. Las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles a ambos tratamientos por presentarse 8 cepas susceptibles, no así con las Gram negativas que fueron activos en 4 cepas para (-) β pineno y 3 cepas para α pineno (Cuadros 1 y 2).

El efecto de los compuestos separados se muestra moderadamente superior que cuando están juntos; α : β tiene actividad sobre nueve cepas bacterianas de las cuales solamente seis son compartidas con los compuestos separados (4 Gram positivas y 2 Gram negativas).

El tratamiento α : β tuvo actividad sobre 4 cepas que anteriormente no se inhibían con los compuestos separados, siendo 3 Gram negativas y 1 Gram positiva las cepas susceptibles y dando una actividad final de α : β de 5 cepas Gram positivas y

5 Gram negativas. De las cuatro cepas bacterianas Gram negativas inhibidas por α y (-) β pineno solamente dos fueron susceptibles al tratamiento α : β , teniendo así una pérdida de efecto sobre 2 cepas (Cuadro 2).

Finalmente, la actividad antibacteriana sobre cepas Gram positivas disminuyó en α : β , ya que cuatro de las ocho cepas inhibidas inicialmente por los compuestos separados no fueron susceptibles a la combinación de estos; de las cuatro cepas restantes casi todas las cepas susceptibles a α : β ya eran susceptibles a α y/o β pineno a excepción de *M. luteus* (Figura 1).

Cuadro 1. Actividad antibacteriana de α pineno, (-) β pineno y α : β sobre cepas bacterianas Gram positivas

Cepa bacteriana	α Pineno	(-) β Pineno	α : β	Cloramfenicol
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	8.00 \pm 1.00	9.33 \pm 0.57	n.a.	10.6 \pm 0.5
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	n.a.	n.a.	6.00 \pm 0.00	32.0 \pm 0.0
<i>S. aureus</i> 23MR	6.66 \pm 0.57	9.00 \pm 1.00	6.64 \pm 0.57	19.3 \pm 0.5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	6.83 \pm 0.28	7.33 \pm 1.15	7.23 \pm 1.52	15.3 \pm 0.5
<i>S. aureus</i> cc	7.00 \pm 0.00	6.33 \pm 0.57	n.a.	13.0 \pm 0.0
<i>S. aureus</i> CUSI	7.00 \pm 0.00	6.66 \pm 0.28	n.a.	18.0 \pm 2.0
<i>S. aureus</i> FES-C	6.33 \pm 0.57	6.00 \pm 0.00	6.31 \pm 0.57	19.6 \pm 0.5
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	7.00 \pm 0.00	6.50 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	19.6 \pm 0.5
<i>S. epidermidis</i> FES-C	8.66 \pm 0.57	7.00 \pm 1.00	n.a.	13.0 \pm 0.0
Promedio	7.18 \pm 0.71	7.26 \pm 1.16	6.43 \pm 0.46	17.8 \pm 5.91

Halos de inhibición en mm. Valores promedio de tres repeticiones \pm D.E. Cloramfenicol (25 μ g/disco). Los discos se impregnaron con 4 μ L de α y (-) β pineno. (n.a = no activo.)

Cuadro 2. Actividad antibacteriana de α pineno, (-) β pineno y α : β sobre cepas bacterianas Gram negativas

Cepa bacteriana	α Pineno	(-) β Pineno	α : β	Cloramfenicol
<i>E. coli</i> ATCC 82MR	n.a.	n.a.	6.00 \pm 0.00	18.6 \pm 0.9
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	n.a.	n.a.	6.00 \pm 0.00	17.6 \pm 0.5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	6.50 \pm 0.00	6.50 \pm 0.00	6.16 \pm 0.28	17.6 \pm 0.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n.a.	n.a.	6.00 \pm 0.00	n. a.
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	6.00 \pm 0.00	6.00 \pm 0.00	n.a.	16.6 \pm 1.2
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	n.a.	6.50 \pm 0.00	n.a.	15.6 \pm 0.9
<i>V. cholerae</i> ATCC 39540	8.83 \pm 1.04	10.50 \pm 1.00	11.81 \pm 2.64	25.6 \pm 0.5
Promedio	5.77 \pm 2.83	7.37 \pm 1.81	7.19 \pm 2.30	18.6 \pm 3.2

Halos de inhibición en mm. Valores promedio de tres repeticiones \pm D.E. Cloramfenicol (25 μ g/ disco). Los discos se impregnaron con 4 μ L de α y (-) β pineno. (n.a = no activo.)

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos en la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se muestran en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de α pineno, (-) β pineno y α : β , sobre cepas bacterianas Gram positivas.

Cepas bacterianas	α Pineno		(-) β Pineno		α : β	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	ICF
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	>4	>>4	1.5	2.0	n.a	A (P)
<i>M. luteus</i> ATCC 10240a	n.a	n.a	n.a	n.a	4.0	S
<i>S. aureus</i> 23MR	4.0	>4.0	4.0	>4.0	4.0	I
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>4.0	>>4.0	1.5	2.0	4.0	I
<i>S. aureus</i> cc	2.0	3.0	>4.0	>>4.0	n.a	A (P)
<i>S. aureus</i> CUSI	2.0	3.0	1.0	1.5	n.a	A (P)
<i>S. aureus</i> FES-C	3.0	4.0	3.0	4.0	4.0	I
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	1.5	2.0	1.5	2.0	4.0	A
<i>S. epidermidis</i> FES-C	2.0	3.0	1.5	2.0	n.a	A (P)

Interacción de los compuestos representada como ICF, donde A (P): Antagonismo con pérdida de efecto, S: Sinergismo, A: Antagonismo e I: Indiferencia. Resultados reportados en mg/mL. (n.a: No activo).

En el cuadro 3 se puede observar que la bacteria más sensible a α y (-) β pineno fue *S. epidermidis* ATCC12228 con una CMI y CBM de 1.5 y 2.0 mg/mL para ambos compuestos.

Al comparar el efecto de ambos compuestos se puede notar que se requiere de una menor cantidad de (-) β pineno que de α pineno para inhibir el crecimiento de estas bacterias, teniendo así que se requieren de 1.5 mg/mL de (-) β pineno para inhibir el crecimiento de la mayoría de las cepas, mientras que de α pineno se requieren de 2 a 3 mg/mL para tener el mismo efecto.

El efecto inhibitorio que ejercen α y (-) β pineno varía de acuerdo a la cepa en la que actúa, ya que mientras α pineno no inhibió ni a *S. aureus* ATCC 29213 ni a *E. faecalis* ATCC 14506 a una concentración de 4 mg/mL, (-) β pineno inhibió su crecimiento con 1.5 mg/mL. En contraste (-) β pineno no impidió la proliferación de la cepa *S. aureus* cc a 4 mg/mL mientras que α pineno inhibió el crecimiento bacteriano de esta cepa a una concentración de 2.0 mg/mL. Ambos compuestos fueron activos frente a las cepas restantes de *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Las CMI del tratamiento $\alpha:\beta$ determinadas para las diferentes cepas Gram positivas se muestran en el cuadro 3. Además se muestra el ICF que hace referencia al tipo de interacción que se da entre los compuestos frente a las diferentes cepas bacterianas.

La prueba cuantitativa de la actividad antibacteriana de $\alpha:\beta$ dio como resultado que este tratamiento fue activo sobre 5 cepas bacterianas, logrando inhibir su crecimiento a una concentración de 4 mg/mL.

Las cepas bacterianas que se muestran no activas frente a $\alpha:\beta$ si fueron inhibidas por los compuestos separados a concentraciones de entre 1.5 y 3 mg/mL, por lo cual, se obtuvo un efecto antagónico con una total pérdida de efecto .

La actividad antibacteriana de $\alpha:\beta$ se obtuvo en las cepas de *S. aureus* 23 MR, ATCC 292213, FES-C, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *M. luteus* ATCC 10240a; la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 mostró sensibilidad a $\alpha:\beta$ a 4.0 mg/mL; esta fue

la cepa más sensible a los compuestos separados, por lo cual la interacción entre ambos compuestos es antagónica.

Las cepas de *S. aureus* sensibles al tratamiento $\alpha:\beta$ a 4.0 mg/mL, anteriormente eran inhibidas por α y (-) β pineno a concentraciones de entre 1.5 y 4.0 mg/mL, sin embargo el valor del ICF demuestra que la interacción dada entre los compuestos es de indiferencia.

Finalmente la cepa de *M. luteus* ATCC 10240a que no había mostrado sensibilidad al tratamiento con α y (-) β pineno fue inhibida por $\alpha:\beta$ a la concentración de 4.0 mg/mL, es por lo anterior que se concluye que la interacción entre los compuestos frente a *M. luteus* es de tipo sinérgico.

Cuadro 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM) de α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ sobre cepas bacterianas gram negativas.

Cepas bacterianas	α Pineno		β Pineno		$\alpha:\beta$	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	ICF
<i>E. coli</i> 82MR	n.a	n.a	n.a	n.a	4.0	S
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	n.a	n.a	n.a	n.a	4.0	S
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	3.0	4.0	2.0	3.0	4.0	I
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n.a	n.a	n.a	n.a	4.0	S
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	3.0	4.0	2.0	3.0	n.a	A (P)
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	n.a	n.a	>4.0	>>4.0	n.a	A (P)
<i>V. cholerae</i> ATCC 39540	0.25	0.5	0.25	0.5	2.0	A

Interacción de los compuestos representada como ICF, donde A (P): Antagonismo con pérdida de efecto, S: Sinergismo, A: Antagonismo e I: Indiferencia. Resultados reportados en mg/mL. n.a: No activo

El cuadro 4 muestra los valores de CMI y CBM de α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ sobre las cepas Gram negativas; *V. cholerae* ATCC 39540 es la cepa más sensible para los tres tratamientos ya que su crecimiento es inhibido a

concentraciones de 0.25 para α y (-) β pineno y 2.0 mg/mL para $\alpha:\beta$. El efecto bactericida se da a una concentración de 0.5 mg/mL de α y (-) β pineno.

La concentración requerida para inhibir el crecimiento bacteriano es menor para (-) β pineno que para α pineno, del primero se requieren 2.0 mg/mL y del segundo 3.0 mg/mL para producir el mismo efecto. Además el cuadro 4 muestra que (-) β pineno fue activo sobre cuatro cepas, mientras que solo tres cepas fueron sensibles al α pineno.

De las 4 cepas bacterianas inhibidas por α y (-) β pineno *S. enterica* ATCC 7251 y *S. marcescens* ATCC 14756 no fueron sensibles a $\alpha:\beta$, por lo cual se obtuvo un efecto antagónico con la total pérdida de inhibición del crecimiento bacteriano. *V. cholerae* ATCC 39540 a pesar de ser la cepa más sensible al tratamiento con $\alpha:\beta$ también sufrió un efecto antagónico por requerir más concentración para inhibir el crecimiento que la requerida por sus componentes separados.

La actividad antimicrobiana de α y (-) β pineno sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883 se mantuvo al utilizar la combinación $\alpha:\beta$, por lo cual al obtener el ICF se determinó que la interacción entre los compuestos es de indiferencia.

En las bacterias Gram negativas se dio un mayor número de sinergismos que en las Gram positivas; $\alpha:\beta$ inhibió el crecimiento de tres cepas que inicialmente no se mostraban sensible a α pineno y (-) β pineno. Las cepas bacterianas *E. coli* 82MR, *K. oxytoca* ATCC 8724 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 mostraron sensibilidad frente a la combinación $\alpha:\beta$ a una concentración de 4mg/mL.

Los efectos antagónicos, indiferentes y sinérgicos toman gran relevancia para conocer la interacción entre los componentes de aceites esenciales. A pesar de que estos compuestos mostraron una interacción antagónica frente a *V. cholerae* ATCC 39540 esta fue la cepa más sensible del tratamiento $\alpha:\beta$, ya que solo requiere de 2.0 mg/mL para inhibir su crecimiento.

