



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**Actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de
Adenophyllum porophyllum var. *cancellata***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

PRESENTA

María Fernanda Mata Pimentel

Directora de tesis:

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

En este trabajo plasmo todo mi agradecimiento a mis padres, Elsa y Alberto, porque este logro es también reflejo de su esfuerzo y su amor incondicional, su apoyo ha sido indispensable para cumplir esta meta.

A la Dra. Tzasna Claudia Hernández Delgado, directora de mi tesis, por aceptar que realizara este trabajo de investigación, por todo lo que me enseñó en el laboratorio y su amabilidad durante todo momento.

A la Dra. Ana María García Bores que también me dio la oportunidad de realizar esta investigación y llevarla a la publicación de un artículo científico.

Al Laboratorio de Fitoquímica y Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, ambos de la UBIPRO, FES-Iztacala por brindarme un espacio para la investigación.

A mis hermanos, Josué, Uriel y Nataly, porque además de ser inspiración siempre han confiado en mí para lograr mis metas.

A mis sobrinos, Ivana, Santiago, Eduardo y Alonso, ya que son mi motivación para no rendirme y su existencia me llena de vida y felicidad.

A mis amigas, Jessica, Nancy y Sandra, por su compañía, apoyo y sororidad durante toda la carrera y por haberme brindado palabras que me motivaron para seguir adelante hasta este importante momento.

A cada integrante de mi familia, a mi novio, mis amigos y conocidos que con acciones y palabras ayudaron a que concluya mi carrera profesional.

Índice General

ABREVIATURAS.....	7
1 RESUMEN	8
2 INTRODUCCIÓN	10
3 ANTECEDENTES	17
4 JUSTIFICACIÓN.....	18
5 HIPÓTESIS.....	18
6 OBJETIVO GENERAL.....	18
7 OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
8 METODOLOGÍA.....	20
8.1 <i>Colecta de material biológico</i>	20
8.2 <i>Obtención de aceite esencial</i>	20
8.3 <i>Determinación de la composición del aceite esencial</i>	20
8.4 <i>Cepas bacterianas y levaduras</i>	20
8.5 <i>Evaluación de la actividad antibacteriana</i>	21
8.5.1 Evaluación cualitativa.....	21
8.5.2 Evaluación cuantitativa.	21
8.6 <i>Evaluación de la actividad antifúngica.</i>	22
8.6.1 Evaluación cualitativa.....	22
8.6.2 Evaluación cuantitativa	22
8.7 <i>Evaluación de la inhibición de formación de biofilm</i>	22
8.8 <i>Curvas de crecimiento</i>	23
8.9 <i>Análisis estadístico</i>	23
9 RESULTADOS Y ANÁLISIS	24
9.1 <i>Obtención del aceite esencial.</i>	25
9.2 <i>Determinación de la composición del aceite esencial</i>	25
9.3 <i>Evaluación antibacteriana del aceite esencial de A. cancellatum</i>	29
9.3.1 Evaluación cualitativa antibacteriana.	30
9.3.2 Evaluación cuantitativa antibacteriana.....	31
9.4 <i>Evaluación antifúngica del aceite esencial de A. cancellatum</i>	31
9.4.1 Evaluación cualitativa antifúngica.....	32
9.4.2 Evaluación cuantitativa antifúngica.	32
9.5 <i>Evaluación de la actividad antibiofilm</i>	33
9.6 <i>Curvas de crecimiento</i>	34
10 DISCUSIÓN.....	36

11	CONCLUSIÓN	42
	APÉNDICES	43
	<i>APÉNDICE 1. Descripción de la planta Adenophyllum cancellatum (Villarreal, 2003).....</i>	43
	<i>APÉNDICE 2. DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR (Casado-Villaverde, 2018).....</i>	44
	<i>APÉNDICE 3. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (Ricaldi y Martínez, 2014).</i>	46
	<i>APÉNDICE 4. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR KIRBY-BAÜER (Candelaria-Dueñas et al., 2021). 48</i>	
	<i>APÉNDICE 5. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE MIC Y CBM (Koneman et al., 1996).....</i>	50
	<i>APÉNDICE 6. MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA (Gómez-Sequeda et al., 2020).....</i>	52
	<i>APÉNDICE 7. CURVA DE LETALIDAD (Kubo et al., 1992).....</i>	54
12	BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE ALGUNOS ANTIBIÓTICOS Y EL MECANISMO DE RESISTENCIA QUE DESARROLLAN LAS BACTERIAS	10
TABLA 2. MECANISMOS DE ACCIÓN DE ALGUNOS ANTIMICÓTICOS Y EL MECANISMO DE RESISTENCIA QUE DESARROLLAN LOS HONGOS Y LEVADURAS	13
TABLA 3. DATOS DE ESTUDIOS REPORTADOS DE LA ESPECIE <i>A. CANCELLATUM</i>	17
TABLA 4. DATOS ETNOBOTÁNICOS DE <i>A. CANCELLATUM</i>	24
TABLA 5. COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CANCELLATUM</i>	25
TABLA 6. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CANCELLATUM</i> SOBRE CEPAS GRAM POSITIVAS	29
TABLA 7. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CANCELLATUM</i> SOBRE CEPAS GRAM NEGATIVAS.....	30
TABLA 8. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>A. CANCELLATUM</i> SOBRE CEPAS LEVADURIFORMES	31

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 METABOLISMO SECUNDARIO DE LAS PLANTAS (ÁVALOS Y PÉREZ, 2009)	15
FIGURA 2 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ESPECIE A. CANCELLATUM	16
FIGURA 3 EJEMPLAR DE HERBARIO DE A. CANCELLATUM.....	24
FIGURA 4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE A. CANCELLATUM.....	28
FIGURA 5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE A. CANCELLATUM.....	32
FIGURA 6. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL BIOFILM EN S. AUREUS CC, E. COLI 82MR Y C. ALBICANS 17MR.....	33
FIGURA 7. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE A. CANCELLATUM SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE S. AUREUS CC DURANTE 24 HORAS.....	34
FIGURA 8. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE A. CANCELLATUM SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE E. COLI 82MR DURANTE 24 HORAS.....	35
FIGURA 9. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE A. CANCELLATUM SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE C. ALBICANS 17MR DURANTE 24 HORAS.	35
FIGURA 10. EFECTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS BACTERIAS	39
FIGURA 11. A. CANCELLATUM	43
FIGURA 12. ESQUEMA DEL MONTAJE PARA DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR.....	45
FIGURA 13. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR KIRBY-BAÜER.	49
FIGURA 14. ESQUEMA DEL MÉTODO MODIFICADO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO	51
FIGURA 15. ESQUEMA DEL PROCESO DEL MÉTODO CRISTAL VIOLETA.....	53

ABREVIATURAS

Acetil CoA	Acetil coenzima A
ATP	Adenosín trifosfato
ATCC	American Type Cultive Collection
CBM	Mínima Concentración Bactericida
CC	Caso Clínico
CFM	Mínima Concentración Fungicida
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CUSI	Clínica Universitaria de Salud Integral
DMAPP	Dimetilalil-disfosfato
DO	Densidad óptica
GPP	Pirofosfato de geranilo
GPS	Sistema de Posicionamiento Global
IPP	Isopentenil-pirofosfato
MH	Müller Hinton
MIC	Mínima Concentración Inhibitoria
MR	Multirresistente
PDA	Agar papa dextrosa
QS	<i>Quorum sensing</i>
RAM	Resistencia Antimicrobiana
UFC	Unidades formadoras de colonia

1 RESUMEN

Los aceites esenciales, son obtenidos de las plantas y por su composición química pueden tener diferentes funciones como son analgésicos, desinflamatorios, cosméticos, antimicrobianos, etc. Ante la resistencia que han generado las cepas bacterianas y levaduras a los antimicrobianos, que implica una amenaza para la salud, surge la necesidad de investigar compuestos nuevos que tengan actividad antimicrobiana y con base en la medicina tradicional podemos identificar a plantas capaces de producir metabolitos secundarios con que puedan tener esta propiedad. Por tal motivo el objetivo de este trabajo es determinar la actividad antimicrobiana y antibiofilm que presenta *Adenophyllum porophyllum* var. *cancellata* (nombre común árnica del monte) ya que según datos etnobotánicos es utilizada para malestares dérmicos. En la determinación de la composición del aceite esencial se observó que 30% de estos pertenece al grupo de los compuestos monoterpénicos. Los compuestos mayoritarios fueron pinocanfona (37.54%), pinocarvona (21.84%) y D-limoneno (24.66%), de los cuales se han reportado efectos antisépticos, efectos antifúngicos y antibacteriano de amplio espectro. En la evaluación cualitativa se observó que en cepas levaduriformes el aceite esencial tuvo un mayor efecto que en cepas bacterianas. Las cepas donde se observó el efecto antimicrobiano, se les determinó la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC), la Concentración Mínima Bactericida (CBM) en bacterias y la Concentración Mínima Fungicida (CFM) en las levaduras. Las cepas con mayor susceptibilidad fueron de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* cc que presentó una MIC de 1.00 mg/mL y la CBM de 2.00 mg/mL, de las cepas bacterianas Gram negativas *Escherichia coli* MR82 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, las cuales presentaron la MIC de 0.75 mg/mL y CBM de 1.00 mg/mL, y por último la cepa levaduriforme más susceptible fue *Candida glabrata* puesto que presentó una MIC <0.06 mg/mL y la CBM de <<0.06 mg/mL. Esto se puede justificar ya que la pinocarvona es un monoterpeno que se ha reportado en la composición de otros aceites esenciales con efectos antifúngicos. En cuanto a la determinación del porcentaje de inhibición de la formación de biofilm por Método de Cristal Violeta, se probó en cepas formadoras de biofilm de importancia nosocomial y se observó sensibilidad al aceite esencial, así que se

determinó en *S. aureus* cc, *E. coli* MR82 y *C. albicans* MR17 considerando $\frac{1}{2}$ MIC, MIC, CBM (para bacterias) y CFM (en la levadura) obteniendo que en *S. aureus* cc se inhibe un 47.6% del biofilm, en *C. albicans* un 46.3% y *E. coli* MR82 33.1% por lo que algún compuesto que forma parte la composición del aceite interfieren en la matriz de polisacáridos. Con las curvas de letalidad se pudo confirmar que el mayor efecto antimicrobiano se observa en *C. albicans* MR17, ya que en un lapso de 8 h disminuyó totalmente la población levaduriforme. Por lo tanto, la investigación apunta a que el aceite esencial de *A. cancellatum* presentó un mayor efecto antifúngico debido al gran porcentaje del compuesto pinocarvona, y es un buen inhibidor del biofilm de *S. aureus* cc.

2 INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos (antibióticos, antimicóticos, antiparasitarios y antivirales), son medicamentos que se utilizan para prevenir y tratar infecciones en los seres humanos, animales y plantas. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una de las mayores amenazas para la salud mundial y el desarrollo (OMS, 2020). La pérdida de eficacia de los antimicrobianos se debe a la conjunción de dos circunstancias: la capacidad de los microorganismos para producir permanentemente cambios genéticos y el uso masivo de los antimicrobianos a nivel mundial (Aurelio-Mendoza, 2011), provocando que desarrollen nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana. Debido a la ineficacia de los antimicrobianos a nuevas cepas resistentes ha surgido la necesidad de investigar nuevos antibióticos.

Los antibióticos son sustancias capaces de reconocer ciertos sitios de la estructura bacteriana y al unirse a ellos producen la pérdida de la función correspondiente. Algunos grupos de antibióticos reconocen y desactivan enzimas fundamentales para la vida celular. Las bacterias, por su gran capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia ante los antibióticos (Tabla 1).

Por otro lado, se define a los antifúngicos como cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí-Valdés, 2005).