Los resultados del ensayo de la curva de crecimiento para *S. epidermidis* ATCC 12228 se muestran en las figuras 1a para α pineno y 1b para (-) β pineno.

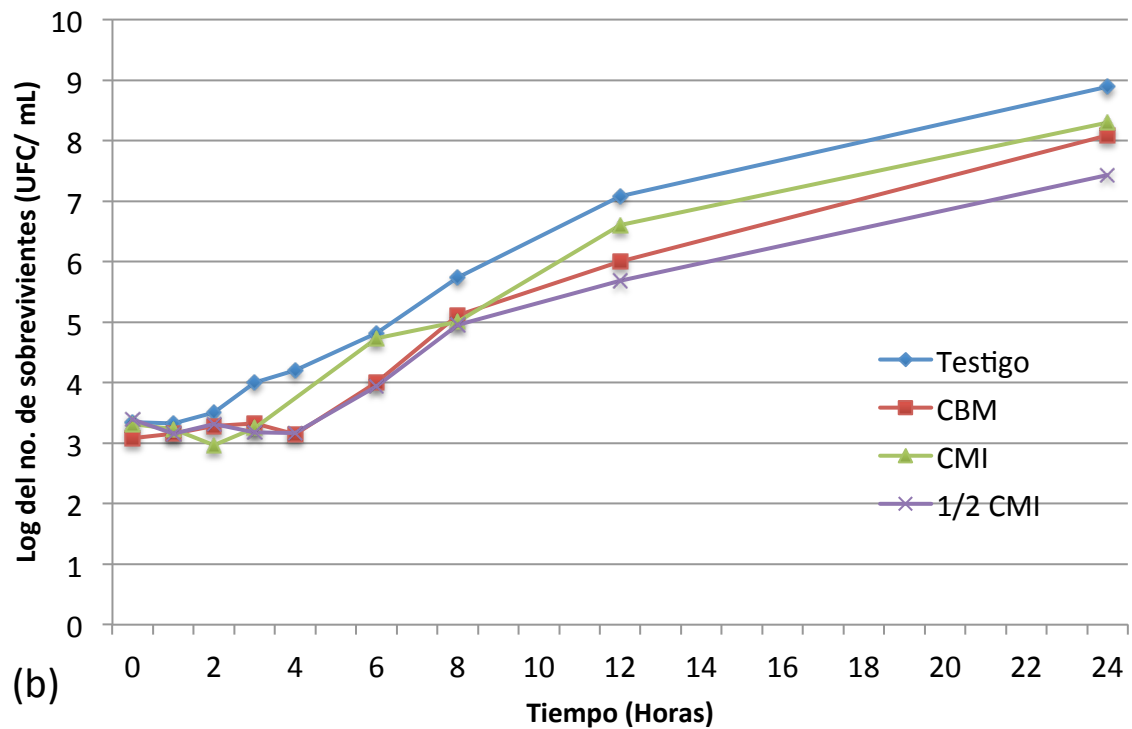
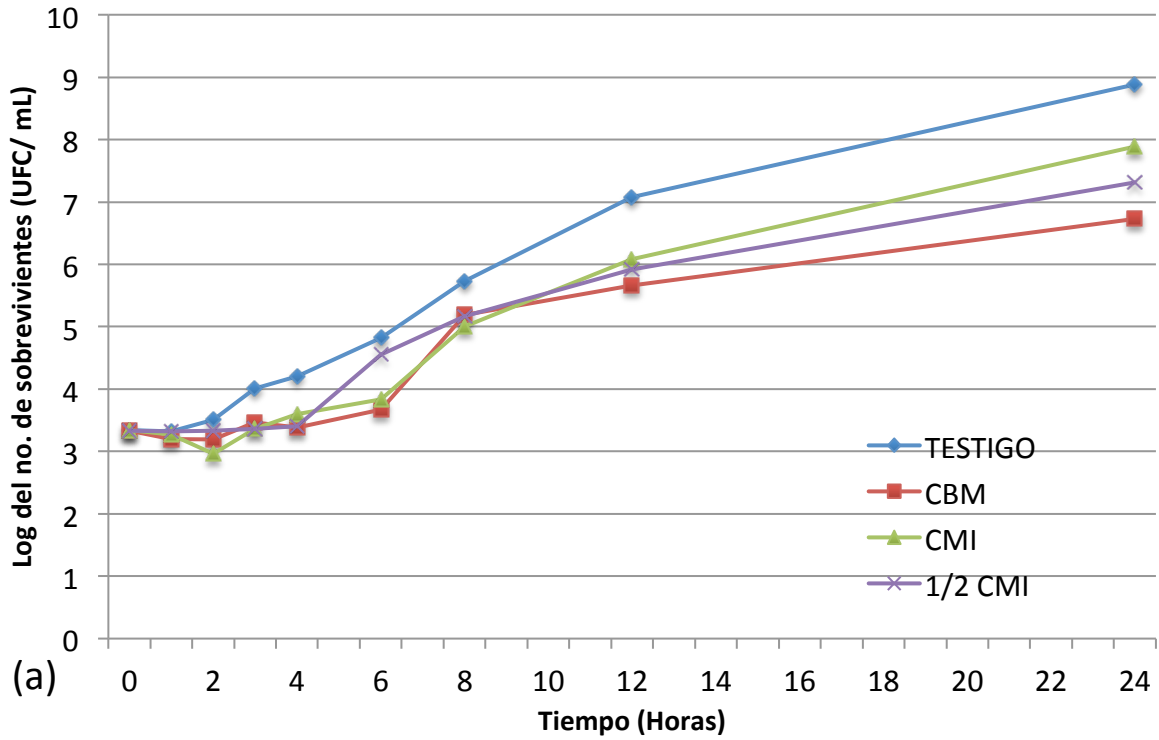
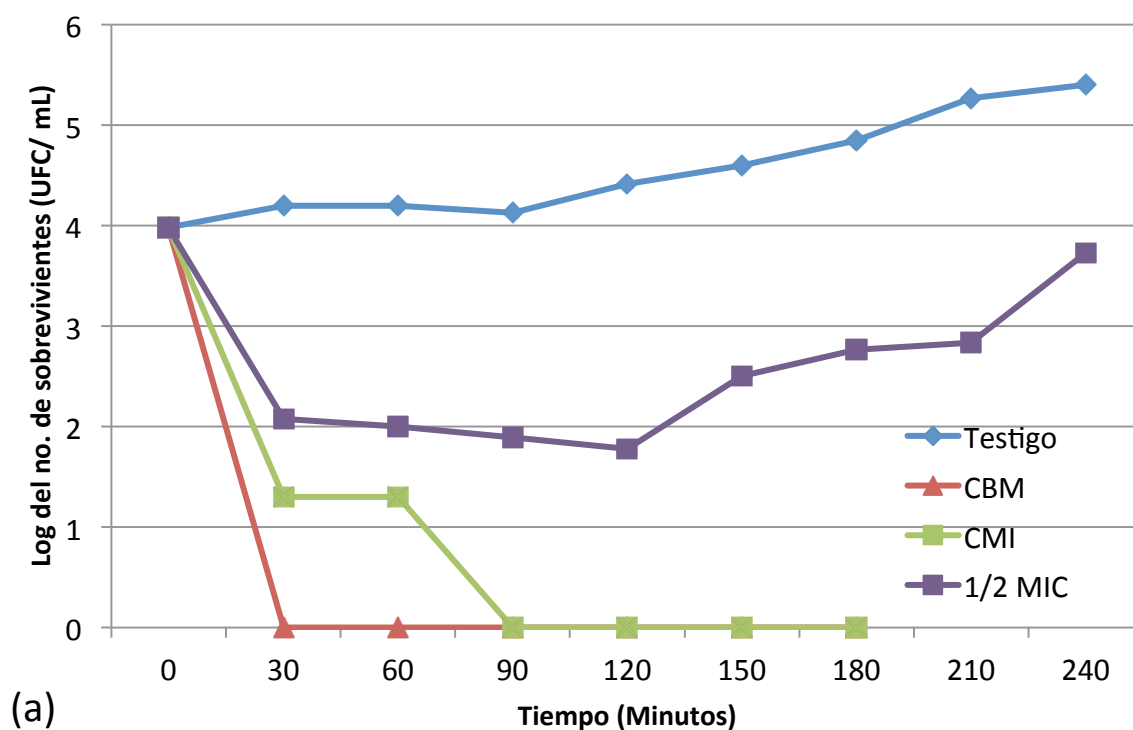


Figura 1. Efecto del α pineno (a) y del (-) β pineno (b) sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* a concentraciones de CBM, CMI y $\frac{1}{2}$ CMI (2.0 mg, 1.5 mg y 1.0 mg/mL respectivamente).

El efecto de ambos compuestos en el crecimiento de *S. epidermidis* ATCC 12228 es de tipo bacteriostático, lo que quiere decir que no elimina a la población bacteriana, pero imposibilita su proliferación exponencial en el medio de cultivo en las primeras 4 y 6 horas.

Las curvas de crecimiento muestran que el efecto α pineno es más efectivo que el que ejerce (-) β pineno al inhibir a *S. epidermidis* ATCC 12228, haciendo evidente que el efecto de éste último es menos prolongado en todos los tratamientos, ya que inhibe el crecimiento durante 4 horas; no así con α pineno que puede inhibir el crecimiento bacteriano de esta cepa por 6 horas.

Los resultados para *V. cholerae* ATCC 39540 se muestran en las figuras 2a para α pineno y 2b para (-) β pineno.



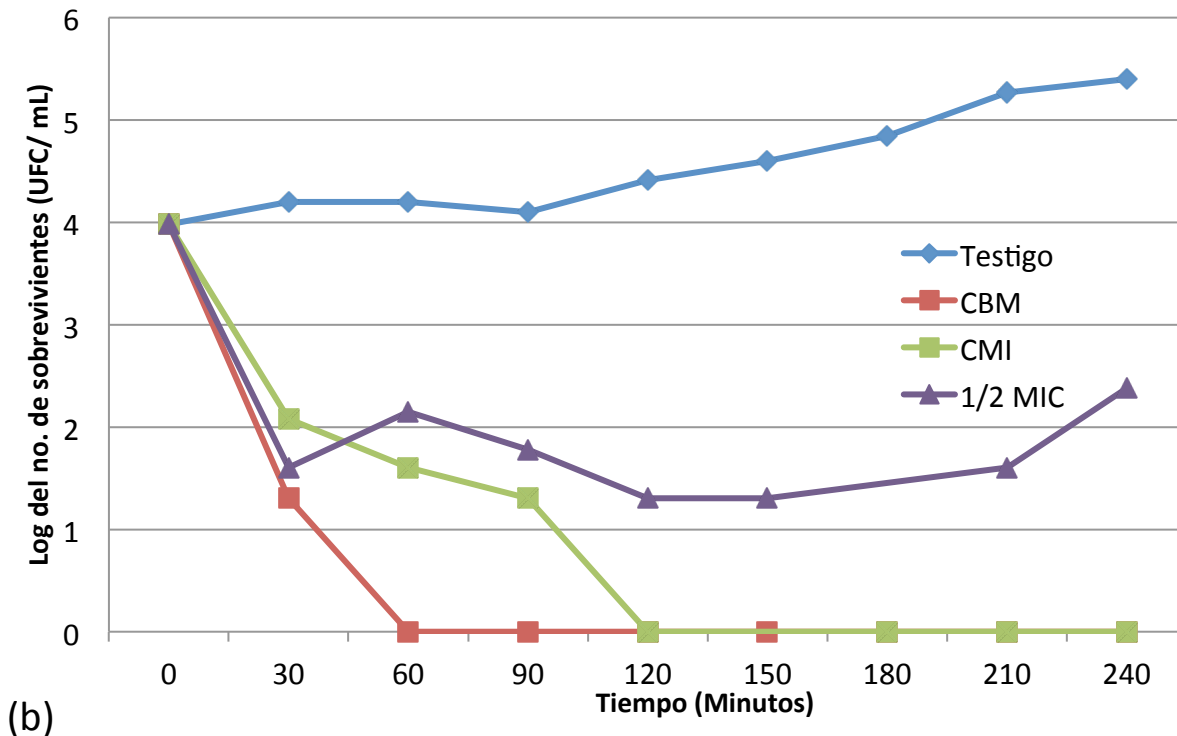


Figura 2. Efecto del α pineno (a) y del (-) β pineno (b) sobre la curva de crecimiento de *Vibrio cholerae* ATCC 39540 a concentraciones de CBM, CMI y $\frac{1}{2}$ CMI (0.5 mg, 0.25 mg y 0.125 mg/mL respectivamente).