Tabla 1. Mecanismos de acción de algunos antibióticos y el mecanismo de resistencia que desarrollan las bacterias

Familia de Medicamentos	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Referencia
Penicilina	Impide la síntesis de la pared de los microorganismos al inhibir la enzima transpeptidasa, acción	-Inactivación del fármaco - Producción de β -lactamasas - Falta de sensibilidad del objetivo	Daza-Pérez, 1998

	n que evita la formación del peptidoglucano, y por lo tanto el entrecruzamiento de éste que da rigidez y fuerza a la pared de la bacteria.	- Reducción de permeabilidad - Emisión activa	
Cefalosporinas	Interfiere con la síntesis del componente péptidoglucano de la pared celular bacteriana, a través de la <i>unión a la proteína fijadora de penicilina (PBP) e inactivación de los inhibidores de la autolisina endógena</i> : esta autolisina rompe las paredes celulares bacterianas y produce la muerte del microorganismo por lisis microbiana.	Igual que la penicilina	Rivas et al.,2002.
Macrólidos	Inhiben la síntesis proteica bacteriana alterando la translocación. Pueden ser bactericidas o bacteriostáticos según la concentración y tipo del microorganismo. La base libre se une a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano.	- Mutación ribosomal en el 23S rRNA - Descenso de permeabilidad de la pared celular - Emisión activa	Rodríguez y Obrador, 2013.
Tetraciclinas	Actúan fijándose a la subunidad 30s del ribosoma impidiendo el acceso de los aminoacil-t-ARNs que no pueden unirse a la proteína en crecimiento. En consecuencia, la síntesis de proteínas se detiene,	- Acumulación reducida del fármaco intracelular - Falta de sensibilidad del objetivo - Inactivación enzimática	Vicente y Pérez, 2010.

	ocasionando la muerte celular de la bacteria.		
Cloranfenicol	Antibiótico bacteriostático de amplio espectro, interfiere en la síntesis proteica bacteriana.	-Inactivación del fármaco a través de la enzima acetiltransferasa y glucoronil transferasa	Farfán et al., 2002.
Aminoglucósidos	Inhiben la síntesis proteica por acción directa sobre los ribosomas; alteran la unión del RNAm al ribosoma y modifican la lectura del código genético. Alteran también la membrana citoplasmática y la gradiente electroquímica.	-Inactivación del fármaco a través de adenilasas, fosforilasas y acetilasas. - Transferencia de ADN en forma de plásmidos. - Permeabilidad reducida a través de la membrana externa. - Carencia de sistema de transporte necesario en bacterias anaerobias.	Daza-Pérez, 1998

Tabla 2. Mecanismos de acción de algunos antimicóticos y el mecanismo de resistencia que desarrollan los hongos y levaduras

Familia de antifúngicos	de Mecanismo de acción	de Mecanismo de resistencia	de Referencia
Lipopéptidos	Inhiben la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-β-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere.	-Disminución de afinidad a la célula diana por mutaciones de los genes FKS1 y FKS2, que causa modificaciones en la secuencia de las subunidades proteicas de la enzima 1,3-β-glucano.	
Polienos, azoles, alilaminas	Inhiben la síntesis de ergosterol, componente principal en la membrana celular de los hongos.	<p>-Presencia de bombas de flujo asociadas a la membrana que conducen a la disminución de la concentración del fármaco de la célula diana.</p> <p>-Mutaciones en el gen ERG11, que codifica para la enzima lanosterol-14-α-desmetilasa, modifica la secuencia de aminoácidos y por tanto el sitio de acción.</p> <p>-Aumento en la concentración de lanosterol-14-α-desmetilasa, por lo que se requieren dosis mayores del antifúngico.</p>	<p>Valencia, 2018.</p> <p>Moreno et al., 2009</p>
Piridiminas fluoradas	Tienen un átomo de flúor que actúa inhibiendo la síntesis de ADN y ARN en la célula fúngica.	-Inactivación de la permeasa que transporta la flucitosina, o la disminución de las enzimas que la metabolizan.	

Las infecciones nosocomiales son infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban presentes en el momento de ingreso del paciente. Estas infecciones están relacionadas con procedimientos asistenciales invasivos: la infección urinaria nosocomial con el cateterismo urinario, la infección quirúrgica con el procedimiento quirúrgico, la infección respiratoria con la ventilación mecánica invasiva y la bacteriemia de catéter con el cateterismo vascular.

Los biofilm se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general el componente mayoritario del biofilm es el agua que puede representar hasta un 97% del contenido total, en menor proporción contiene exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros biopolímeros (Lasa et al., 2005).

La matriz del biofilm retiene a las células y las mantiene próximas entre sí, permitiendo un elevado grado de interacción, incluida la comunicación intercelular y microconsorcios sinérgicos. La matriz protege a los organismos frente a la desecación, oxidantes, biocidas, algunos antibióticos y cationes metálicos, radiación UV y defensas inmunes. Sin embargo, las células del biofilm no están completamente inmobilizadas, sino que pueden moverse en interior del biofilm y desprenderse del mismo (Trujillo, 2017). Resulta de interés el estudio de estas estructuras ya que funcionan como mecanismo de resistencia y están asociados a enfermedades nosocomiales.

Por otra parte, en diferentes países existe una gran variedad de plantas que tienen diferentes usos conforme a la cultura y costumbres de cada región. Muchas de estas plantas se han relacionado con propiedades antimicrobianas (Reyes et al., 2012).

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de

solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales).

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez, 2009).

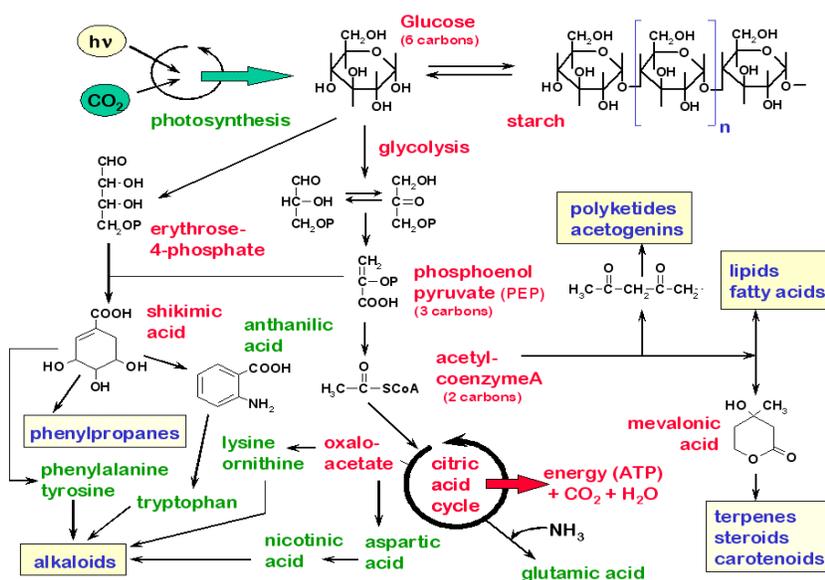


Figura 1 Metabolismo secundario de las plantas (Ávalos y Pérez, 2009)

Los aceites esenciales son sustancias olorosas obtenidas de las plantas mediante destilación por arrastre de vapor, prensado en frío o extracción con solvente. Proviene fundamentalmente del metabolismo secundario de los vegetales superiores (Zekaria, 2006). Dependiendo de la especie de la que se extraiga, un aceite esencial puede tener entre 50 a 300 componentes químicos, los cuales pertenecen a los grupos de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, sesquiterpenos, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, cumarinas, alcaloides, etc. Los aceites esenciales cumplen un rol ecológico importante como atrayentes de

polinizadores, además pueden actuar como repelentes de insectos y forman parte de la defensa química de las plantas (Ruíz et al., 2015).

Un ejemplo de especie botánica que resulta de utilidad para el estudio de actividad antimicrobiana es *Adenophyllum cancellatum*, también llamada *Adenophyllum porophyllum* var. *cancellata* o *Dyssodia porophyllum* var. *cancellata*, comúnmente se conoce como cimpásuchil, cardo santo del monte o árnica del monte. Esta se distribuye en los estados mexicanos de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Colima, Estado de México y Michoacán (Villareal, 2003). Se ha observado el uso de esta planta para el tratamiento de afecciones en la piel, irritaciones, para lavar heridas, gripe y pulmonía. No se han realizado estudios que indiquen la composición química específica de la especie, sin embargo, dentro del género *Dyssodia* sp. y *Adenophyllum* sp. en la parte aérea de la planta se han detectados compuestos azufrados derivados del tiofeno (Argueta-Villamar et al., 2009).



Figura 2 Distribución geográfica de la especie *A. cancellatum*

3 ANTECEDENTES

Acercas de la planta *A. cancellatum* se tiene poca investigación en cuanto los efectos antimicrobianos que esta pueda tener, a continuación, se muestran algunos de los estudios que se han reportado para esta especie en los cuales cabe destacar que ninguno reporta la composición química sólo los efectos en especies de parásitos y hongos filamentosos.

Tabla 3. Datos de estudios reportados de la especie *A. cancellatum*

Autores	Estudio realizado
Hernández-Sánchez, 1989.	Los habitantes de Poncitlán, Jalisco usan el cocimiento de la planta <i>Dyssodia porophyllum</i> para tratar golpes y heridas.
Argueta-Villamar et al., 2009.	Dentro del género <i>Dyssodia sp.</i> y <i>Adenophyllum sp.</i> en la planta completa se han detectado compuestos azufrados derivados del tiofeno.
Juárez-Flores et al., 2010.	Evaluaron el efecto de los polvos foliares de <i>Adenophyllum cancellatum</i> y otras asteráceas, obteniendo un 73.8% de mortalidad del gorgojo del maíz.
Valdez-Martínez, 2014.	<i>Adenophyllum cancellatum</i> causó inhibición significativa en la germinación del hongo <i>Aspergillus ochraceus</i> , que es un agente fitopatogénico.
Hernández-Martínez et al., 2016.	Determinaron que el extracto de acetato de etilo de la raíz de <i>Adenophyllum aurantium</i> fue capaz de inhibir la diferenciación de trofozoítos de <i>Entamoeba invadens</i> , además inhibió la formación de abscesos hepáticos amebianos en hámsteres infectados con <i>Entamoeba histolytica</i> .

4 JUSTIFICACIÓN

Actualmente hay pocas investigaciones acerca de la especie *A. cancellatum* y se sabe que la infusión, pomadas y la cocción de dicha planta ha beneficiado a los habitantes de la comunidad San José de los Amates, Tonalico, Estado de México por lo que es de importancia investigar si esta tiene actividad antimicrobiana, además es importante evaluar la actividad antibiofilm ya que este es un mecanismo de resistencia de algunos microorganismos que afectan principalmente al desarrollo de infecciones nosocomiales.

5 HIPÓTESIS

Si *A. cancellatum* ha sido utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades de posible origen infeccioso y se sabe que los aceites esenciales contienen una gran variedad de componentes con diversas propiedades biológicas entonces es probable que el aceite esencial de *A. cancellatum* presenta efecto antimicrobiano y antibiofilm.

6 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibiofilm y antimicrobiana del aceite esencial de *A. cancellatum* para validar su uso en medicina tradicional.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el rendimiento del aceite esencial de *A. cancellatum*.
- Determinar la composición química del aceite esencial de *A. cancellatum*.
- Evaluar cuali y cuantitativamente la actividad antibacteriana del aceite esencial de *A. cancellatum*.
- Evaluar cuali y cuantitativamente la actividad antifúngica del aceite esencial *A. cancellatum*.
- Evaluar la actividad antibiofilm del aceite esencial de *A. cancellatum*.
- Evaluar el efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre las curvas de crecimiento de cepas bacterianas y levaduriformes con mayor actividad.

8 METODOLOGÍA

8.1 Colecta de material biológico

La colecta de la planta se realizó en el municipio de Tonalico, Estado de México en la comunidad de San José de los Amates con coordenadas GPS 18.784730220194994, -99.68694307687831 del 24 al 26 de septiembre del 2021. Se depositó un ejemplar en el herbario de FES Iztacala para su identificación (Apéndice 1).

8.2 Obtención de aceite esencial

Para obtener el aceite esencial de la planta se realizó una destilación por arrastre de vapor (Casado-Villaverde, 2018), utilizando 1.5 kg de la parte aérea de la planta fresca y fragmentada (Apéndice 2). Se obtuvo la densidad del aceite esencial y el rendimiento con relación a la masa de la planta fresca con la siguiente fórmula:

$$Rendimiento = \frac{g \text{ de aceite esencial}}{g \text{ de planta fresca}} \times 100$$

8.3 Determinación de la composición del aceite esencial

En relación con la determinación de la composición del aceite esencial, se determinó mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) (Apéndice 3).

8.4 Cepas bacterianas y levaduras

Para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial se utilizaron 15 cepas obtenidas del cepario del Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales en la UBIPRO, FES Iztacala siendo especies de interés médica. De las cuales 12 son cepas bacterianas y 3 cepas de levaduras.

8.5 Evaluación de la actividad antibacteriana

Bacterias Gram positivas: *Micrococcus luteus* ATCC 10240a, obtenida del cepario del CINVESTAV-IPN, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* cc y *Staphylococcus aureus* CUSI, donadas por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala. *Staphylococcus epidermidis* FES-C, donada por el Laboratorio de Microbiología, FES Cuautitlán.