El efecto bactericida mostrado sobre *V. cholerae* ATCC 39540 y las concentraciones bajas utilizadas en las curvas de crecimiento señalan que esta cepa bacteriana es la más sensible a ambos compuestos; lo cual es evidente ya que se requiere un intervalo de tiempo de 30 a 120 minutos para que ambos compuestos a concentraciones de CBM y CMI inhiban completamente a esta cepa.

El α pineno es más eficaz como antibacteriano al utilizarse contra *V. cholerae*, ya que la CMI inhibió el crecimiento de esta cepa a los 90 minutos de iniciado el experimento mientras que (-) β pineno requirió de un tiempo de 120 minutos, teniendo nuevamente que el primer compuesto es más activo que el segundo.

La sensibilidad de las cepas bacterianas probadas muestran una clara inhibición o efecto bactericida por parte de (-) β pineno, lo cual se traduce en una concentración menor para lograr este efecto.

A pesar de que en la mayoría de los casos las CMI más bajas se mostraron con (-) β pineno, en las cepas utilizadas en las curvas de crecimiento donde las concentraciones de CMI son las mismas para ambos compuestos, se puede apreciar que el α pineno logró inhibir en menor tiempo el crecimiento bacteriano de *V. cholerae* ATCC 39540.

En cuanto al comportamiento de *S. epidermidis* ATCC12228 al ser tratado con ambos compuestos se puede apreciar que α pineno mostró un efecto bacteriostático durante 6 horas, mientras que (-) β pineno lo tuvo durante 4 horas, siendo el primero más eficaz que el segundo.

Los datos anteriores sugieren que α pineno es más efectivo y que el efecto de ambos compuestos depende en parte de la cepa bacteriana y de cómo interaccionan con ella.

Evaluación de la actividad antifúngica

Evaluación cualitativa

El α , (-) β y la interacción $\alpha:\beta$ no tienen actividad antifúngica en las cuatro cepas de hongos miceliados evaluados.

El ensayo cualitativo del efecto de los compuestos α , (-) β pineno y $\alpha:\beta$ sobre cepas de hongos levaduriformes muestran que las tres cepas probadas son susceptibles a todos los tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad antifúngica del α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ sobre cepas de hongos levaduriformes.

Cepa fúngica	α Pineno	(-) β Pineno	$\alpha:\beta$	Nistatina
<i>C. albicans</i> 17MR	15.00 \pm 0 .00	20.00 \pm 0.00	12.32 \pm 0.57	28.0 \pm 2.4
<i>C. glabrata</i>	10.00 \pm 0.00	12.66 \pm 0.57	12.65 \pm 0.57	19.0 \pm 1.6
<i>C. tropicalis</i>	9.16 \pm 0.28	10.66 \pm 1.15	11.65 \pm 0.57	20.3 \pm 0.4

Halos de inhibición en mm. Valores promedio de tres repeticiones \pm D.E. Nistatina (25 μ g/ disco). Los discos se impregnaron con 4 μ L de α , (-) β pineno y $\alpha:\beta$.

El (-) β pineno y $\alpha:\beta$ son los tratamientos más activos sobre *C. glabrata* y *C. tropicalis*, además, su efecto es muy similar; no así con *C. albicans* ATCC 17MR donde (-) β pineno fue el tratamiento significativamente más activo (Figura 3).

La combinación $\alpha:\beta$ es el tratamiento menos eficaz para inhibir a la cepa *C. albicans* ATCC 17MR, a pesar de tener comportamiento similar a (-) β pineno en las cepas restantes.

El tratamiento de α pineno es el que menos inhibe el crecimiento de *C. glabrata* y *C. tropicalis*; la actividad antifúngica de este compuesto sobre *C. albicans* ATCC 17MR es mayor que $\alpha:\beta$ pero menor que la mostrada por (-) β pineno, siendo así el segundo más activo en esta levadura.

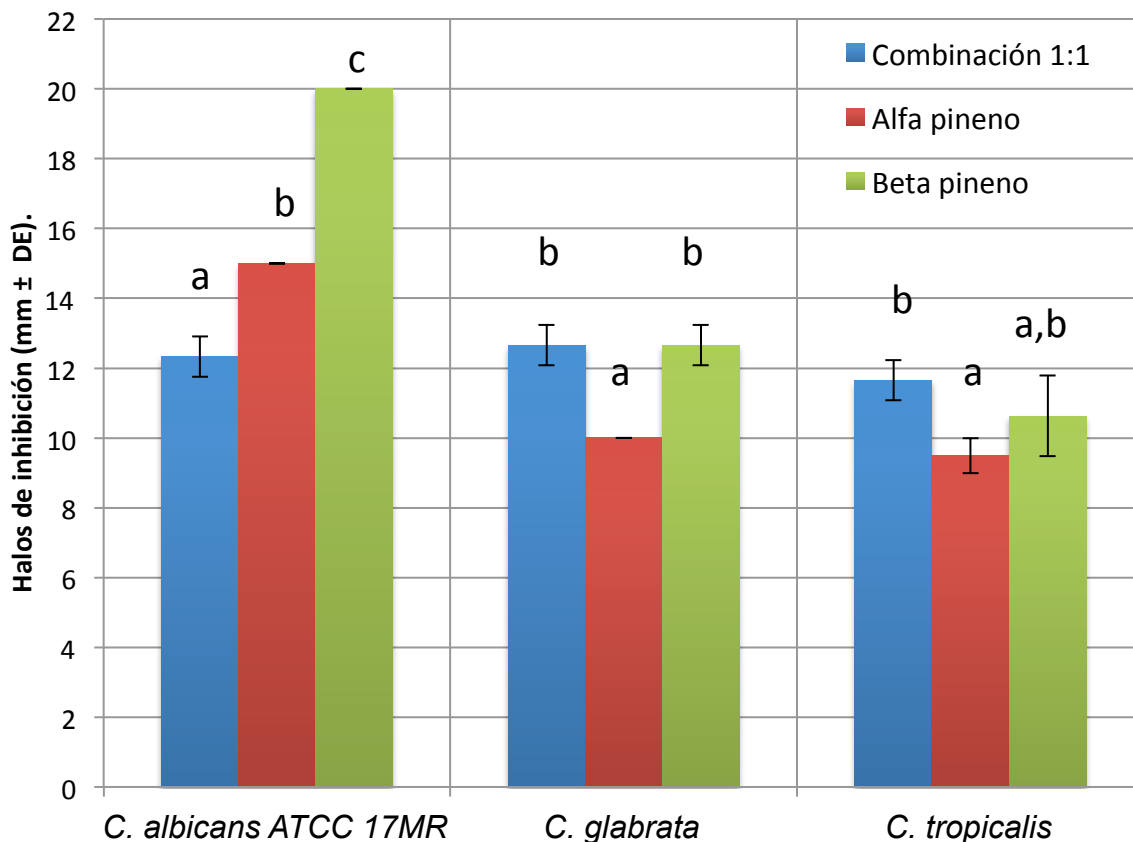


Figura 3. Actividad antifúngica cualitativa del α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ sobre hongos levaduriformes. Valores promedio de tres repeticiones \pm DE. Letras refieren a diferencias significativas entre tratamientos por levadura. a= menos activo, c= más activo (Análisis de anova $F^{0.05}_{2,7}$ Prueba LSD $T^{0.025}_7$).

Evaluación cuantitativa

Los ensayos cuantitativos de la actividad antifúngica aplicados a los hongos levaduriformes muestran la mayor sensibilidad en las cepas tratadas con (-) β pineno donde la CMI y CFM es más baja que en los demás tratamientos (Cuadro 6).

La cepa más sensible fue *C. glabrata*, la cual presenta una CMI y CFM de 0.5 y >4 mg/mL. para α pineno, 0.5 y 3.0 mg/mL. para (-) β pineno y 3.0 mg/mL para $\alpha:\beta$.

La segunda levadura más sensible fue *C. albicans* 17MR que frente a los tres tratamientos mostró una CMI y CFM de 1.5 y >4.0 mg/mL para α pineno, 0.75 y 1.0 mg/mL para (-) β pineno y 3.0 mg/mL para $\alpha:\beta$.

C. tropicalis es la cepa menos sensible al α , (-) β pineno y α : β con CMI y CFM de 2.0 y > 4.0 mg/mL, 0.75 y 1.0 mg/mL y 3.0 mg/mL respectivamente.

Las cepas de *Candida* muestran el mismo patrón que las cepas bacterianas, en las que (-) β pineno es más activo que α pineno; se puede apreciar que el efecto de los compuestos separados es mayor en hongos levaduriformes que en cepas bacterianas, ya que la mayoría de los valores de CMI determinadas se encuentran en un rango de 0.5 a 2.0 mg/mL.

La comparación de la actividad antifúngica de α pineno, (-) β pineno y α : β muestra que los compuestos son más activos cuando están separados que cuando interaccionan. Por lo tanto, su efecto frente a las tres especies de *Candida* es de tipo antagonista, la CMI determinada para todas las cepas es de 3.0 mg/mL, por lo que se requiere una mayor concentración de α : β que de los compuestos puros para inhibir el crecimiento fúngico.

Cuadro 6. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y concentraciones fungicidas mínimas (CFM) de α pineno, (-) β pineno y α : β sobre cepas de hongos levaduriformes.

Cepa fúngica	α Pineno		(-) β Pineno		α : β	
	CMI	CFM	CMI	CFM	CMI	ICF
<i>C. albicans</i> 17MR	1.5	>4	0.75	1.0	3.0	A
<i>C. glabrata</i>	0.75	>4	0.5	3.0	3.0	A
<i>C. tropicalis</i>	2.0	>4	0.75	1.0	3.0	A

Interacción de los compuestos representada como ICF, donde A (P): Antagonismo con pérdida de efecto, S: Sinergismo, A: Antagonismo e I: Indiferencia. Datos reportados en mg/mL. n.a: No activo

El ensayo de la curva letal de crecimiento se realizó sobre *C. glabrata* por ser la cepa más sensible a los compuestos separados, los resultados se muestran en las figuras 4 para α pineno y 5 para (-) β pineno; ya que no se calculó la CFM para α pineno por ser >4.0 mg/mL se probaron 8.0 mg/mL como CFM.

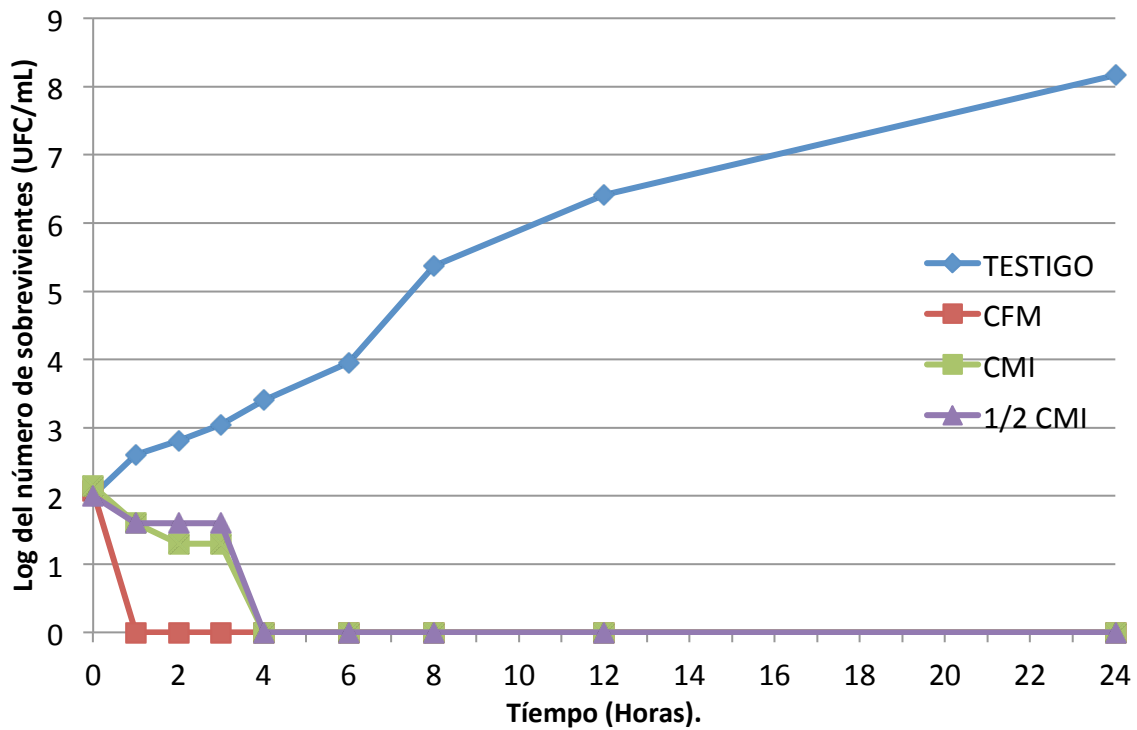


Figura 4. Efecto del α pineno sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de CFM, CMI y $\frac{1}{2}$ CMI (8 mg, 0.75 mg y 0.5 mg/mL respectivamente).

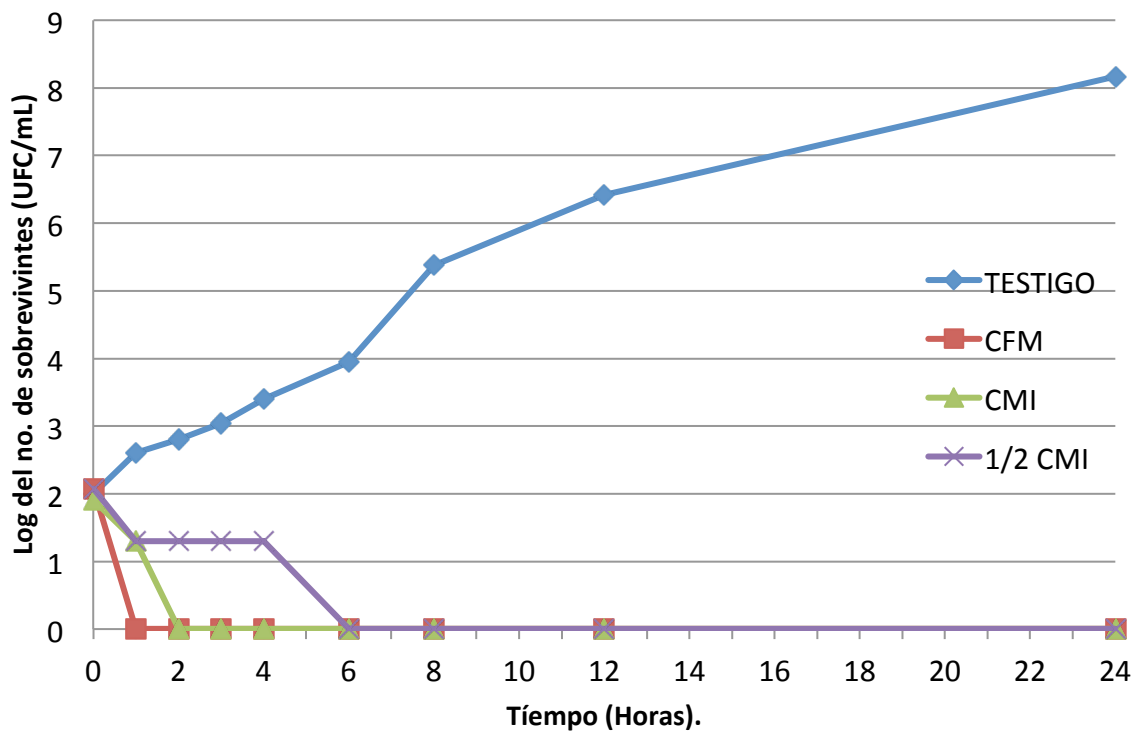


Figura 5. Efecto de (-) β pineno sobre la curva de crecimiento de *C. glabrata* a concentraciones de CFM, CMI y $\frac{1}{2}$ CMI (3 mg, 0.5 mg y 0.25 mg/mL respectivamente).

El efecto que ambos compuestos tienen sobre *C. glabrata* es de tipo fungicida, todas las concentraciones son capaces de eliminar la población fúngica unas horas después de iniciado el experimento (Figuras 5 y 6).

La actividad fungicida de α pineno sobre *C. glabrata* a concentraciones iguales a CBM eliminó a la población inicial a la hora de iniciado el experimento; en contraste, la $\frac{1}{2}$ CMI y la CMI tuvieron un comportamiento similar, ya que produjeron la eliminación de la población fúngica a las cuatro horas de exposición, no sin antes actuar como fungistáticos en las tres horas anteriores.

La actividad antifúngica de (-) β pineno es similar a la de α pineno, todos las concentraciones probadas eliminan la población inicial; la CFM produjo la destrucción total de la población fúngica una hora después de aplicado el tratamiento, la CMI tuvo el mismo efecto a la hora siguiente, finalmente la $\frac{1}{2}$ CMI actuó como agente fungistático por 4 horas y posteriormente tuvo un efecto fungicida sobre *C. glabrata*.

La diferencia en tiempos y concentraciones requeridas para eliminar la población inicial nos muestra que (-) β pineno requiere menor cantidad de ambos para eliminar a *C. glabrata* en sus tratamientos con CFM y CMI, confirmando así que este compuesto es más activo y eficaz contra esta levadura.

Ensayo de toxicidad general

Los resultados obtenidos para el ensayo de toxicidad en *A. salina* de α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$ se muestran en el cuadro 7 junto con la determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de los tres tratamientos.

El porcentaje de sobrevivientes de los tratamientos a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$ se muestra en la figura 7 y el gráfico de toxicidad con el análisis de regresión lineal y la determinación de la CL₅₀ de (-) β pineno se encuentran en la figura 8.

Cuadro 7. Toxicidad general de α pineno, (-) β pineno y α : β en modelo de *Artemia salina*.

Compuesto	CL ₅₀
α pineno	nd
(-) β pineno	484.44
α : β	nd

Valores promedio de 3 repeticiones. Resultados expresados en $\mu\text{g}/\text{mL}$. nd = no determinado.

La determinación de la CL₅₀ solo pudo realizarse para (-) β pineno, esta es de 484.446 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para los tratamientos de α pineno y α : β no se calculó este dato porque a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ambos tenían menos del 50 por ciento de sobrevivientes como se muestra en la figura 7.

El número de sobrevivientes de α pineno a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ es de 45.83%, por su parte el tratamiento α : β tuvo un porcentaje de sobrevivencia de larvas de *A. salina* del 41.66% a la misma concentración. Debido a ello se infiere que la CL₅₀ está por debajo de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos tratamientos y que ambos compuestos son más tóxicos que (-) β pineno.

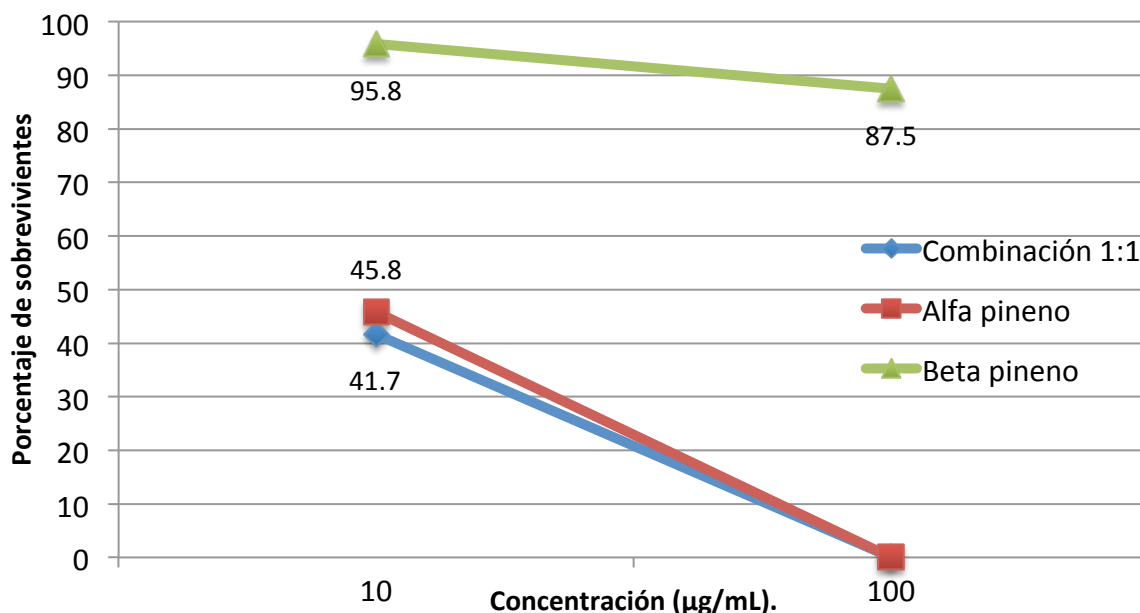


Figura 6. Porcentaje de sobrevivencia de las de *A. salina* para α pineno, (-) β pineno y α : β a concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

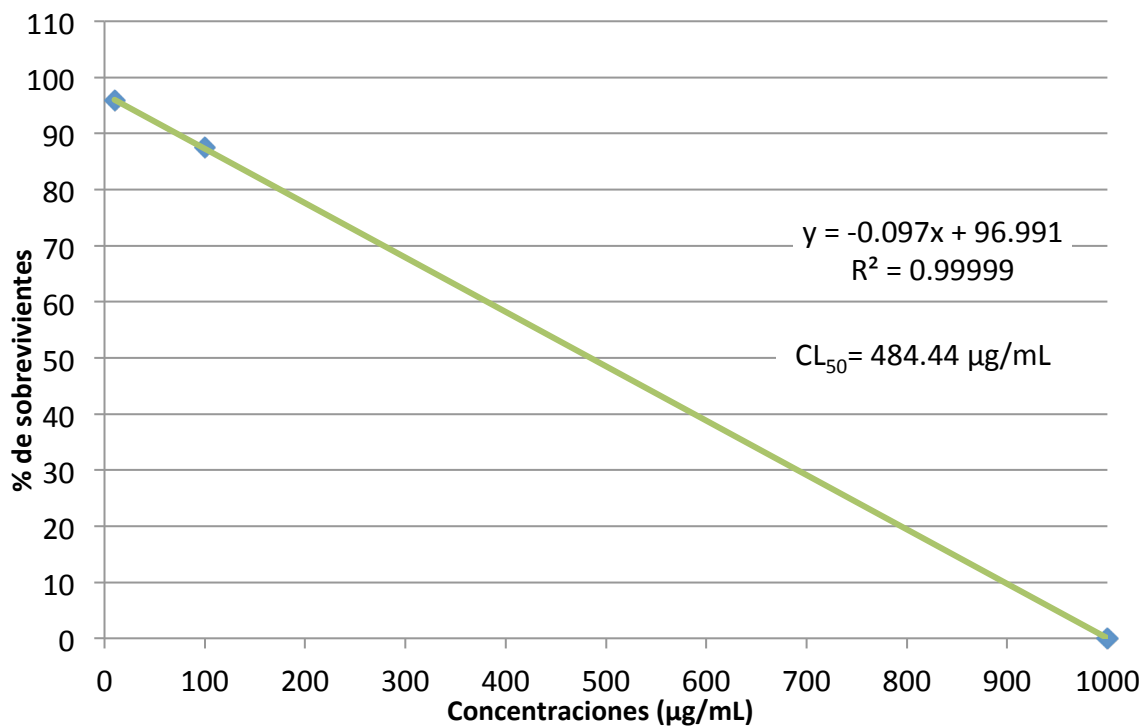


Figura 7. Análisis de la toxicidad de (-) β pineno a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/ mL, determinación de la CL₅₀ mediante el análisis de regresión lineal.