Bacterias Gram negativas: *Escherichia coli* 82MR y *Escherichia coli* CUSI, donadas por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI, FES Iztacala. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Serratia marcescens* ATCC 14756, obtenidas del cepario del CINVESTAV-IPN, y *Salmonella typhi* ATCC 19430.

8.5.1 Evaluación cualitativa.

Se realizó la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Candelaria-Dueñas *et al.*, 2021). Como control positivo se utilizó cloranfenicol 25 µg/disco y se impregnaron 5 µL (3.05 mg) de aceite esencial en cada disco y posterior a las 24 horas de incubación se midió el halo de inhibición (mm) realizando por triplicado el procedimiento por cada cepa (Apéndice 4).

8.5.2 Evaluación cuantitativa.

A las cepas donde se presentó actividad, se les determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (CBM) por el método modificado de microdilución en caldo (Candelaria-Dueñas *et al.*, 2021). Para lo cual se utilizaron las siguientes concentraciones de aceite esencial: 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 y 3.0 (mg/mL). Como control positivo se utilizó cloranfenicol a diferentes concentraciones. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

8.6 Evaluación de la actividad antifúngica.

Cepas levaduriformes: *Candida albicans* 17MR, donada por el Laboratorio de Análisis clínicos de la CUSI, FES Iztacala, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis*, ambas aisladas de un caso clínico y donada por el Hospital Ángeles Metropolitano.

8.6.1 Evaluación cualitativa.

Se realizó la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Candelaria-Dueñas et al., 2021). Como control se utilizaron 30 µL nistatina y se impregnaron 5 µL (3.05 mg) de aceite esencial en cada disco y a las 24 horas de incubación se medirá el halo de inhibición (mm) realizando por triplicado el procedimiento por cada cepa (Apéndice 4).

8.6.2 Evaluación cuantitativa

A las cepas que presentaron inhibición del crecimiento, se les determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima fungicida (CFM) por el método modificado de microdilución en caldo Sabouraud (Candelaria-Dueñas et al., 2021). Para lo cual se utilizaron las siguientes concentraciones de aceite esencial: 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 y 3.0 (mg/mL). Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

8.7 Evaluación de la inhibición de formación de biofilm.

La inhibición del biofilm del aceite esencial se evaluó por el método de cristal violeta (Gómez-Sequeda et al., 2020), como criterio de selección de las cepas a utilizar fueron que el aceite esencial de *A. cancellatum* haya tenido un buen efecto respecto a las MICs y además que sean cepas formadoras de biofilm por lo que se evaluó la actividad antibiofilm para *S. aureus* cc empleando diferentes

concentraciones ½ MIC (0.50 mg/mL), MIC (1.00 mg/mL) y CBM (2.00 mg/mL), *E. coli* 82MR usando ½ MIC (0.375 mg/mL), MIC (0.75 mg/mL) y CBM (1.00 mg/mL); y finalmente *C. albicans* 17MR usando la ½ MIC (0.0625 mg/mL), MIC (0.125 mg/mL) y CBM (0.25 mg/mL). Se calculó el porcentaje de inhibición de formación de biofilm con la siguiente fórmula (Apéndice 6):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Control Negativo DO} - \text{Experimental DO}}{\text{Control negativo DO}} \times 100$$

8.8 Curvas de crecimiento

La determinación del efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre el crecimiento bacteriano y levaduriforme se realizó de acuerdo al método propuesto por (Kubo et al., 1992). Tomando como criterio de selección las mismas cepas que se utilizaron para la determinación de la actividad antibiofilm. Se realizó un monitoreo del crecimiento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en 9 tiempos durante 24 horas, mismas que se expusieron a diferentes concentraciones del aceite esencial. Para *S. aureus* cc se usó ½ MIC (0.50 mg/mL), MIC (1.00 mg/mL), CBM (2.00 mg/mL) y el grupo testigo; mientras que para *E. coli* 82MR ½ MIC (0.375 mg/mL), MIC (0.75 mg/mL), CBM (1.00 mg/mL) y el grupo testigo; y finalmente *C. albicans* 17MR usando la ½ MIC (0.0625 mg/mL), MIC (0.125 mg/mL), CBM (0.25 mg/mL) y el grupo testigo (Apéndice 7).

8.9 Análisis estadístico

Para determinar si existe diferencia significativa en la actividad antimicrobiana de aceite esencial en cada cepa comparada con el grupo control se realizó un análisis estadístico denominado ANOVA de un factor. Considerando estadísticamente significativo una $P < 0.05$. Se realizó con los datos recopilados utilizando Excel.

9 RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se identificó la planta recolectada (Figura 3) en la comunidad de San José de los Amates, Tonalico, Estado de México en el Herbario “Izta” de la FES Iztacala de la cual se obtuvieron los datos presentados en la tabla 4.

Tabla 4. Datos etnobotánicos de *A. cancellatum*.

Nombre científico:	<i>Adenophyllum cancellatum</i>
Sinónimos:	<i>Adenophyllum porophyllum</i> var. <i>cancellata</i> , <i>Dyssodia porophyllum</i> var. <i>cancellata</i>
Nombre común:	Árnica del monte.
Uso:	Medicinal: malestares dérmicos.
Zona de colecta:	Tonalico, Estado de México. Comunidad de San José de los Amates. (18°47' 4", 99° 41' 12")
Fecha de colecta:	24 de septiembre de 2021
Colectoras:	Edith López Villafranco, Patricia Jáquez Ríos, Silvia Aguilar Rodríguez.
Número de registro:	3504

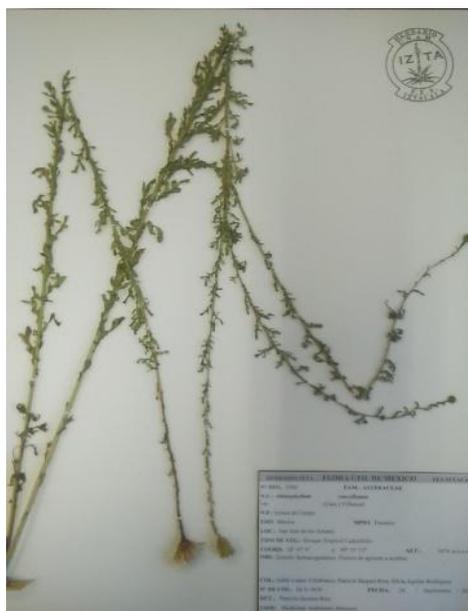


Figura 3 Ejemplar de herbario de *A. cancellatum*

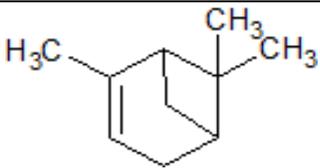
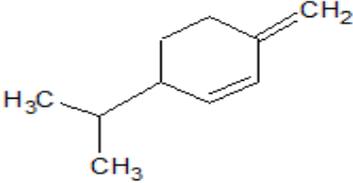
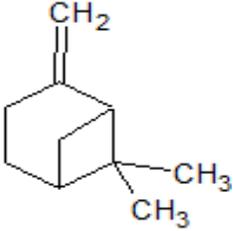
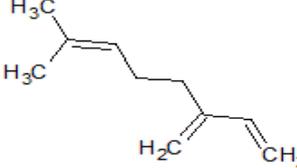
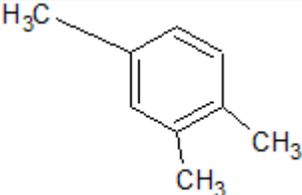
9.1 Obtención del aceite esencial.

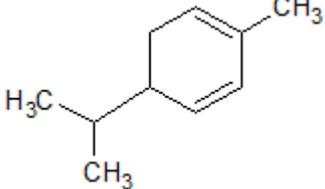
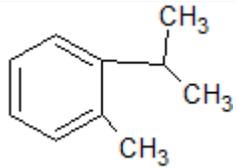
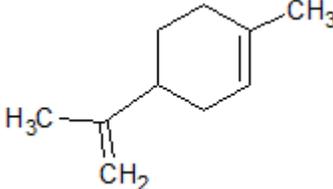
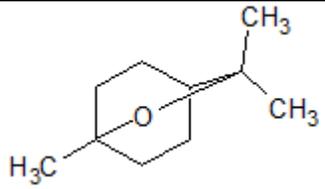
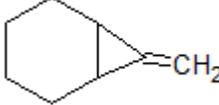
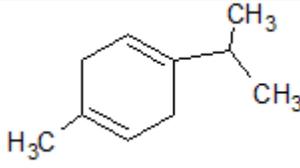
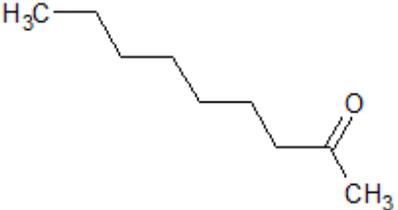
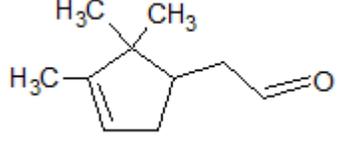
En cuanto a la extracción del aceite esencial de la planta se obtuvo un rendimiento de 0.467% y la densidad de este fue de 0.61 g/mL.

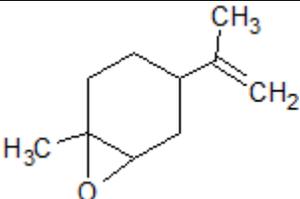
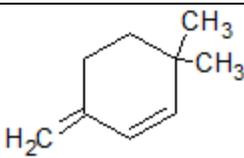
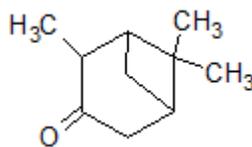
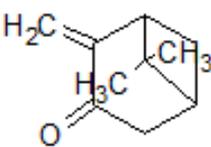
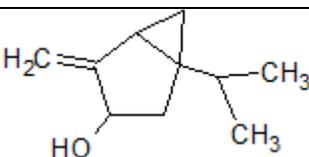
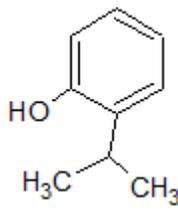
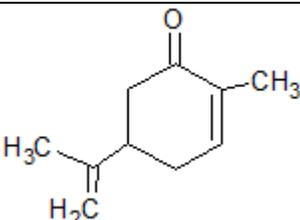
9.2 Determinación de la composición del aceite esencial.

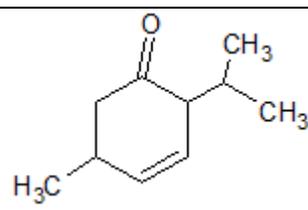
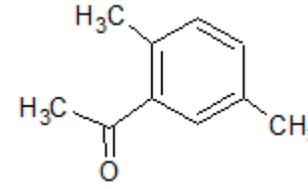
En la siguiente tabla se muestran los compuestos orgánicos obtenidos del análisis de la CG-EM, en esta se indica el tiempo de retención, nombre, peso molecular, tipo de compuesto, fórmula y en qué porcentaje se encuentran.