El tratamiento con (-) β pineno es el menos tóxico de todos los tratamientos por ser el único al que se le determinó la CL₅₀, en relación al porcentaje de sobrevivencia de las larvas del *A. salina* el α pineno es el segundo menos tóxico por ser más las larvas que sobrevivieron a este compuesto; finalmente el tratamiento α:β es el más tóxico por tener el menor porcentaje de sobrevivencia de las larvas a la concentración de 10 µg/mL.

DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana

De las 21 cepas bacterianas sometidas al α y (-) β pineno, solo 12 mostraron sensibilidad; 8 fueron Gram positivas, 3 Gram negativas para α pineno y 4 para (-) β pineno, teniendo así un mayor efecto sobre las primeras por parte de ambos compuestos.

Las diferencias estructurales en la envoltura celular de ambos grupos bacterianos vuelven a las cepas Gram positivas, más sensibles al efecto de los aceites esenciales que su contraparte negativa (Abdenour *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2012). La envoltura celular de las bacterias Gram negativas es más compleja que la de las Gram positivas; la presencia de una membrana externa es una de las características que diferencia a las primeras de las segundas (Nazarro *et al.*, 2013).

La baja sensibilidad de las cepas bacterianas Gram negativas a constituyentes de los aceites esenciales y a los aceites mismos es atribuida a la presencia de la membrana externa (ME) y a la unión de esta con la membrana interna (MI) por lipopolisacáridos (LPS). Esta ME es impermeable, aunque no por completo, a diversas moléculas lipofílicas que pueden atravesarla, lo cual vuelve a las bacterias Gram negativas más resistente a los aceites esenciales y otros extractos naturales con actividad antimicrobiana (Nazarro *et al.*, 2013).

La elevada actividad de α y (-) β pineno hacia las cepas bacterianas Gram positivas se deben a que la pared celular no supone una resistencia hacia los compuestos lipofílicos, lo cual le permitiría a ambos compuestos penetrar fácilmente a la célula y actuar tanto a nivel de pared celular y membrana, como de citoplasma (Nazarro *et al.*, 2013; Bakkali *et al.*, 2007).

La información bibliográfica de la actividad antimicrobiana de α pineno demuestra que este compuesto presenta actividad antibacteriana sobre cepas Gram positivas como Meticilina-resistente *S. aureus* (MRSA) (Cruz *et al.*, 2014), *S. aureus*, *S.*

epidermidis, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* (Medeiros *et al.*, 2007) y *Bacillus subtilis* (Wang *et al.*, 2012).

La inhibición de cepas Gram negativas por acción de α pineno se ha reportado en *E. coli*, *P. aeruginosa* (Wang *et al.*, 2012), *Clostridium sporogenes*, *Citrobacter freundii*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella pullorum* (Dorman y Deans, 2000).

El efecto antimicrobiano de (-) β pineno no puede ser comparado con ningún otro estudio ya que el único antecedente en el que se mide la actividad de este compuesto es el de Rivas y colaboradores en el 2012 donde reportan que los enantiómeros negativos α y β pineno no son activos a concentraciones menores o iguales a los 20 mg/mL. Este dato no concuerda con el presente trabajo, ya que en (-) β pineno es activo sobre cepas Gram positivas y negativas, siendo incluso más activo que el α pineno a menores concentraciones.

La actividad de α pineno y (-) β pineno sobre cepas Gram positiva se dio principalmente en el género *Staphylococcus*. En él se determinaron valores de CMI entre los 2 y los 4 mg/mL. Esto concuerda con lo reportado por Rivas y colaboradores en el 2012, donde obtuvieron para MRSA una CMI de 4.150 mg/mL. Medeiros y colaboradores en el 2007 obtuvieron CMI para 2 cepas de *S. epidermidis* de 4 mg/mL. No obstante muchas cepas de *S. aureus* han sido tratadas *in vitro* con α pineno mostrando CMI desde 5 mg/mL hasta 15 mg/mL.

Los rangos tan elevados y heterogéneos de concentraciones requeridas para inhibir el crecimiento de diversas cepas de *S. aureus* sugiere que el efecto ejercido no solo depende del compuesto, sino también del microorganismo a probar, lo cual dificulta predecir la susceptibilidad, no solo de una especie de bacteria, sino de varias cepas de dicha especie contra un mismo aceite esencial o constituyente de este (Duarte *et al.*, 2012; Nazarro *et al.*, 2013).

E. faecalis ha sido reportada como sensible y resistente en tratamiento con α pineno; Dorman y Deans reportaron actividad sobre esta cepa a una concentración de 13 mg/mL. En contraste Sonboli y colaboradores en el 2006

concluyeron que no se mostraba inhibición de *E. faecalis* en concentraciones iguales o menores a 15 mg/mL de α pineno a pesar de la sensibilidad mostrada en el ensayo de Kirby-Baüer, no fue posible determinar la CMI ya que el rango de ésta se encontraba por encima de los 4 mg/mL.

En la actividad de α y β pineno sobre bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* se han encontrado CMI desde 0.05148 mg/mL hasta 15 mg/mL (Wang *et al.*, 2012). Otros autores reportan actividad nula sobre estas y otras cepas Gram negativas, a pesar de ello, el estudio de actividad antimicrobiana sobre este grupo bacteriano es menor que el realizado sobre cepas Gram positivas.

La actividad mostrada por α pineno sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. enterica* ATCC 7251 y *S. marcescens* ATCC 14756 concuerdan con estudios previos donde se midió la actividad o inactividad de varios componentes de los aceites esenciales a una concentración de 13 mg/mL, en él se reporta a *K. pneumoniae* y *Salmonella spp.* con sensibilidad al tratamiento; así mismo se muestra a *S. marcescens* como una cepa resistente (Dorman y Deans, 2000).

La actividad mostrada por (-) β pineno sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. enterica* ATCC 7251 y *S. marcescens* ATCC 14756 en el presente estudio concuerda con lo reportado por Dorman y Deans en el 2000 donde cepas del mismo género y especie son inhibidas por β pineno. El trabajo sobre la actividad antibacteriana realizado por estos autores muestran que β pineno fue activo contra un mayor número de cepas Gram positivas y negativas que α pineno, lo cual concuerda con esta investigación.

En las curvas de crecimiento de *S. epidermidis* se muestra un claro efecto bacteriostático por parte de α y (-) β pineno, esto quiere decir que inhibe la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que la sustancia termina de ejercer su efecto sobre la cepa bacteriana (Cordiés *et al.*, 1998). Existe el precedente de que a una concentración de 18 mg/mL el α pineno tiene un efecto bacteriostático sobre *S. aureus* en las primeras 4 horas de exposición (Medeiros *et al.*, 2007).

Los aceites esenciales o sus constituyentes pueden tener uno o varios sitios diana para atacar a la célula bacteriana (Nazarro *et al.*, 2013). El efecto bacteriostático que genera α y (-) β pineno sobre *S. epidermidis* ATCC12228 y el comportamiento de la curva nos dice que ambos compuestos tienen un par de sitios blanco específicos.

Uno de los mecanismos de acción reportados para aceites esenciales y constituyentes de estos es la degradación de la pared celular (Nazarro *et al.*, 2013) que en bacterias Gram positivas se encuentra en la zona más externa. Es sabido que los constituyentes de aceites esenciales tienen la capacidad de interactuar con las diferentes envolturas celulares como la pared celular, ME y MI (Abdenour *et al.*, 2011). Es por ello que se propone que α y (-) β pineno están actuando sobre la pared celular de *S. epidermidis*, inhibiendo así la multiplicación bacteriana.

Se ha reportado que la pérdida de la integridad estructural de células bacterianas tratadas con constituyentes de los aceites esenciales puede ser causada por el daño a la pared celular (Zengin y Baysal, 2014).

El efecto que ejerce el α y (-) β pineno puede ser similar al que causan las penicilinas, las cefalosporinas y los β -lactámicos evitando la síntesis de peptidoglicano, el proceso de transpeptidación que une a las numerosas cadenas de peptidoglicanos entre sí (Pírez y Mota, 2008) o afectando al ácido teicóico y lipoteicóico, el cual se conoce que tiene la función de estabilizar la pared celular de bacterias Gram positivas (Cordiés *et al.*, 1998), con lo cual se generaría el efecto bacteriostático que se muestra en *S. epidermidis*.

Finalmente, se ha visto que muchas bacterias tratadas con hidrocarburos y constituyentes de los aceites esenciales mostraron alteraciones en la pared celular y demás envolturas celulares (Bakkali *et al.*, 2007); en el caso de la pared se vio una modificación en la composición de polisacáridos que produjo un cambio en la naturaleza de la pared misma, pasando de una pared hidrofóbica a una hidrofílica,

generando una protección y barrera contra estos compuestos (Sikkema *et al.*, 1995).

La curva de crecimiento de *V. cholerae* muestra un claro efecto bactericida del α y (-) β pineno a 30 y 60 minutos de iniciado el experimento respectivamente. Esto concuerda con lo reportado por Duarte y colaboradores en el 2012 donde se concluye que no existen bases completamente sólidas para afirmar que las bacterias Gram negativas son más resistentes que las Gram positivas.

El potente efecto bactericida que ejercen α y (-) β pineno en *V. cholerae* sugiere que los sitios blanco son numerosos y de gran importancia. De manera general, se sabe que los principales mecanismos de acción se relacionan con daños físicos y alteraciones morfológicas en las membranas celulares y sus funciones (Duarte *et al.*, 2012; Zengin y Baysal, 2014).

Se ha propuesto que los aceites esenciales y sus constituyentes pueden introducirse por difusión pasiva a través de la membrana externa y la membrana citoplasmática de bacterias Gram negativas; esta última presenta una baja permeabilidad a compuestos polares, por lo cual α y (-) β pineno pueden penetrar fácilmente la bicapa lipídica y ejercer su efecto antibacteriano (Sikkema *et al.*, 1995; Gallucci *et al.*, 2009).

También se ha postulado que los LPS anclados a la membrana externa e interna pueden ser liberados para encapsular gotas de hidrocarburos y tratar de prevenir el daño de éstos, pero a su vez, se incrementa la eficiencia de la transferencia en masa de estos compuestos debido a los espacios libres que quedan de la liberación de estos LPS (Sikkema *et al.*, 1995).

El efecto que causa α pineno sobre la célula bacteriana es dañar la integridad celular e inhibir la respiración, anular la acción de proteínas embebidas en la membrana externa, así como el transporte iónico dentro y fuera de la célula, desembocando así en la muerte celular (Duarte *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2013).

α pineno puede aumentar la permeabilidad de la membrana celular, incrementando así el transporte de iones pequeños, afectando la estabilidad membranal y produciendo la muerte celular de la bacteria mediante lisis; sin embargo, se piensa que estos eventos no ocurren separados, sino que son activados en cascada, uno como consecuencia del anterior (Medeiros *et al.*, 2007; Miguel, 2010).

Las lesiones subletales a la membrana externa, la pérdida de la integridad, aumento de la permeabilidad y creación de poros por liberación de LPS progresan más rápidamente que las ocurridas en la membrana citoplasmática, afectando una mayor proporción de células sobrevivientes (Abdenour *et al.*, 2012).

En relación a la actividad antimicrobiana de $\alpha:\beta$, los resultados del presente estudio sugieren efectos antagónicos o de indiferencia sobre la mayoría de las cepas sensibles a los compuestos usados por separados.

Las interacciones sinérgicas o aditivas han sido vinculadas con compuestos de estructura similar, compuestos fenólicos o que contengan alcohol en su estructura; en contraste se han atribuido efectos antagonistas a la combinación de un compuestos no oxigenados y un hidrocarburos monoterpénicos oxigenados (Bassolé y Juliani, 2012).

Un ejemplo de las posibles interacciones de indiferencia y antagonismo de α y β pineno (principales compuestos mayoritarios) con los constituyentes de aceites esenciales puede verse en los aceites esenciales de *S. hydrangea* y *S. santolinifolia*, ya que en algunos de los casos la CMI del aceite es mayor o igual que la que tienen ambos compuestos puros (Sonboli *et al.*, 2006) lo cual concuerda con el comportamiento de α pineno, (-) β pineno y $\alpha:\beta$.

Las interacciones de indiferencia y antagonismo se dieron mayoritariamente en cepas del género *Staphylococcus*. Efectos similares se han obtenido sobre diversas cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* (Méndez *et al.*, 2012; Gallucci *et al.*, 2009) y *Bacillus* (Gallucci *et al.*, 2009) al utilizar los compuestos fenólicos

carvacrol y timol, los cuales presentan una elevada actividad antimicrobiana y comparten con α y (-) β pineno la característica de ser estructuralmente similares.

Otra de las razones por las cuales se pudieron haber dado relaciones antagónicas entre α y (-) β pineno es por su composición, ya que ambos son hidrocarburos. Cruz y colaboradores en el 2014 realizó un trabajo de interacción entre α pineno y limoneno sobre MRSA. Encontró que la mayor actividad antibacteriana se presentaba con el α pineno puro. Identificó un efecto antagónico al mezclar ambos compuestos y atribuyó este hecho a la presencia del limoneno, ya que éste hidrocarburo presentó menor actividad antimicrobiana que el α pineno al probarlos por separado.

Los mecanismos de interacción que producen antagonismo han sido pobremente estudiados, no obstante algunos de ellos incluyen la combinación de agentes bactericidas con bacteriostáticos. Las interacciones químicas dadas entre los compuestos o el uso de compuestos que tienen sitios de acción similares o iguales (Bassolé y Juliani, 2012). Esta última podría ser una de las razones por la cual el tratamiento α : β mostró antagonismo, ya que las curvas de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* mostraban un comportamiento muy similar al ser tratados con α y (-) β pineno.

Las relaciones sinérgicas encontradas en las cepas *K. oxytoca*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *M. luteus* sugiere que al mezclarse los compuestos utilizados en este experimento, la actividad sobre cepas Gram negativas y positivas resistentes a los compuestos separados aumenta.

Un efecto similar se observó en los aceites de *S. santolinifolia* donde *K. pneumoniae* es inhibida por el aceite pero no por α y β pineno puros, los cuales se identificaron como sus principales constituyentes (Sonboli *et al.*, 2006).

En relación a esto, Gallucci y colaboradores en el 2009 mencionan que el efecto que pueden tener dos compuestos lipofílicos combinados puede ser sinérgico ya que ambos son capaces de entrar a la membrana citoplasmática, sin embargo, uno puede facilitar la entrada del otro.

Algunas hipótesis que se han planteado para explicar la actividad antimicrobiana de la combinación de dos constituyentes de aceites esenciales similares estructuralmente en interacción sinérgica son que el mecanismo antibacteriano de ambos compuestos es diferente (actúan en diferentes sitios) o que el efecto sinérgico ocurre solo cuando ambos compuestos inhiben a la cepa en cuestión (Bassolé y Juliani, 2012).

Algunos de los mecanismos de acción aceptados para las interacciones sinérgicas son la inhibición secuencial de rutas bioquímicas, inhibición de enzimas protectoras y el uso de agentes activos de la membrana celular para favorecer la entrada de otro antimicrobiano, no obstante son pocos los estudios realizados sobre el mecanismo de acción de las interacciones sinérgicas (Zengin y Baysal, 2014).

La relación sinérgica de α y (-) β pineno sobre *P. aeruginosa* encontrada en la presente investigación representa un hecho muy importante ya que esta cepa es causante de numerosas manifestaciones clínicas como meningitis, septicemia, bacteriemia, neumonía necrotizante e infecciones pulmonares crónicas entre otras. Además, es una bacteria comúnmente aislada en equipo hospitalario y resistente a una amplia gama de antibióticos, así como a compuestos cuaternarios de amonio presentes en los antisépticos (Romero, 2007).

P. aeruginosa presenta una resistencia innata al α pineno en concentraciones superiores al 90%, cualidad que la ha llevado a ser aprovechada por la industria química para la biotransformación de este constituyente en derivados hidroxilados naturales de alto costo (Castellanos *et al.*, 2007).

Actividad antifúngica

Hongos miceliados

En lo referente a la actividad antifúngica, los tratamientos de α pineno, (-) β pineno y α : β no fueron activos contra ninguna de las cuatro cepas de hongos miceliados probadas. Esto se debe a su resistencia innata hacia ambos compuestos. Tres de

los cuatro hongos miceliados probados en los bioensayos son explotados en la industria química por esta característica tan peculiar, estos son utilizados para la obtención de compuestos naturales mediante oxidación (Castellanos *et al.*, 2007).

Tanto *A. niger* como el género *Fusarium* son utilizados para producir α -terpineol (compuesto de gran importancia para la industria química) a partir de α pineno y limoneno mediante biotransformación (Castellanos *et al.*, 2007); además *A. niger* también puede transformar (-) β pineno y limoneno en α -terpineol (Rottava *et al.*, 2010). Estos organismos son buenos catalizadores debido a su resistencia ambiental, química, su abundancia y por tener la capacidad de transformar sustratos difíciles (Castellanos *et al.*, 2007).

Algunos otros productos obtenidos del α pineno son el borneol, el fenchor, y el p-mentano-1,8-diol, todos ellos de importancia y valor económico elevado; este proceso se lleva a cabo por intereses meramente económicos, ya que el precio de un producto natural puede ser increíblemente mayor a su análogo sintético (Castellanos *et al.*, 2007).

Hongos levaduriformes

La actividad antifúngica sobre levaduras fue probada en tres especies de *Candida* por ser el hongo patógeno más común en las enfermedades micóticas. Por su parte, dentro de las muchas actividades que se le atribuyen a los pinenos se encuentra la actividad antifúngica (Rivas *et al.*, 2012).

Por otra parte, la sensibilidad de las tres especies de *Candida* al tratamiento con α y (-) β pineno coinciden con reportes anteriores donde se menciona que *C. albicans* es la cepa más sensible a ambos, mientras que *C. tropicalis* se muestra como la más resistente, pero aun así sensible a los efectos de α y (-) β pineno (Igara *et al.*, 2005). Se sabe que *C. tropicalis* a diferencia de las demás especies del género *Candida* forma un micelio verdadero y no un pseudomicelio (Romero, 2007). Esto podría influir en la acción que ejercen α y (-) β pineno por tener que inhibir a cada hifa formadora del micelio de *C. tropicalis* y no a una pseudohifa con

segmentos conectados entre sí, presentes en el pseudomicelio de las demás especies de *Candida* (Forbes *et al.*, 2009).

Estudios antifúngicos contra *C. albicans* han mostrado valores de CMI de 3.125 mg/mL para α pineno y 0.187 mg/mL para β pineno (Rivas *et al.*, 2012). Lo cual sugiere que éste último es más efectivo que α pineno, lo cual concuerda con este proyecto, ya que las CMI obtenidas para (-) β pineno son más bajas que las de α pineno.

La actividad antifúngica de los compuestos evaluados ha sido probada contra varias levaduras, no obstante se ha llegado a la conclusión de que β pineno es un antifúngico más efectivo que α pineno, especialmente contra especies del género *Candida* (Mercier *et al.*, 2009).

La sensibilidad de *C. albicans* es elevada como se mencionó anteriormente, no obstante la cantidad que se requiere de α pineno para inhibir su crecimiento es mayor que la que se requiere para *C. glabrata* por lo cual esta levadura se determinó como la más sensible.

En el ensayo de curva de crecimiento de *C. glabrata* se muestra un potente efecto antifúngico por parte de ambos compuestos, logrando inhibir a la hora de iniciado el experimento a la concentración de CBM. Rivas y colaboradores en el 2012 tuvieron un efecto similar al evaluar el efecto de α y β pineno sobre *C. albicans* en una curva de crecimiento en la que el 99.9% de la población fúngica fue eliminada en 60 minutos, mostrando así que estos compuestos son fuertes fungicidas.

En un experimento similar se tiene registro de un efecto fungistático de α y β pineno sobre *C. albicans* con una hora de duración, posteriormente la población fúngica fue eliminada en su totalidad (Igara *et al.*, 2005). Esto coincide con el comportamiento que presenta la $\frac{1}{2}$ CMI, ya que este tratamiento es fungistático por 4 horas y posteriormente elimina a la población de *C. glabrata*.

La curva de crecimiento de *C. glabrata* para ambos compuestos sugiere que las estructuras dañadas por α y (-) β pineno son de gran importancia para la levadura,

ya que el efecto fungicida fue muy acelerado; el mecanismo de acción propuesto para las levaduras está relacionado con la capacidad de inducir efectos tóxicos en la estructura y función de la membrana (Mercier *et al.*, 2009).

El método por el cual α y (-) β pineno pueden estar actuando es mediante el incremento de la permeabilidad en la membrana citoplasmática, la cual afecta el ciclo de iones de Ca^{++} y otros canales iónicos, reduciendo así el gradiente de pH (Bakkali *et al.*, 2007).

La subsecuente permeabilización de la membrana citoplasmática producirá muerte celular, eliminando así a dicha levadura (Duarte *et al.*, 2012). En relación a esto, se ha visto que ambos compuestos también interfieren en la síntesis de ergosterol (Bakkali *et al.*, 2007), producen granulación del citoplasma, inactivando y/o inhibiendo la síntesis de enzimas (Igara *et al.*, 2005).

En relación al tipo de interacción entre α y (-) β , los resultados muestran un efecto antagónico sobre las cepas de *Candida* evaluadas, dado que los valores de CMI determinados para todas las cepas son de 3.0 mg/mL.

Como se mencionó anteriormente, tanto α como (-) β son capaces de afectar la permeabilidad de la membrana citoplasmática de levaduras entre otras cosas; posiblemente al tener ambos compuestos un sitio diana similar se produjo un efecto antagónico de acuerdo con Bassolé y Juliani en el 2012.

Las interacciones entre constituyentes de aceites esenciales no han sido muy estudiadas sobre levaduras. No obstante existen trabajos donde se reporta la interacción de constituyentes de aceites esenciales con algún medicamento comercial.

La interacción de α y β pineno con anfotericina B fue probada sobre *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Rhizopus oryzae*. La interacción obtenida para todas las cepas fue de indiferencia entre los compuestos (Rivas *et al.*, 2012), esto probablemente se deba a que tanto la anfotericina B como el α y β pineno actúan

afectando la permeabilidad de la membrana y por tener el mismo sitio de acción se produjo una interacción considerada como negativa (Bassolé y Juliani, 2012).

La interacción que se presenta entre los compuestos no solo depende de la estructura y características de los compuestos en sí, en parte depende también del microorganismo a probar. Anteriormente se mencionó una interacción antagónica entre α pineno y limoneno frente a una cepa de MRSA. No obstante Tserennadmid y colaboradores en el 2011 obtuvieron una interacción sinérgica de esta misma combinación al utilizarla para inhibir a *Saccharomyces cerevisiae*, probando así que el tipo de interacción entre α y (-) β pineno sobre las diferentes cepas bacterianas y fúngicas depende en parte del microorganismo, ya que muchas veces el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales o sus constituyentes dependen en parte del organismo a probar (Gallucci *et al.*, 2009).

Toxicidad general

El ensayo de toxicidad general de los tratamientos sobre el modelo de *A. salina* nos muestra que el tratamiento de (-) β pineno es el menos tóxico, seguido del α pineno y finalmente el tratamiento α : β .