Tabla 5. Composición del aceite esencial de *A. cancellatum*

Tiempo	Nombre	P.M.	Tipo	Fórmula	%
6.60	α -pineno	136.23	monoterpeno		0.14
7.38	β -felandreno	136.23	monoterpeno		1.02
7.45	β -pineno	136.23	monoterpeno		1.25
7.70	β -mirceno	136.23	monoterpeno		0.37
7.77	Pseudocumeno	120.19	Hidrocarburo aromático		0.09

7.99	α -felandreno	136.23	monoterpeno		4.47
8.38	o-cimeno	134.22	monoterpeno		4.14
8.48	D-limoneno	136.23	monoterpeno		24.66
8.53	Eucaliptol	154.25	Monoterpeno oxigenado		1.50
8.82	7-metileno-biciclo [4.1.0]heptano	108.18	Monómero cíclico		0.05
9.05	γ -terpineno	136.23	Monoterpeno		0.23
9.22	No identificado	-	-	-	0.11
9.66	2-nonanona	142.24	Cetona		0.21
9.82	No identificado	-	-	-	0.08
10.24	No identificado	-	-	-	0.05
10.36	α -canfolenal	152.25	Monoterpeno		0.44

10.58	trans-óxido de limoneno	152.23	Monoterpeno oxigenado		0.24
10.71	3,3-dimetil-6metilenciclohexeno	122.21	Hidrocarburo		0.21
11.06	Pinocanfona	152.23	Monoterpeno oxigenado		37.54
11.10	Pinocarvona	150.22	Monoterpeno oxigenado		21.84
11.68	No identificado	-	-	-	0.07
11.78	Trans-sabinol	152.23	Monoterpeno oxigenado		0.34
11.83	No identificado	-	-	-	0.06
12.06	No identificado	-	-	-	0.08
12.15	o-hidroxicuneno	136.19	Fenol		0.08
12.24	No identificado	-	-	-	0.05
12.53	Carvona	150.22	Monoterpeno oxigenado		0.34

12.68	No identificado	-	-	-	0.10
12.73	2-isopropil-5-metil-3-ciclohexen-1-ona	152.23	Monoterpeno oxigenado		0.17
13.47	1-(2-hidroxi-5-metilfenil)-etanona	150.17	Hidrocarburo aromático		0.07
Total identificado					100

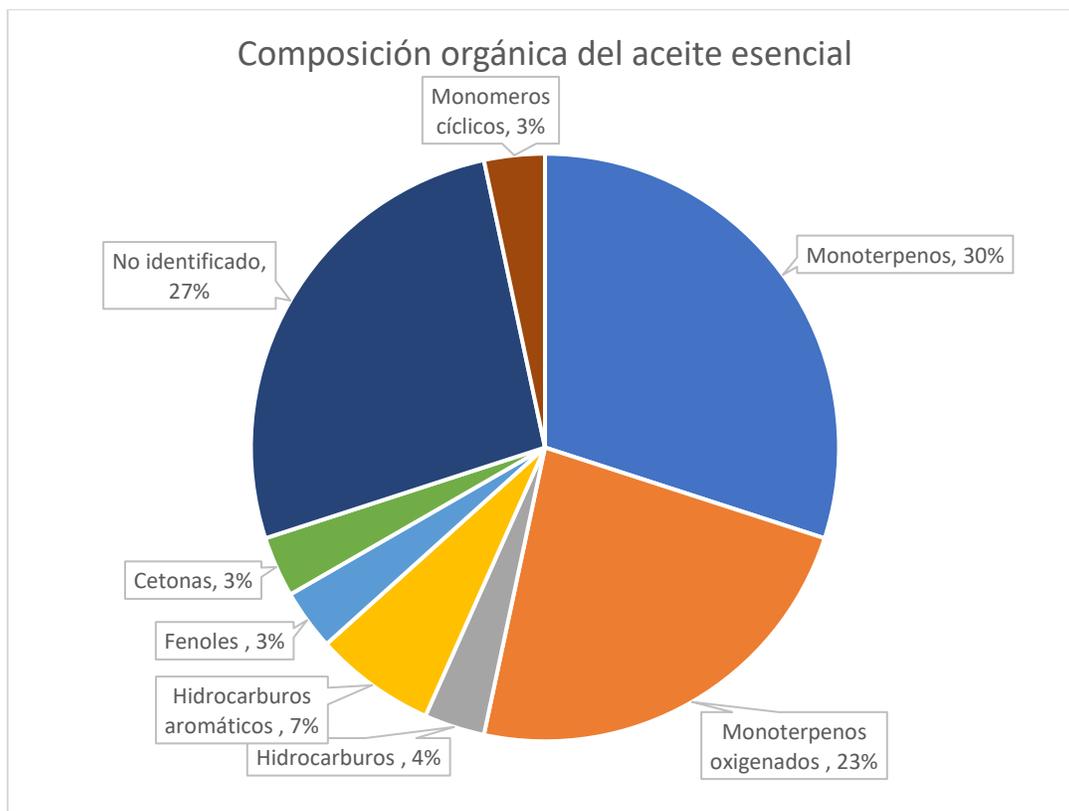


Figura 4. Composición química del aceite esencial de *A. cancellatum*

En cuanto a la composición química se puede observar en la figura 4, que los monoterpenos conforman un 30% de la composición del aceite esencial, seguido de monoterpenos oxigenados (23%), en una menor proporción se encontraron

hidrocarburos aromáticos (7%), hidrocarburos (4%), fenoles (3%), cetonas (3%), monómeros cíclicos (3%) y el 27% no se lograron identificar. En la tabla 5, se muestran los compuestos identificados con CG-EM siendo los prioritarios: pinocanforna (37.54%), pinocarvona (21.84%) y D-limoneno (24.66%).

9.3 Evaluación antibacteriana del aceite esencial de *A. cancellatum*.

Por lo que se refiere a la evaluación cualitativa y cuantitativa del aceite esencial sobre las cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación:

Tabla 6. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre cepas Gram positivas

Cepa bacteriana	Control positivo			Aceite esencial <i>A. cancellatum</i>		
	Halo (mm)	MIC (mg/mL)	CBM (mg/mL)	Halo (mm)	MIC (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	21.7±1.70	0.003	0.007	n.a.	n.d.	n.d.
<i>M. luteus</i> ATCC 10204	23.0±0.50	0.002	0.005	9.67±0.58	2.00	3.00
<i>S. aureus</i> 23MR	23.33±0.47	0.007	0.010	n.a.	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27.6±0.10	0.008	0.012	10.00±0.00	2.00	3.00
<i>S. aureus</i> CC	14.0±0.00	0.002	0.010	9.33±0.58	1.00	2.00
<i>S. aureus</i> CUSI	25.00±0.00	0.004	0.008	7.00±0.00	2.00	3.00
<i>S. epidermidis</i> FES-C	6.7±1.20	0.004	0.010	10.33±0.58	>3.00	>>3.00
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	12.66±0.47	0.002	0.005	n.a.	n.d.	n.d.

Valores promedio de 3 repeticiones ± D.E. (n.a.=no activo; n.d.=no determinado)

Tabla 7. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre cepas Gram negativas

Cepa bacteriana	Control positivo			Aceite esencial <i>A. cancellatum</i>		
	Halo (mm)	MIC (mg/mL)	CBM (mg/mL)	Halo (mm)	MIC (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	19.3±0.50	0.002	0.004	n.a.	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i> 82MR	30.66±0.94	0.004	0.010	8.00±0.00	0.75	1.00
<i>E. coli</i> CUSI	22.33±0.47	0.004	0.008	6.00±0.00	2.00	3.00
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	21.33±0.47	0.001	0.002	10.67±0.58	2.00	3.00
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	12.33±0.94	0.001	0.005	16.00±0.00	0.75	1.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	21.33±0.94	n.a.	n.a.	8.00±0.00	1.00	2.00
<i>S. typhi</i> ATCC 19430	21.33±0.94	n.a.	n.a.	20.00±0.00	1.00	2.00
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	24.00±0.81	0.001	0.001	n.a.	n.d.	n.d.
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	20.00±0.00	0.002	0.012	6.00±0.00	>3.00	>>3.00
<i>V. cholerae</i>	6.7±0.60	0.001	0.002	20.00±0.00	1.00	2.00

Valores promedio de 3 repeticiones ± D.E. (n.a.=no activo; n.d.=no determinado)

9.3.1 Evaluación cualitativa antibacteriana.

Los resultados de la actividad antibacteriana se encuentran en las tablas 6 y 7. Se puede observar que bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas presentaron susceptibilidad ante el aceite esencial de *A. cancellatum*. De las 8 cepas Gram positivas 5 resultaron ser sensibles al aceite. En cuanto a las bacterias Gram negativas, de las 10 cepas estudiadas, 8 fueron susceptibles a este.

9.3.2 Evaluación cuantitativa antibacteriana.

Los resultados de la evaluación cuantitativa para determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se muestran en las tablas 6 y 7.

En la tabla 6 se muestran los resultados de las bacterias Gram positivas y se puede observar que la bacteria más sensible al aceite esencial es *S. aureus* CC ya que esta presenta una MIC de 1.00 mg/mL y una CBM de 2.00 mg/mL.

En la tabla 7 se aprecian los resultados de las bacterias Gram negativas, la bacteria más sensible es *E. coli* 82MR presentando una MIC y una CBM de 0.75 mg/mL y 1.00 mg/mL respectivamente.

9.4 Evaluación antifúngica del aceite esencial de *A. cancellatum*.

En cuanto a la evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antifúngica en cepas levaduriformes se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 8. Actividad antifúngica del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre cepas levaduriformes

Cepa levaduriforme	Control positivo			Aceite esencial <i>A. cancellatum</i>		
	Halo (mm)	MIC (mg/mL)	CFM (mg/mL)	Halo (mm)	MIC (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i> 17MR	30.00±0.81	0.011	n.d.	20.00±0.00	0.125	0.25
<i>C. glabrata</i>	22.00±0.00	0.008	n.d.	10.00±0.00	<0.06	<<0.06
<i>C. tropicalis</i>	20.33±0.47	0.009	n.d.	15.00±0.00	0.25	0.5

Valores promedio de 3 repeticiones ± D.E. (n.a.=no activo, n.d.= no determinado)

9.4.1 Evaluación cualitativa antifúngica.

En la tabla 8 se muestra la actividad antifúngica del aceite esencial de *A. porophyllum* var. *cancellata*. En este se puede mostrar que las 3 cepas levaduriformes resultaron sensibles al producto natural.

9.4.2 Evaluación cuantitativa antifúngica.

Los resultados de la evaluación cuantitativa que muestran la MIC y la CFM se encuentran en la tabla 8. En este se observa que la especie más susceptible es *C. glabrata* ya que la MIC y la CBM fueron <0.06 y $\ll 0.06$ mg/mL, respectivamente.

En la figura 5, con el promedio de los halos de inhibición (mm) que se obtuvieron de las bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y levaduras se puede observar que el aceite esencial de *A. cancellatum* presenta un mayor efecto en las levaduras en comparación con ambos grupos de bacterias.

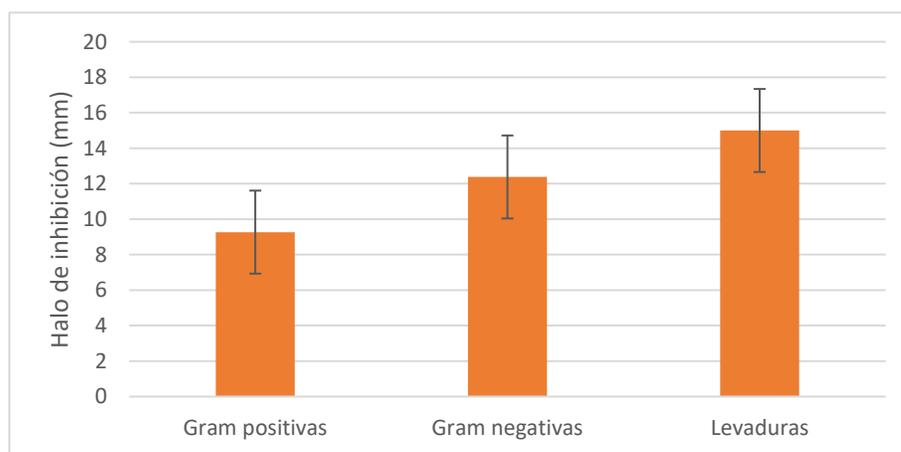


Figura 5. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *A. cancellatum*

9.5 Evaluación de la actividad antibiofilm

En la figura 6 se muestra la evaluación de la actividad antibiofilm del aceite esencial de *A. porophyllum* var. *cancellata*. En este se observa que en la media MIC en todas las cepas el efecto antibiofilm del aceite esencial fue muy similar. A la MIC, se aprecia que la cepa donde hay un mayor efecto de inhibición es *S. aureus* CC. En la última concentración utilizada (CBM) se muestra que el aceite esencial tiene mayor efecto antibiofilm en la *S. aureus* CC y seguido de este *C. albicans* 17MR, inhibiendo el 47.6% y el 46.3% del biofilm respectivamente.