La toxicidad del compuesto (-) β pineno no había sido determinado con anterioridad. El único trabajo que se tiene sobre este compuesto es el efecto cardiovascular de hipotensión y taquicardia en ratas (Santos *et al.*, 2011). Sin embargo de acuerdo con el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) este compuesto se cataloga como moderadamente tóxico por tener una CL_{50} de 484.446 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Neira, 2005).

Los tratamientos restantes son los de toxicidad más alta; de los tratamientos de α pineno y α : β no se pudo obtener la CL_{50} ya que a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más del 50% de los organismos no lograron sobrevivir. Esto sugiere que el valor de la concentración letal media de ambos compuestos se encuentra por debajo de los 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto nos permite catalogar a ambos tratamientos como compuestos extremadamente tóxicos de acuerdo con el CYTED (Neira, 2005).

La toxicidad de α pineno ha sido determinada con anterioridad en tres líneas celulares tumorales, a una concentración de 1mg/mL este compuesto redujo la viabilidad celular por debajo del 11%, probando así un efecto citotóxico (Wang *et al.*, 2012). Esto concuerda en parte con nuestros resultados, ya que hace referencia a la alta toxicidad que tiene el α pineno, ya que a la misma concentración no se tuvieron sobrevivientes de *A. salina* para los tratamientos de α pineno y $\alpha:\beta$.

El compuesto α pineno es catalogado como una sustancia GRAS (Generalmente Reconocida como Segura, por sus siglas en inglés) ya que fue probada en macrófagos y células sanguíneas a la concentración de 15 mg/mL teniendo casi nulos efectos tóxicos (Da Franca *et al.*, 2015). Este dato no concuerda con nuestros resultados, ya que de acuerdo a la determinación en el modelo de *A. salina*, esta sustancia se catalogó como extremadamente tóxica junto con el tratamiento $\alpha:\beta$ del cual tampoco se tenían datos de su toxicidad.

Por lo anterior, se recomienda realizar más estudios de toxicidad de estos compuestos sobre distintos modelos y no utilizarlos para productos comerciales como saborizantes, ya que la toxicidad obtenida de α pineno (compuesto mas explotado por diversas industrias) es elevada.

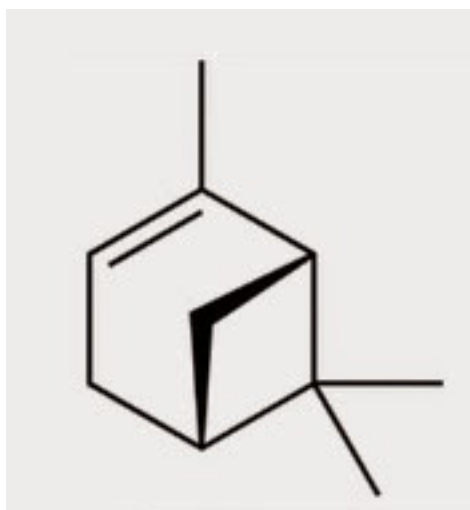
Conclusiones

- La actividad antimicrobiana de α y (-) β pineno por separado es mayor sobre bacterias Gram positivas.
- Las cepas más sensibles a α y (-) β fueron *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Vibrio cholerae* ATCC 39540.
- Ambos compuestos tuvieron actividad bacteriostática en *Staphylococcus epidermidis* y bactericida en *Vibrio cholerae* ATCC 39540.
- El tratamiento con α : β tuvo efecto sobre un menor número de cepas Gram positivas pero un mayor número de cepas Gram negativas.
- La principal interacción entre los compuestos frente a cepas bacterianas fue de tipo antagónica y de indiferencia.
- Las relaciones sinérgicas se mostraron en *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *M. luteus* teniendo inhibición a 4 mg/mL.
- La actividad antifúngica por parte de α y (-) β pineno se presentó sobre levaduras pero no sobre hongos miceliados.
- La cepa fúngica levaduriforme más sensible a α y (-) β pineno fue *C. glabrata*.
- α y (-) β pineno mostraron actividad fungicida sobre *C. glabrata*.
- La actividad antifúngica de α : β mostró un efecto de antagonismo en todas las cepas de *Candida*.
- La toxicidad general de los compuestos clasificaron al α pineno y α : β como extremadamente tóxicos por tener una supervivencia de *A. salina* menor al 50% a 10 μ g/ mL.
- El compuesto (-) β pineno fue clasificado como moderadamente tóxico por tener una CL_{50} de 484.446 μ g/ mL.

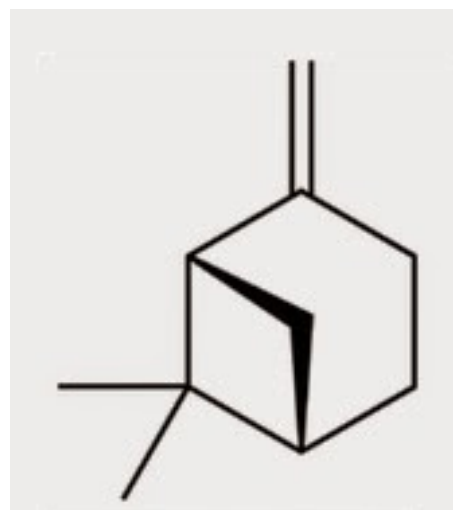
APÉNDICES

APÉNDICE 1

Estructura química de los compuestos α y (-) β pineno



α pineno



(-) β pineno

APÉNDICE 2

Método de difusión en agar Kirby-Bauer (Modificado de Koneman *et al.* 1996).

Este método es utilizado para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos y aceites esenciales, el método se describe a continuación:

El agar Müller-Hilton (MH) es el utilizado en ésta técnica, ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas; para ello es importante que el medio de cultivo alcance un espesor uniforme de 4 mm dentro de la placa, si este resultara ser más fino las sustancias a evaluar tenderán a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; por el contrario, si el agar llega a ser de más de 4mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia la parte baja, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo se preparó tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH, se enjuagó bien el líquido para descargar todo el material y acto seguido se retiró el asa de siembra. Posteriormente el caldo es incubado a 37°C durante un aproximado de 24 hora, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias por mL.

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 mL. de cloruro de bario a 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se pueden efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o con un espectrofotómetro a 660nm.

Si la suspensión de organismos es menos turbia que la estándar, ésta se volverá a incubar, por el contrario, si resulta ser más turbia solamente se le agregará solución salina al 0.9% hasta igualar la turbidez. Una vez logrado se sumergirá un segundo hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana y antes de retirarlos se eliminará el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inoculará la superficie de la placa de MH. El sembrado se realizará mediante estrías en por lo menos tres direcciones dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de agar MH está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará la actividad antibacteriana. Para la aplicación de sustancias se utilizarán sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No. 5. Cada sensidisco se impregnará con 3.432 mg de la sustancia a evaluar.

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril.

Como control positivo se evaluaron la sensibilidad de las cepas bacterianas con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad estas se incubaron a 37°C sin mayor tensión de CO₂.

Para la interpretación de resultados, las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en mm, recordando que en todos los casos las pruebas se realizaron por triplicado y se reportarán los valores promedio en mm ± la desviación estándar.

APÉNDICE 3

Técnica de macrodilución en caldo (Método modificado por Koneman *et al.* 1996).

En el método de macrodilución en caldo se utiliza para cada combinación de microorganismo/ antibiótico una serie de tubos que habitualmente se preparan con 1 mL de medio estéril sin antimicrobiano.

Para el inóculo se prepara una suspensión bacteriana con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar y se sumerge el asa en 10 mL de caldo MH, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se debe incubar el tubo de cultivo a 37°C durante un aproximado de 24 hora, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias por mL, de este suspensión se tomarán 0.1 mL y se le adicionarán 99.9 ml de solución salina al 0.9% obteniéndose así una concentración de 10^5 UFC/ml.

Al primer tubo se le agrega la concentración más alta de antimicrobiano junto con 1 mL de medio estéril y posteriormente se traspasa 1 mL. de esta solución a otro de los tubos, teniendo así una dilución a la mitad de la concentración inicial del antimicrobiano y dicha acción se repite tantas veces como diluciones se quiera estudiar. Finalmente de la última dilución se elimina 1 mL de medio para mantener el volumen final homogéneo y para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente.

Cada tubo se debe inocular con un volumen no mayor al 10% del volumen total, ya que esto produciría un efecto de dilución sobre el antimicrobiano, en caso de que el volumen no exceda este porcentaje no es necesario tener en cuenta este efecto; por lo cual cada tubo se inocula con 30 μ L de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculado el tubo, este se tapa y se incuba por 24 horas a 37°C; pasado este tiempo se procede a leer los resultados del experimento. La CMI se define

como la menor concentración de antimicrobiano que a simple vista inhibe el crecimiento del microorganismo estudiado.

Para interpretar el resultado se utiliza como referencia el tubo de testigo y se compara la turbidez de los tubos, marcando como CMI el tubo que no presenta turbidez.

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM):

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se efectuó la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema que el de macrodilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocula en una placa de agar MH para determinar el número real de UFC del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego de que se ha determinado la CMI se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 mL) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentan turbidez luego de la incubación, en las placas de agar MH. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/mL de cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, se piensa que los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano. Considerando que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original se le denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM).

APÉNDICE 4

Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento) (Kubo *et al.*, 1993 citado en Ávila, 1996).

Esta técnica consiste en una serie de pasos que consisten básicamente en:

Preparar y rotular un tubo con la solución problema para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de dos hora, hasta las primeras ocho hora. A partir de ese muestreo, se prepararán tubos para realizar lecturas cada seis horas.

Preparar y rotular un tubo sin antídoto que servirá como control del desarrollo

Preparar el inóculo con aproximadamente $1 \cdot 10^8$ UFC/mL en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo MH (Concentración bacteriana obtenida en un periodo de 12 a 18 horas de incubación).

Inocular con ayuda de una micropipeta, 0.1 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano, el cual está en una concentración igual a la concentración bactericida mínima y sus múltiplos medios; esto será la CMI y la mitad de la CMI. La concentración final debe ser aproximadamente de $1 \cdot 10^5$ bacterias/ml de caldo en cada tubo. Se deberá incubar en una estufa sin presión de CO_2 a 37°C .

Muestrear cada dos horas durante los primero cuatro tiempos (T_0-0 , T_1-1 , T_2-2 , T_3-3 , T_4-4), a partir del tiempo 5 se muestrea cada seis horas. Se realizan diluciones para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, una vez incubadas durante 24 horas a 37°C .

Se grafica el Log_{10} del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

APÉNDICE 5

Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos (Wang y Bun, 2002).

En el ensayo contra hongos miceliados se llevó a cabo en cajas Petri, las cuales contienen 20 ml de agar PDA con las siguientes concentraciones del compuesto antimicrobiano: 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.06 mg/mL de α -pineno y (-) β pineno respectivamente; se inocularon 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Una vez realizado este procedimiento se incubaron las placas a 23°C. durante 72 horas o hasta que el crecimiento miceliar se desarrollara. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Ketoconazol a diferentes concentraciones.

Finalmente se midió con una regla el crecimiento del hongo para calcular el porcentaje de inhibición, realizando todas las pruebas por triplicado.

APÉNDICE 6

Método de toxicidad general (McLaghlin *et al.*, 1991).

Este método se llevó a cabo con larvas Nauplio II de *A. salina* (Leach), ubicando 10 organismos en frascos de vidrio transparente con 10 mL. de una solución 0.5% de NaCl; las concentraciones problema a ensayar fueron de 10, 100 y 1000 µg/mL.

El control negativo utilizado para disolver la muestra problema fue dimetilsulfóxido (DMSO), del cual se empleó el mismo volumen en el que se disolvieron la concentración más alta de aceite a evaluar.

Las larvas de *A. salina* se incubaron a una temperatura ambiente (23- 25°C) durante 24 horas y se mantendrán bajo la incidencia de luz blanca.