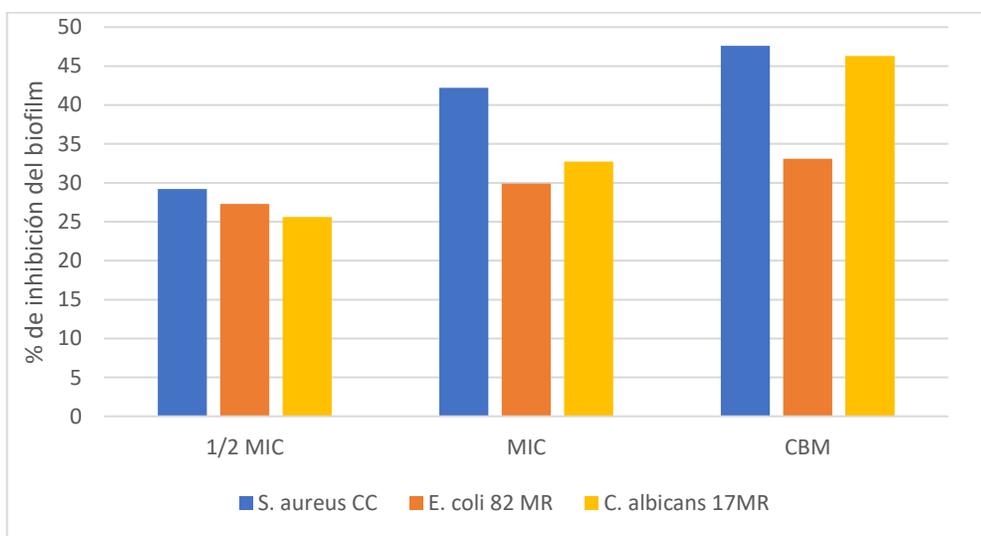


Figura 6. Porcentaje de inhibición del biofilm en *S. aureus* CC, *E. coli* 82MR y *C. albicans* 17MR

9.6 Curvas de crecimiento

En la figura 7, se puede observar el efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre el crecimiento de la cepa *S. aureus* cc, en la cual muestra que el testigo, $\frac{1}{2}$ MIC y MIC tiene un crecimiento exponencial mientras que en la CBM se puede observar que a las 6 horas disminuye totalmente la población sin embargo a partir de las 8 horas aumenta exponencialmente la población.

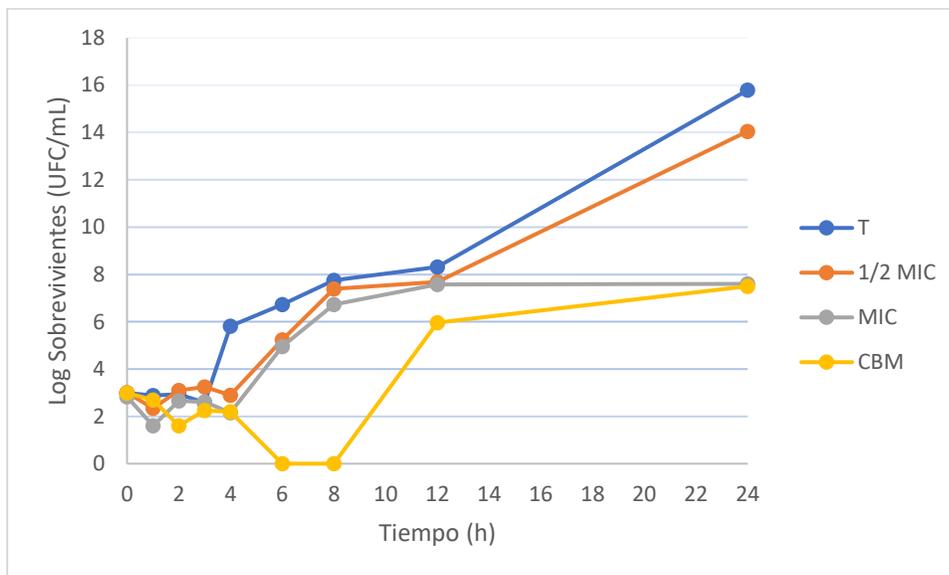


Figura 7. Efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* cc durante 24 horas. T=sin aceite esencial, $\frac{1}{2}$ MIC= 0.50 mg/mL, MIC= 1.00 mg/mL y CBM= 2.00 mg/mL

En la figura 8, se muestra la gráfica del efecto en la letalidad del aceite esencial en la cepa *E. coli* 82MR en la cual podemos observar que disminuye la población en la CBM, sin embargo, no es un cambio tan significativo respecto al testigo, $\frac{1}{2}$ MIC y MIC.

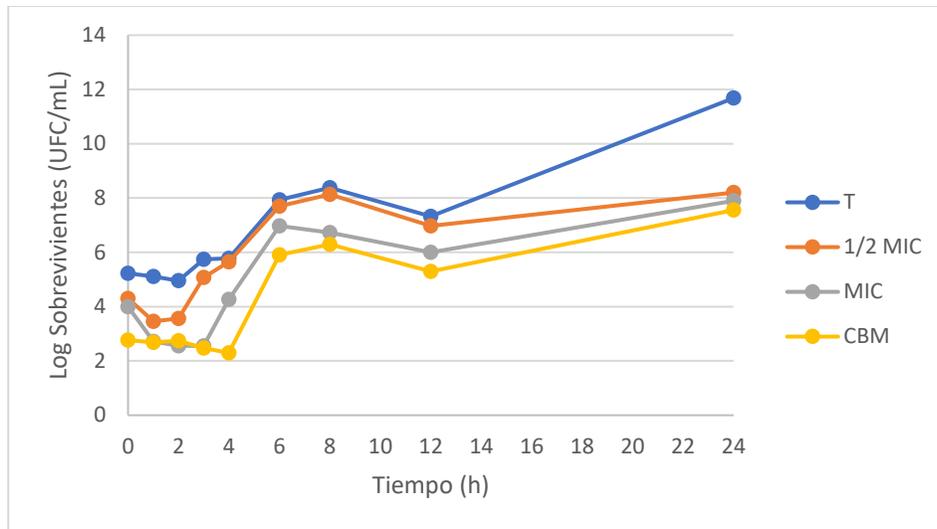


Figura 8. Efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre la curva de crecimiento de *E. coli* 82MR durante 24 horas. T=sin aceite esencial, 1/2 MIC= 0.375 mg/mL, MIC= 0.75 mg/mL y CBM= 1.00 mg/mL

En la siguiente gráfica (figura 9), se puede visualizar el efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* en la levadura *C. albicans* 17MR, debido a que presentó un mayor efecto en comparación con la actividad antibacteriana se probaron 1/4 MIC y 2CFM, de tal manera que se observa que el testigo, 1/4 MIC, 1/2 MIC tienen un crecimiento exponencial, en cambio en la MIC la población disminuye totalmente a las 8h, en la CFM a las 6 h disminuye totalmente la población y en 2CFM a las 2h disminuye la población sin recuperarse,

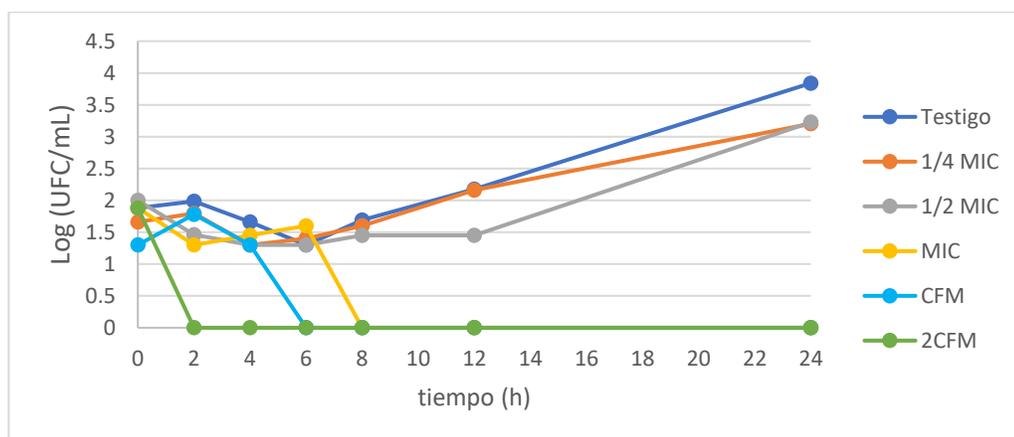


Figura 9. Efecto del aceite esencial de *A. cancellatum* sobre la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR durante 24 horas. T=sin aceite esencial, 1/4 MIC= 0.03125 mg/mL, 1/2 MIC= 0.0625 mg/mL, MIC= 0.125 mg/mL, CBM= 0.25 mg/mL y 2CBM= 0.5 mg/mL

10 DISCUSIÓN

La especie *Adenophyllum cancellatum*, pertenece a la familia Asteraceae incluye una gran cantidad de especies útiles y su uso etnobotánico ha ayudado a numerosos pueblos, son relevantes en la alimentación humana y animal, aceites esenciales, insecticidas, colorantes y son productoras de un gran número de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas (Del-Vitto & Petenatti, 2009).

A. cancellatum se reconoce fácilmente por la forma de las hojas -pinnatífidas, los lóbulos terminando en setas largas y del involucreo pectinado, más la flor amarilla-anaranjada con flores liguladas, es una hierba anual, mide 50 a 70 cm de alto y es aromática (Villarreal, 2003). El uso de esta especie en la comunidad de San José de los Amates, Tonatico, Estado de México es para malestares dérmicos de posible origen infeccioso.

El rendimiento del aceite esencial obtenido de la especie *A. cancellatum* es de 0.46%, expresado en gramos de aceite esencial por 100 g de materia vegetal fresca, dato que es relevante para futuros estudios sobre la misma especie y este depende del método de extracción utilizado. También se determinó la densidad del aceite esencial para preparar concentraciones del aceite esencial en la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana y fue de 0.61g/mL, presenta un aroma herbal fuerte y es incoloro.

En el análisis del aceite esencial se identificaron 30 compuestos orgánicos (tabla 4), principalmente está constituido por monoterpenos (30%), uno de los prioritarios dentro de este grupo de compuestos fue D-limoneno (24.22%), y también se encontraron α -pineno (0.14%), γ -terpineno (0.23%), β -mirceno (0.37%), α -canfolenal (0.44%), β -felandreno (1.02%), β -pineno (1.25%), o-cimeno (4.14%) y α -felandreno (4.47%). Mientras que los monoterpenos oxigenados ocupan el 23% de la composición del aceite esencial, entre estos se identificaron dos componentes prioritarios que son pinocanfona (37.54%) y pinocarvona (21.84%), y además trazas de: 2-isopropil-5-metil-3-ciclohexen-1-ona (0.17%), trans-óxido de limoneno (0.24%), carvona (0.34%), trans-sabinol (0.34%) y eucaliptol (1.50%). Todos estos

poseen una fuerte actividad antimicrobiana por la alteración de la integridad de la membrana bacteriana (Tongnuanchan y Benjakul, 2014).

Los monoterpenos son biosintetizados, a partir de un proceso general que se inicia con la Acetil coenzima A (mejor conocido como Acetil CoA, intermediario en el metabolismo mitocondrial), siendo el Isopentenil-pirofosfato (IPP) y su isómero Dimetilalil-difosfato (DMAPP), que se derivan del ácido mevalónico, los precursores del isopreno. La condensación de estos dos compuestos da lugar al pirofosfato de geranilo (GPP) unidad de la cual derivan los monoterpenos (Loza-Tavera, 1999).

En menor proporción se encontraron hidrocarburos aromáticos (7%), hidrocarburos (4%), cetonas (3%), fenoles (3%), monómeros cíclicos (3%) y el resto no se lograron identificar (27%).

Ahora bien, respecto a los grupos mayoritarios identificados en el aceite esencial, la pinocanfona es un compuesto que se ha identificado en aceites esenciales de otras especies con propiedades antisépticas, astringente, antioxidantes y tónicas, sin embargo, se considera responsable de efectos neurotóxicos, con actividad epileptogénica por lo que no es recomendable su administración por vía oral (Gómez-Orea et al.,1999). La pinocarvona, se ha identificado en el aceite esencial de otras plantas con efectos antifúngicos principalmente en levaduriformes oportunistas como el género *Candida* sp. y antibacterianos en bacterias Gram positivas como *S. aureus* MR (Kircher et al., 2010); y D-limoneno es utilizado en algunos alimentos por su efecto antibacteriano de amplio espectro actúa sobre las membranas citoplasmáticas de los microorganismos, causando una pérdida de integridad de la membrana, la inhibición de las enzimas respiratorias y disipación de la fuerza motriz de protones (Echeverry-Chica, 2020).

En la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana en las cepas de bacterias Gram positivas (tabla 6), se observa que *M. luteus* ATCC 10204, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* CC, *S. aureus* CUSI y *S. epidermidis* FES-C son susceptibles al aceite esencial de *A. cancellatum* y dos demostraron ser resistentes. Por lo que se tiene la certeza de decir que el aceite esencial tiene efectos en cepas

bacterianas Gram positivas y debido a que el efecto del aceite esencial está directamente relacionado con la composición del aceite esencial este efecto se le atribuye a el alto contenido de pinocarvona y D-limoneno. Ahora bien, en la evaluación cuantitativa, que nos sirve para determinar en cuál cepa es más eficaz puesto que a un menor valor de MIC y CBM mayor es el efecto antibacteriano del aceite esencial, en este caso *S. aureus* CC resultó más sensible con una MIC de 1.00 mg/mL y una CBM de 2.00 mg/mL.

Ahora bien, en la evaluación antibacteriana de las cepas Gram negativas (tabla 7) se observa que *E. coli* 82MR, *E. coli* CUSI, *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhi* ATCC 19430, *S. marcescens* ATCC 14756 y *V. cholerae* son sensibles al aceite esencial. De la determinación de la MIC y CBM las cepas donde se observó mayor efecto fueron *E. coli* 82MR y *K. pneumoniae* ATCC 13883, puesto que la MIC fue de 0.75 mg/mL y la CBM de 1.00 mg/mL en ambas cepas.

Comparando los resultados de las MIC's y CBM's de las cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, a diferencia de lo que se observa en otros estudios de la evaluación antimicrobiana de aceites esenciales en los cuales las bacterias Gram positivas son más susceptibles a estos, en este estudio las bacterias Gram negativas son más sensibles al aceite esencial *A. cancellatum*. Es importante mencionar que, debido a la gran variedad de moléculas presentes en los extractos naturales, la actividad antimicrobiana de los aceites no puede atribuirse a un único mecanismo (figura 10). Los efectos de los aceites esenciales suelen desestabilizar la bicapa de fosfolípidos, la destrucción de la función y composición de la membrana plasmática, la pérdida de componentes intracelulares vitales y la inactivación de los mecanismos enzimáticos. En algunos casos, también alteran la permeabilidad de la membrana al destruir el sistema de transporte de electrones y una serie de componentes conducen a un aumento de la concentración intracelular de ATP, evento que se vincula con la destrucción de la membrana microbiana. Cuando los compuestos antimicrobianos están presentes en el entorno que rodea a los microorganismos, las bacterias pueden reaccionar alterando la síntesis de ácidos

grasos y proteínas de membrana para modificar la fluidez de la membrana. La hidrofobicidad de los aceites esenciales y sus componentes les permite difundirse a través de la doble capa lipídica de la membrana. Pueden alterar tanto la permeabilidad como la función de las proteínas de membrana. La alteración de la permeabilidad de la membrana y los defectos en el transporte de moléculas e iones dan como resultado un “desequilibrio” dentro de la célula microbiana (Gómez-Sequeda et al., 2020).

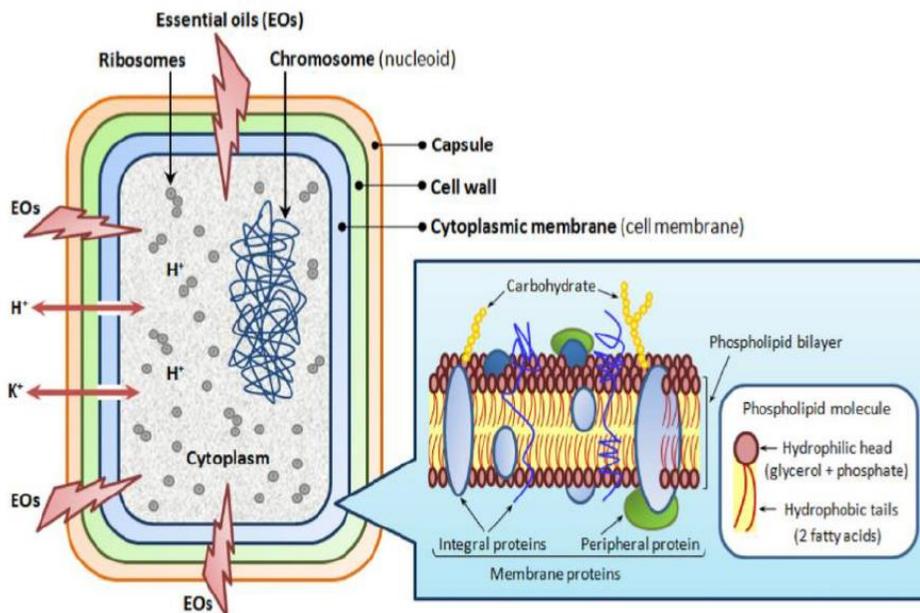


Figura 10. Efectos de los aceites esenciales en las bacterias (Tongnuanchan et al., 2014)

En el caso de la evaluación antifúngica (tabla 8), podemos observar que las tres cepas levaduriformes, *C. albicans* 17MR, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, son sensibles al aceite esencial de estudio, la más susceptible fue *C. glabrata* con una MIC <0.06 mg/mL y seguido de esta *C. albicans* 17MR, en la cual la MIC fue de 0.125 mg/mL y la CFM de 0.25 mg/mL. El efecto antimicrobiano, como se puede observar en la figura 5, fue mayor en cepas levaduriformes que en bacterias; Valdez-Martínez (2014) refleja en su estudio que la especie *A. cancellatum* tiene propiedades para el control de hongos fitopatógenos ya que puede restringir la diseminación por decocción de estos patógenos, esto nos da una referencia de que esta planta tiene mayor efecto en los hongos.

Para el análisis de los resultados de la actividad antibiofilm es necesario mencionar que el principio de la formación del biofilm se establece como parte de los procesos que se pueden presentar en el mecanismo conocido como *quorum sensing* (QS). Las bacterias mantienen una comunicación permanente entre ellas, dentro de los diferentes ambientes o microambientes donde permanecen y conviven. Los mecanismos de comunicación, le permiten reconocer cuando se alcanza el umbral o nivel de presencia, para desarrollar nuevas funciones, especialmente un comportamiento social, simbiótico y de permanente reconocimiento, útil para las tareas que adquieren en el mecanismo de QS (Díaz-Caballero et al., 2011). Este es dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias gram-negativas el autoinductor es principalmente acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias gram-positivas el autoinductor son péptidos cortos (Lasa et al., 2005) y en la especie *C. albicans* se han identificado un número de moléculas que afectan la capacidad de sufrir el cambio de levadura a hifas, y tres compuestos: tirosol, farnesol, y ácido farnesóico, demostraron ser moléculas autoinductoras del sistema de QS (Aparicio-Marengo et al., 2013).

En la figura 6, se presentan los resultados de la evaluación de la actividad antibiofilm, se estudió una cepa sensible al aceite esencial de cada grupo de cepas y se usaron las concentraciones de $\frac{1}{2}$ MIC, MIC y CBM/CFM. En esta podemos observar que *S. aureus* CC es donde el aceite presenta un mayor porcentaje de inhibición pues a la $\frac{1}{2}$ MIC inhibe un 29.2%, en la MIC el 42.2% y en la CBM el 47.6% del biofilm. Seguido de esta en *C. albicans* 17MR donde el aceite esencial a la $\frac{1}{2}$ MIC inhibe el 25.6% de biofilm, en la MIC el 32.7% y en la CFM un 46.3%; finalmente, en la especie *E. coli* 82MR no fue relevante el efecto antibiofilm pues en la $\frac{1}{2}$ MIC se inhibió el 27.3% del biofilm, en la MIC el 29.9% y en CBM un 33.1%. Algunas de las posibles razones por las que el aceite esencial tenga propiedad antibiofilm es que alguno de los compuestos fenólicos o monoterpenos que lo conforman tienen la capacidad de difundirse a través de la matriz de polisacáridos del biofilm lo que desestabiliza la comunicación celular (QS) entre bacterias o

levaduras, también podrían interactuar con las superficies de proteína, lo que provoca una alteración en la superficie celular y compromete la fase de unión inicial a las superficies que es primer paso del ciclo para la formación del biofilm (Nostro et al., 2007). Apuntar al sistema QS es ventajoso sobre las estrategias convencionales, porque solo se interrumpe el mecanismo de comunicación entre las bacterias y levaduras sin matar las células individuales. Por lo tanto, esta estrategia debería generar una menor presión selectiva y reducir la tasa de desarrollo de resistencia a los antimicrobianos durante el tratamiento. Dado que utilizan el sistema QS también para regular la expresión de factores de virulencia y la formación de biofilm, la inhibición del sistema de señalización debería, en principio, favorecer la viabilidad de cepas menos virulentas y prevenir o minimizar el establecimiento de biofilms patógenos (Reuter et al., 2016).

Las curvas de crecimiento proporcionan una información importante sobre la dinámica de la acción microbicida de un antimicrobiano y sobre la relación entre la concentración de antimicrobiano y su actividad microbicida (Cantón et al., 1999). En esta última parte de la experimentación, se observa en la curva de letalidad de la cepa *S. aureus* CC (figura 7) que a las 6 horas de incubación hay una disminución total de las UFC a la CBM (2.00 mg/mL), no obstante, pasando las 8 horas vuelve a haber un incremento logarítmico de las UFC, por lo que indicaría que el aceite esencial de *A. cancellatum* es bacteriostático, puesto que solo reduce el crecimiento de las células bacterianas.

Por otra parte, en la curva de crecimiento de *E. coli* 82MR (figura 8), se puede observar que solo reduce la cantidad de UFC, pero nunca se inhibe completamente el crecimiento, por lo que esto puede indicar que en cambio a como se creía en la determinación de MIC y CBM, el aceite tiene un mayor efecto en bacterias Gram positivas. Sin embargo, es en *C. albicans* 17MR donde la curva de crecimiento indica que el aceite esencial de *A. cancellatum* es más eficaz puesto que en la CFM (0.25 mg/mL) a las 4 horas de exposición hay una inhibición total de las UFC y no hay una recuperación de la población lo que indicaría la acción fungicida del aceite esencial.

11 CONCLUSIÓN

El rendimiento del aceite esencial de *A. cancellatum* fue de 0.46% y se identificaron 30 compuestos siendo los monoterpenos el 30% de la composición del aceite.

Los compuestos prioritarios fueron pinocanfona (37.54%), pinocarvona (21.84%) y D-limoneno (24.22%), que presentan propiedades astringentes, antisépticos y antimicrobianas.

El aceite esencial de la especie *A. cancellatum* tiene efectos antibacterianos en cepas Gram positivas y Gram negativas, sin embargo, es más eficaz como antifúngico puesto que las MIC's y CFM's fueron menores en las cepas levaduriformes y en la curva de crecimiento de *C. albicans* 17MR el efecto fungicida se observó a las pocas horas.

Se observó un moderado efecto antibiofilm en *S. aureus* CC y *C. albicans* 17MR, ya que se afecta el proceso de QS.

Por lo que el aceite esencial de *A. cancellatum* presentó actividad antimicrobiana validando su uso para el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. Descripción de la planta *Adenophyllum cancellatum* (Villarreal, 2003)

Es una hierba anual, de 50 a 70 cm de alto, su tallo es estriado, ramificado principalmente en la mitad superior, sin pelos. Las hojas son opuestas abajo alternas en la parte superior, sésiles, de 2-6 cm de largo, pinnatisectas, con 7-13 lóbulos, los lóbulos dentados a partidos, generalmente con setas de 7-10 mm de largo, con glándulas cerca del margen. La inflorescencia son cabezuelas (grupo de flores sésiles, densas y sobre una estructura generalmente aplanada) sobre pedúnculos de 3-10 cm de largo, con 1-7 brácteas similares a las hojas; involucre doble, el exterior de 8-18 brácteas pectinadas, con una glándula central; el involucre interior en forma de campana, de 8-10 mm de largo, con 14-18 brácteas lanceoladas y un poco dobladas, parcialmente fusionadas en la base, el ápice con una prolongación arqueada y una glándula abajo del ápice.

Las flores son liguladas de color amarillo-naranja, a veces con tintes rojizos, 12 a 15, de 7 a 10 mm de largo; flores del disco 30 a 60 color amarillo, corolas de 7 a 9 mm de largo. En cuanto a las semillas tiene aquenios obpiramidales de 4-5 mm de largo, estriados, con o sin pelos, vilano en dos series distintas, la externa de 10 escamas, oblongo-erosas de 0.7 a 1.3 mm de largo, estas a veces con punta de 1 a 3 aristas de 1.5 a 3 mm de largo; la serie interna de cerca de 10 escamas de 5.5 a 8.5 mm de largo, cada una partida de 5 a 9 cerdas.