Una vez transcurridas las primeras 24 horas, se procedió a contar el número de sobrevivientes de cada tratamiento tomando en cuenta que el movimiento y desplazamiento fueran iguales a los que presentaban el grupo control.

La CL₅₀ se determinó para cada extracto con la ecuación de la recta sobre un gráfico que muestre el % de sobrevivencia contra la concentración en µg/mL, esto a través de un análisis de regresión lineal.

La toxicidad general de los tratamientos se consideró como extremadamente tóxico cuando la CL₅₀ se encontraba entre 1 y 10 µg/mL, altamente tóxico si se encontraba entre los 10 y 100 µg/mL, moderadamente tóxico entre los 100 y 500 µg/mL, ligeramente tóxico entre los 500 y los 1000 µg/mL, no tóxico entre 1000 y 1500 µg/mL. y prácticamente inocuo a concentraciones mayores a 1500 µg/mL. de acuerdo con la CYTED (Neira, 2005).

Referencias

- Abdenour, A. O., Lamia, C., Espina, L., Lorán, S., Rota, C. y Pagán, R. 2011. **The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation.** Innovative Food Science and Emerging Technologies. (12): 320–329.
- Afolayan, A. J. y Ashafa, O. T. A. 2009. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Chrysocoma ciliata* L. leaves.** Journal of Medicinal Plants Research. 3(5): 390-394.
- Ávalos, G. A. y Pérez-Urria, C. E. 2009. **Metabolismo secundario en plantas.** Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-121.
- Ávila, J. G. 1996. **Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha.** Tesis de Maestría. FES Cuautitlan. UNAM. México.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. y Idaomar, M. 2007. **Biological effects of essential oils – A review.** Food and Chemical Toxicology Journal. 46: 446-475.
- Bassolé, N. H. I. y Juliani, R. H. 2012. **Essential oils in combination and their antimicrobial properties.** Molecules. 17: 3989-4006.
- Camacho, A. V. J. s/a. **Los antimicrobianos en la práctica médica.** Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. [En línea]. Consultado el 25 de Febrero del 2016. Disponible en: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/urgencia/antibioticos.pdf>
- Castellanos, F. E., Perea, V. A. y Ortíz, L. C. 2007. **Biotransformación de α -pineno empleando *Aspergillus niger*.** Scientia Et Technica. 8(33): 71-74.
- Cordiés, J. L., Machado, R. L. A. y Hamilton, C. M. 1998. **Principios generales de la terapéutica antimicrobiana.** Acta Médica. 8(1): 13- 27.
- Cruz, V. D. E., Márquez, M. y Cardona, J. 2014. **Evaluación de los aceites esenciales (A pineno y limoneno) contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* productores de enterotoxinas *in vitro*.** Ed. Escuela agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. 1-3.
- Da Franca, R. K. A., Layane, V. A., Noletto, D. C., Couthino, M. D. F., Portela, C. S. M. y Carvalho, F. A. A. 2015. ***Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its**

- major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*.** Journal of Ethnopharmacology. 160: 32-40.
- Dai, J., Zhu, L., Yang, L. y Qiu, J. 2013. **Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*.** Experimental and Clinical Sciences, International Online Journal for Advances in Sciences. (12): 479-490.
- Daza, P. R. M. 1998. **Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria.** Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud. 22 (3): 57- 59.
- Dorman, H. J. D. y Deans, S. G. 2000. **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plan volatile oils.** Journal of Applied Microbiology. 88: 308- 316.
- Duarte, M. C. T., Duarte, R. M. T. y de Sousa, P. D. 2012. **Medicinal essential oils: Chemical, pharmacological and therapeutic aspects.** Ed. Nova Médica. 1ª Edición. Nueva York, Estados Unidos. 184-194 pp.
- Forbes, A. B., Sahm, F. D. y Weissfeld, S. A. 2009. **Diagnóstico microbiológico.** Editorial Médica Panamericana. 12ª Edición. Argentina, Buenos Aires.172-179 pp.
- Gallucci, M. N., Oliva, M., Casero, C., Dambonela, J., Luna, A., Zygadlo, J. y Demo, M. 2009. **Antimicrobial combined action of terpenes against food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.** Flavour and Fragrances Journal. 24: 384-354.
- García-García, R. M. y Palou-García, E. 2008. **Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos.** Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos. [En línea]. Consultado el 25 de Febrero del 2016. Disponible en: <http://www.udlap.mx>
- Hernández, D. C. T., Canales, M. M., Caballero, N. J., Caballero, J., Romo de Vivar, R. A., Durán, D. A. y Lira, S. R 2003. **Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de Salinas, Puebla (México).** Journal of Ethnopharmacology 88: 181-188.
- Hernández, D. C. T., Canales, M. M., Caballero, N. J., Romo de Vivar, R. A., Durán, D. A. y Lira, S. R. 2006. **Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las**

plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Acta Botánica Mexicana 75: 21–43.

Hernández, T., Canales, M., García, A. M., Durán, A., Meráz, S., Dávila, P. y Ávila, G. J. 2008. **Antifungal activity of the essential oils of two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México).** Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 7(4): 203-207.

Igara, O. L., Rinalda de A. G. O., Edeltrudes de O. L., Evandro L. de S., Nilma, P. F. Y Dionezine de F. N. 2005. **Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections.** Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas. 41(2): 199-203.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2013. **Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido.** [En línea]. Consultado el 25 de Febrero del 2016. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

Jamshidi, R., Afzali, Z. y Afzali, D. 2009. **Chemical composition of hydrodistillation Essential oil of Rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries.** American- Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science. 5 (1): 78–81.

Jeong-Ho, L., Hye-Young, Y., Hong-Sub, L. y Soon-Kwang, H. 2008. **Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from cones of *Pinus koraiensis*.** Journal of Microbiological Technology. 18(3): 497-502.

Koneman, E. W. 1996. **Diagnóstico microbiológico.** Editorial Panamericana. México DF. 386-393 pp.

Kubo, Y., Chang, P., Cheng, Y. y Lien, C. 1996. **Antimicrobial activity of green tea flavor components.** En Bioactive volatile compounds from plants. Editores American Chemical Society. E.U.A. 626–631 pp.

Kuklinski, C. 2000. **Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.** Ediciones Omega. Barcelona, España. 245 pp.

- Márquez, S. C. 2008. **Química orgánica, apuntes de estereoquímica**. [En línea]. Consultado el 27 de Marzo del 2016. Disponible en: http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/7018/9/LIBRO2_1.pdf
- McLaughlin, J. L., Chang, C. J. y Smith, D. L. 1991. **Bench top bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update**. En: Estudios en la química de Productos Naturales. Au Rahman Elsevier. 383- 409 pp.
- Medeiros, L. A., de Olivera, L. E., Leite, S. E., Melo, D. M. F. F., Nogueira T. V. y Almeida, M. I. 2007. **Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Science. 43(1): 121-126.
- Medina, A. M. 2011. **Aceites esenciales: Usos, composición química y actividades biológicas**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 9–11 pp.
- Méndez, P. D., Tostado, Q. J., Hernández, R. A., Gonzáles, Y. M. G. E., Martínez, R. A. y García, L. C. 2012. **Sinergismo bactericida entre el timol y el carvacrol ante cepas bacterianas causantes de mastitis en Ganado bovino**. Educación y Asistencia Técnica-Agrofaz. 12(1): 111-116.
- Mercier, B., Prost, J. Y Prost, M. 2009. **The essential oil of turpentine and its major volatile fraction (α - and β -PINENES): A review**. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health. 22(4): 331- 342.
- Miguel, E. M. I. 2010. **Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 45 – 48 pp.
- Nazarro, F., Fratianni, F., Martino, L., Coppola, R. y Feo, V. 2013. **Effect of essential oils on pathogenic bacteria**. Pharmaceuticals Journal. 6: 1451- 1474.
- Neira, S. A. L. 2005. **Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto metanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense*. Sw**. Cultura científica. 40-45.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1997. **Programa Internacional de Seguridad de Sustancias Químicas**. Seguridad Química: Principios básicos de toxicología aplicada. 51 pp.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2012. **Las 10 principales causas de defunción en el mundo**. [En línea]. Consultado el 16 de Noviembre del 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/index3.html>
- OSMAN (Observatorio de Salud y Medio Ambiente de Andalucía). 1997. **Diccionario**. [En línea]. Consultado el 13 de Octubre del 2015. Disponible en: <http://www.osman.es/ficha/14030>
- Pascuzzo-Lima, C. 2008. **Farmacología básica 2008**. Editorial Médica – Panamericana. 1ª Edición. Argentina, Buenos Aires. 87 pp.
- Picazo, J. J. 2000. **Procedimientos en microbiología clínica**. [En línea]. Consultado el 26 de Febrero del 2016. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/MétodosBásicos_SensibilidadAntibióticos.pdf
- Pérez, M. y Mota, M. 2008. **Temas de bacteriología y virología médica**. 3a Edición. Editorial Médica Panamericana. Uruguay, Montevideo. 23- 37 pp.
- ReAct (Action on Antibiotic Resistance). 2014. **Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana**. Editorial AFEME. Quito, Ecuador. 29 – 31 pp.
- Rivas, S. A. C., Monteiro, L. P., Barros, A. M. M., Machado, C. D. C., Sales, A. C. y Sales, A. D. 2012. **Biological activities of α pinene and β pinene Enantiomers**. Journal Molecules. 17: 6305–6307.
- Romero, C. R. 2007. **Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias**. Ed. Medica Panamericana. 3ª Edición. México. 41-45, 503-509 pp.
- Rottava, I., Toniazzi, G., Cortina, P. F., Martello, E., Grando, C. E., Lerin, L. A., Treichel, H., Mossi, A. J., Oliveira, D., Cansian, R. L., Antunes, O. A. C. y Oestreicher, E. G. 2012. **Screening of microorganisms for bioconversion of (-)- β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol**. LWT- Food, Science and Technology. 43(7): 1128-1131.
- Santos, R. V. M., Moreira, V. F., Fraga, P. B., De Sousa, D. P., Bonjardi, R. L. Y Quintans-Junior, J. L. 2011. **Cardiovascular effects of monoterpenes: a review**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 21(4): 764-771.
- Sierra, R. C. I., Guevara, E. y Guevara-Patiño, A. 2011. **Actividad *in vitro* de piperaciclina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos y**

- fluoroquinolonas en *Pseudomona aeruginosa* productoras de melato- β -lactamasas.** Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 31: 13-19 pp.
- Sikkema, J., Jan, M. A. de B. y Poolman, B. 1995. **Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons.** Microbiological Reviews. 59 (2): 201-222.
- Solórzano-Santos, F. y Miranda-Novales, M. G. 1998. **Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos.** Salud Pública de México. 40 (6): 510-511.
- Sonboli, A., Babakhani, B. y Reza, M. A. 2006. **Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*.** [En línea]. Consultado el 15 de Octubre del 2015. Disponible en: <http://www.doc4net.com/doc/2330831927372>
- Song, W., Staudt, M., Bourgeois, I. y Williams, J. 2014. **Laboratory and field measurements of enantiomeric monoterpene emissions as a function of chemotype, light and temperature.** Biogeosciences. 11: 1435–1447.
- Sussman, P. A. O., Mattos, L. y Restrepo, A. s/a. **Resistencia bacteriana.** Facultad de Medicina. Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá. [En línea]. Consultado el 25 de Febrero del 2016. [En línea]. Consultado el 15 de Octubre del 2015. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026%20Resistencia.PDF>
- Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K. y Krisch, J. 2011. **Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk.** International Journal Food Microbiology. 144: 480-486.
- Wang, H. y Bun, T. N. 2002. **Plant drug analyses.** Segunda edición, edit. Springer Germany, 15-29 pp.
- Wang, W., Nan, L., Meng, L., Yuangang, Z. y Efferth, T. 2012. **Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oil compared to that of its main components.** Molecules. 17: 2704 – 2713.
- Zengin, H. y Baysal, A. H. 2014. **Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacterial and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy.** Molecules. 19: 17773-17798.