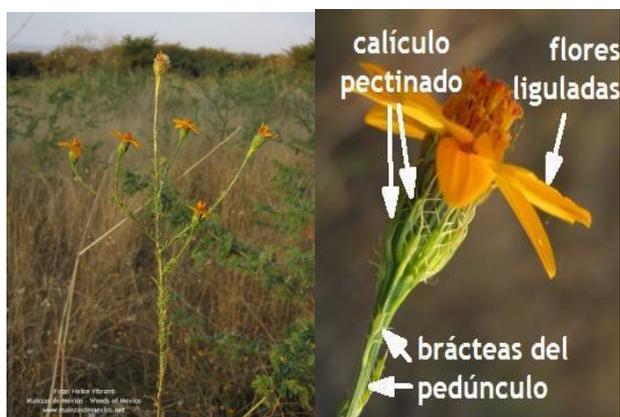


Figura 11. *A. cancellatum* (Villarreal, 2013)

APÉNDICE 2. DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR (Casado-Villaverde, 2018)

La destilación por arrastre con vapor de agua es el método más común para la obtención de aceites esenciales. Se trata de un proceso de separación por el cual, mediante el uso de vapor de agua, se vaporizan los componentes volátiles de la materia vegetal.

El procedimiento consiste en hacer pasar un flujo de vapor de agua a través de la materia prima, en este caso la parte aérea de la planta, de modo que arrastra consigo los aceites esenciales. Posteriormente, estos vapores se enfrían y se condensan, dando lugar al destilado líquido formado por dos fases inmiscibles, la acuosa y la orgánica, que se puede separar por decantación gracias a la diferencia de densidad que existe entre ambas.

En primer lugar, se hace el montaje del equipo como se muestra en el esquema de la figura 10, en el cual se pueden observar las siguientes zonas de izquierda a derecha:

- Zona de generación de vapor: en ella se genera el vapor de agua que alimenta el proceso.
- Zona de destilación: aquí se encuentra la materia prima de la cual se desea extraer los aceites esenciales, haciendo uso del vapor generado de la zona anterior.
- Zona de condensación: sirve para condensar los vapores procedentes del matraz de destilación.
- Zona de recogida: es la última parte en la que se recolecta el destilado.

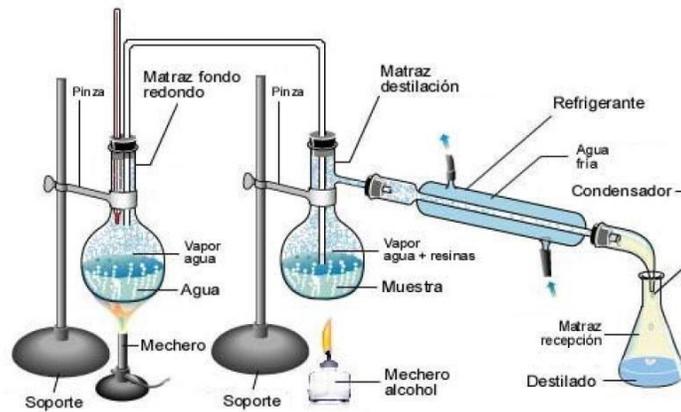


Figura 12. Esquema del montaje para destilación por arrastre de vapor (Casado-Villaverde,2018)

También es necesario determinar el rendimiento del proceso, el cual se define como el cociente entre masa del aceite esencial obtenido respecto a la masa de la materia prima vegetal introducido inicialmente.

APÉNDICE 3. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (Ricaldi y Martínez, 2014)

La Cromatografía de Gases es una técnica física de separación, basada en el principio de retención selectiva para separar y cuantificar componentes en mezclas volátiles complejas, al acoplarse a un Espectrómetro de Masas se complementan, identificando los componentes separados, los cuales producen un espectro de masas, único para cada componente, el análisis CG-EM sirve para la identificación de componentes de aceites esenciales con aplicaciones comparativas de bibliotecas de masas espectrales, de tal manera que puede realizar un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran los componentes o cuando se dispone de sustancia patrón, la calibración del equipo permite un análisis cuantitativo exacto de la muestra.

Las muestras fueron diluidas en 1 mL de diclorometano. Posteriormente se inyectaron al Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas.

El análisis cromatográfico se realizó en el siguiente equipo:

- Cromatógrafo de gases (CG) Agilent Technologies 7890B

Columna capilar	HP-5 ms 30m x 0.25mm x 0.25µm
Fase móvil	Helio a 1mL/min
Split	25:01:00
Temperatura del inyector	280°C
Programa de temperatura	
Temperatura inicial	40°C x 1 min.
Rampa 1	8°C/min
Temperatura final	300°C x 5 min.

- Detector de espectrometría de masas (EM) Agilent Technologies 5977D

Modo de ionización Impacto electrónico, 70 eV

Rango de masas 30-600 (m/z)

APÉNDICE 4. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR KIRBY-BAÜER (Candelaria-Dueñas et al., 2021)

Este método fue diseñado para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de cualquier sustancia a probar, ya sean compuestos químicos, aceites esenciales, fármacos, extractos de plantas, etc.

El método consiste en impregnar sensidiscos de celulosa previamente estériles con el aceite esencial, utilizando también un antimicrobiano específico (antibiótico o antifúngico) como control positivo.

Se debe de usar un medio de cultivo de acuerdo a la cepa que se esté analizando, para bacterias es común utilizar placas de agar Müller-Hilton ya que es un medio de cultivo nutritivo no selectivo, es decir, pueden crecer la mayoría de las bacterias patógenas. Mientras que para cepas levaduriformes utilizamos agar de Dextrosa y Papa (PDA), ya que contiene almidones y dextrosa que son la base del crecimiento de hongos y levaduras y debido al pH bajo (3.5) evita el crecimiento de las bacterias.

Las placas deben ser inoculadas previamente con el microorganismo a evaluar, mediante la preparación de una suspensión que se realiza en un cultivo líquido (caldo M-H o caldo Sabouraud), utilizando de 3 a 5 colonias aisladas, estas se adicionan a 10 mL de caldo dejándose incubar de 18 a 24 horas a 37°C, esperando que la turbidez corresponda al No. 5 de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/mL).

Pasado el tiempo de incubación se prosigue a sembrar en las cajas de agar utilizando un hisopo de algodón estéril se sumerge en el inóculo se retira el exceso y se siembra masivamente en toda la superficie del agar, (cabe destacar que no importa la cantidad que tome el hisopo, puesto que es una prueba cualitativa).

Posteriormente se colocan los sensidiscos previamente impregnados del aceite esencial a evaluar, procurando que queden uniformemente separados, (no más de 6 discos por caja).

Por último, las cajas previamente sembradas y con los discos se meten a incubar durante 24 horas a 37°C sin mayor tensión de CO₂ ya que el CO₂ puede

formar ácido carbónico en la superficie húmeda del agar, provocando un descenso en el pH. (El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición). A medida que las bacterias se multiplican durante la incubación el antibiótico y la sustancia a evaluar si tiene propiedades inhibitorias se irá difundiendo alrededor de cada sensidisco el cual puede observarse como un halo transparente proporcional a la susceptibilidad del microorganismo, lo que significa que si se observa este fenómeno es porque la sustancia a evaluar tiene propiedades inhibitorias. Finalmente se miden las zonas de inhibición con Vernier, reportando los valores obtenidos en milímetros (mm).

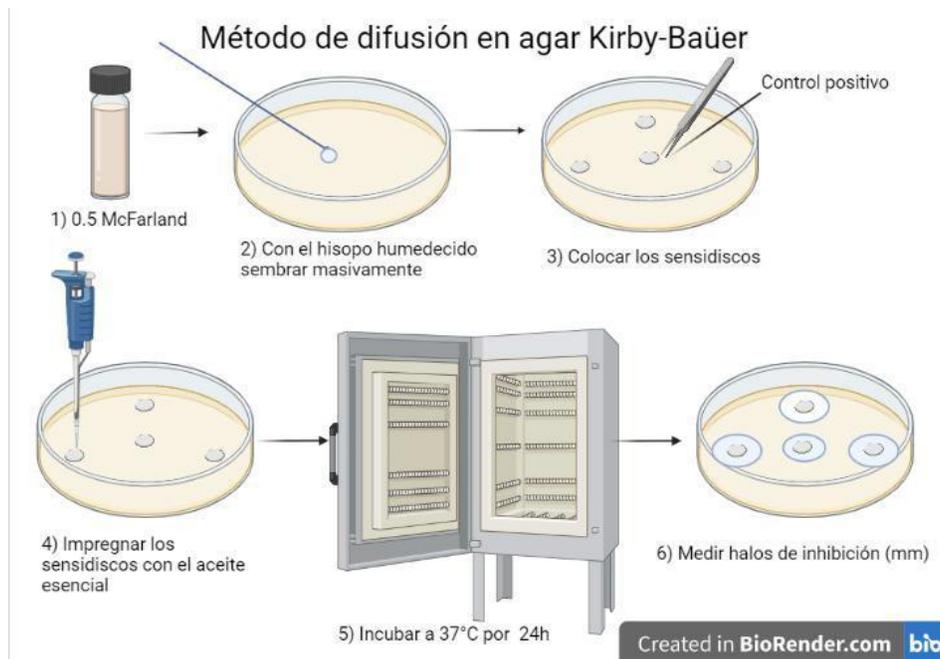


Figura 13. Esquema del procedimiento del método de difusión en agar Kirby-Baüer.

APÉNDICE 5. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA LA DETERMINACIÓN DE MIC Y CBM (Koneman et al., 1996)

La Concentración Mínima Inhibitoria es uno de los parámetros más importantes para determinar la sensibilidad de una bacteria o levadura frente a un antimicrobiano. Esta técnica consiste en agregar a tubos Eppendorf de 1 mL diferentes concentraciones del aceite esencial de manera tal que cada fila de tubos tenga una concentración diferente de la sustancia. Como resultado se determina la mínima concentración en la que se observa una disminución drástica del crecimiento bacteriano. Mientras que la CBM y CFM considera la concentración donde no se observa crecimiento, es decir la concentración a la cual el extracto permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original.

Para este bioensayo se ocuparon las concentraciones de 3.00, 2.00, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125, 0.06 (mg/mL) del aceite esencial y el testigo que no contiene aceite, cabe destacar que las diluciones se prepararon al doble de la concentración ya que se agregaron 100 μ L en cada pozo y 100 μ L del inóculo.

Para tal fin, el inóculo consiste en una suspensión bacteriana o de levaduras con una concentración aproximada de 1.5×10^8 UFC/mL. Se realiza tomando 3 a 4 colonias aisladas a 10mL de caldo M-H o Sabouraud, según sea el caso, y se incuba a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se toman 10 μ L y se adicionan a 10 mL de solución salina 0.9% obteniendo así una concentración de 10^5 UFC/mL. Este se adiciona con la ayuda de una micropipeta tomando 100 μ L y colocándolos en cada tubo Eppendorf previamente llenado con 100 μ L de cada concentración. Se lleva a incubar durante 24 horas a 37°C.

Posterior a la incubación, para la lectura de resultados es necesario sembrar 15 μ L de cada concentración en placas de agar M-H o PDA (según se trate de bacterias o levaduras), para esto se utilizan cajas Petri estériles triseptadas llenas con el medio de cultivo y se marcan con cada una de las concentraciones y la cepa a analizar. Se meten a incubar en la estufa a 37°C por 24 h. Pasado este tiempo, se cuentan las UFC de cada septo para determinar la MIC y CBM.

Método modificado de microdilución en caldo

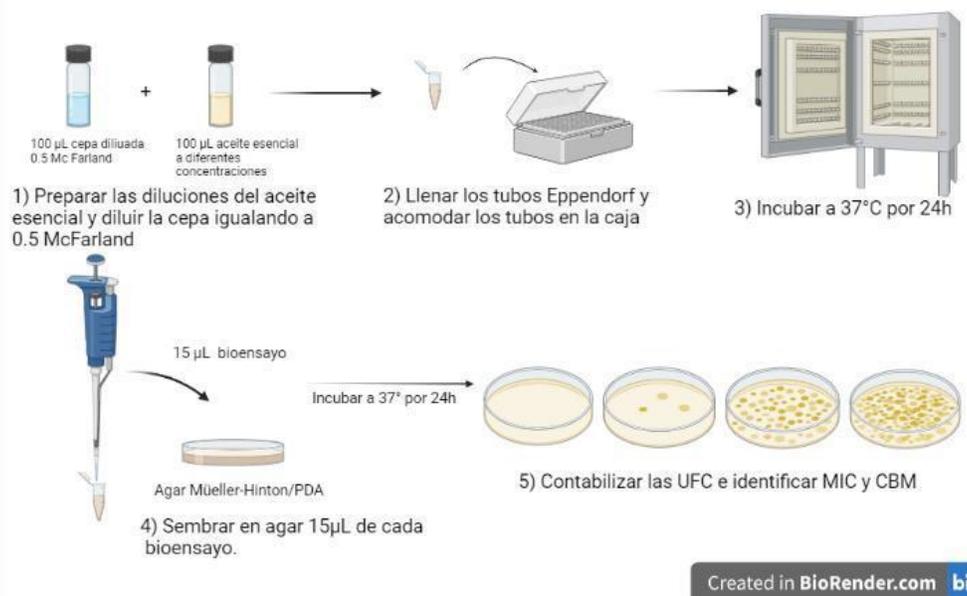


Figura 14. Esquema del Método modificado de microdilución en caldo

APÉNDICE 6. MÉTODO DE CRISTAL VIOLETA (Gómez-Sequeda et al., 2020)

La inhibición del biofilm del aceite esencial se evaluó en una microplaca con fondo en U de 96 pocillos hasta alcanzar un volumen final de 200 μ L. Esto se realizó agregando 100 μ L del aceite esencial de *A. cancellatum* a diferentes concentraciones (1/2 MIC, MIC y CBM) y 100 μ L de cultivo bacteriano (5×10^5 UFC/mL) en cada pocillo, utilizando cepas formadoras de biofilm como son *S. aureus* cc, *E. coli* 82MR y *C. albicans*. El control negativo fueron los pocillos que contenían cultivo bacteriano sin aceite esencial y las microplacas se incubaron a 37°C durante 48h.

Después de la incubación, se eliminó el contenido de los pocillos enjuagando tres veces con solución salina estéril al 0.9% para eliminar las bacterias planctónicas; luego las microplacas se secaron en estufa a 60°C durante 45 min. Posteriormente cada pocillo se tiñó con 200 μ L de cristal violeta a 0.4% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Transcurrido el tiempo la microplaca se enjuaga nuevamente tres veces con solución salina estéril al 0.9% para eliminar el exceso de cristal violeta y se le agregó 200 μ L de ácido acético al 30%. El líquido de cada pocillo se transfirió a una nueva microplaca de fondo plano y se midió la absorbancia a 620 nm utilizando un lector de microplacas ELISA. Cada ensayo se replicó 12 veces. Finalmente, se calcularon los porcentajes de inhibición a cada concentración del aceite esencial mediante la siguiente fórmula (Gómez-Sequeda et al., 2020):

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Control Negativo DO} - \text{Experimental DO}}{\text{Control negativo DO}} \times 100$$

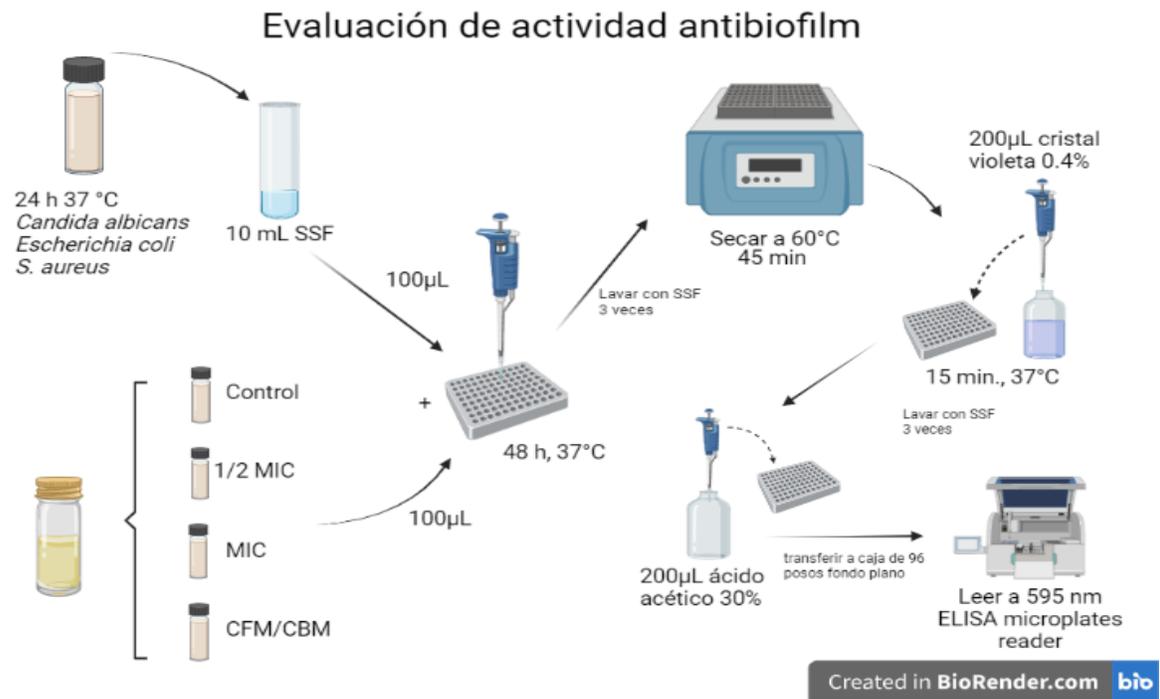


Figura 15. Esquema del proceso del Método Cristal Violeta.

APÉNDICE 7. CURVA DE LETALIDAD (Kubo et al., 1992)

Este método permite determinar el efecto del aceite esencial sobre las curvas de crecimiento de bacterias y levaduras con base en la MIC y la CBM. Para llevar a cabo esta técnica, primero se tienen que preparar las diluciones a las concentraciones de la $\frac{1}{2}$ MIC, MIC y CBM.

Posteriormente, se prepara el inóculo, tomando 4 o 5 colonias de la cepa, a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL (0.5 Mc Farland), se adicionan 10 μ L de este en 10 mL de Solución Salina al 0.9% teniendo una concentración de 1.5×10^5 UFC/mL.

Los bioensayos se preparan adicionando 100 μ L de cada concentración del aceite esencial más 100 μ L del inóculo en tubos Eppendorf, considerando que serán 9 tiempos: T0 (0h), T1 (1h), T2 (2h), T3 (3h), T4 (4h), T5 (6h), T6 (8h), T7 (12h) y T8 (24h), por lo que se deben llenar y marcar la caja con los Eppendorf (las columnas con Testigo, $\frac{1}{2}$ MIC, MIC y CBM y filas con los tiempos).

En cada tiempo, se deben de tomar 15 μ L por concentración y sembrar en agar (Müeller-Hinton o PDA, según la cepa a analizar), debido a que pueden crecer abundantes colonias que imposibilita contabilizar las UFC, se debe realizar un factor de dilución así que se realizan 2 diluciones seriadas y cada una de estas se siembra en el agar (se utilizaron cajas Petri estériles triseptadas), cabe recalcar que cada que se adicionan los 15 μ L se debe pasar la espátula para expandir la alícuota y sea posible leer los resultados. Las cajas se deben incubar a 37°C por 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación se procede a contabilizar las colonias obtenidas y considerando las diluciones realizadas se grafica el Logaritmo de las UFC contra el tiempo y se observa la tendencia. Finalmente se realiza una extrapolación de la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Aparicio-Marenco, D. E., Ariza-Daza, J., Calvo-Trujillo, M., Daza-Cuello, J., & Echávez-Plata, E. (2013). Quorum sensing: mecanismo de comunicación celular en "Candida albicans". *Ciencia Y Salud Virtual*, 5(1), 109–117. <https://doi.org/10.22519/21455333.336>
2. Argueta-Villamar A., Caso-Asseleh LM., Rodarte ME., Gallardo-Vázquez, MC. (2009) *Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, UNAM. Recuperado de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=dyssodia-porophylla>
3. Aurelio-Mendoza, MA. (2011) *El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos*. Rev. Facultad de Medicina. UNAM. 54(1): 18-27.
4. Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, E. (2009) *Metabolismo secundario de las plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.
5. Candelaria-Dueñas, S.; Serrano-Parrales, R.; Ávila-Romero, M.; Meraz-Martínez, S.; Orozco-Martínez, J.; Ávila-Acevedo, JC.; García-Bores, AM.; Cespedes-Acuña, CL.; Peñalosa-Castro, I. and Hernandez-Delgado T. (2021) "Evaluation of the Antimicrobial Activity of Some Components of the Essential Oils of Plants Used in the Traditional Medicine of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Puebla, México" *Antibiotics* 10, no. 3: 295. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030295>
6. Cantón E., Pemán J. (1999) "Curvas de letalidad en antifúngicos". Rev. Iberoam. Micol. Recuperado el 09 de abril de 2022 en <http://www.reviberoammicol.com/1999-16/082085.pdf>
7. Casado-Villaverde I. (2018) *Optimización de la extracción de Aceites esenciales por Destilación en Corriente de Vapor*. [Tesis de Ingeniería, Unidad Politécnica de Madrid]
8. Daza-Pérez, RM. (1998) *Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria*. 22(3) Recuperado el 9 de abril de 2022 de <https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
9. Del Vitto, L., Petenatti, E. (2009) Asteráceas de importancia económica y ambiental: Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. Recuperada el 9 de abril de 2022 de https://www.researchgate.net/publication/43531642_Asteraceas_de_importancia_economic_a_y_ambiental_Primer_a_parte_Sinopsis_morfologica_y_taxonomica_importancia_ecologica_y_plantas_de_interes_industrial
10. Díaz-Caballero, A.J., Vivas-Reyes, R., Puerta, L., Ahumado-Monterrosa, M., Arévalo-Tovar, L., Cabrales-Salgado, R., & Herrera-Herrera, A. (2011). "Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión." *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 23(3), 195-201. Recuperado en 09 de abril de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852011000300005&lng=es&tlng=es.
11. Echeverry-Chica, Julián, Naranjo-Díaz, Andrea, Araque-Marín, Pedronel. (2020). *Nanopartículas de plata funcionalizadas in situ con D-limoneno: efecto en la actividad antibacteriana*. *Revista ION*, 33(1), 79-92. Epub June 26, 2020. <https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020008>

12. Farfán U, Mauricio, Flores G, Oscar, Navarro G, Niurka, Prado J, Valeria, Mora L, Guido, & Toro U, Cecilia. (2002). Caracterización molecular de mecanismos de resistencia a cloranfenicol en cepas de *Shigella flexneri* aisladas en niños chilenos con diarrea aguda. *Revista médica de Chile*, 130(3), 275-280. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872002000300005>
13. Gómez-Orea, D., Rodríguez-Sánchez, J., Villarino-Valdivielso, T. (1999) *Las plantas de extractos. Bases para un plan de desarrollo del sector*. Fundación Alfonso Martín Escudero. Madrid España.
14. Gómez-Sequeda N, Cáceres M, Stashenko EE, Hidalgo W, Ortiz C. (2020) "Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)." *Antibiotics* (Basel). 24;9(11):730. doi: 10.3390/antibiotics9110730. PMID: 33114324; PMCID: PMC7690905.
15. Gregori-Valdés, BS. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1. Recuperado en 18 de abril de 2022, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012&lng=es&tlng=es.
16. Hernández-Sánchez, C. (1989) *Estudio etnobotánico de plantas medicinales en el ejido "La Zapotera", municipio de Poncitlán, Jalisco*. [Tesis de Ingeniería, Universidad de Guadalajara]. Repositorio del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
17. Hernández-Martínez, M., Hernández Ramírez, V., Hernández-Carlos, B., Chávez Munguía, B., Calderón-Operaza, MA., Talamás-Rohana, T. (2016) Antiamoebic Activity of *Adenophyllum aurantium* (L.) Strother and Its Effect on the Actin Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*. *Front. Pharmacol.* 7:169. doi: 10.3389/fphar.2016.00169
18. Juárez-Flores, B.I., Jasso-Pineda, Y., Aguirre-Rivera, J.R., & Jasso-Pineda, I. (2010). *Efecto de polvos de asteráceas sobre el gorgojo del maíz (Sitophilus zeamais Motsch)*. *Polibotánica*, (30), 123-135. Recuperado en 04 de noviembre de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200009&lng=es&tlng=es.
19. Kircher, K., Wisniewski Jr., A., Cruz, A., Biavatti, M., Netz, D. (2010) Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oils. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20(5): 692-699.
20. Kubo, Y., Muroi, H., Himejima, M. (1992) Antimicrobial activity of green tea flavor components. En *bioactive volatile compounds from plants*. Editores American Chemical Society. E. U. A.
21. Koneman, W.M., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenber, W.C. Winn, 2004. *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Panamericana, Buenos Aires, pp. 565-620.
22. Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175. Recuperado en 19 de abril de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es.
23. Loza-Tavera H. (1999) Monoterpenes in essential oils. Biosynthesis and properties. *Adv Exp Med Biol.* 464:49-62. doi: 10.1007/978-1-4615-4729-7_5. PMID: 10335385.
24. Mondo Ecosostenibile. (2020) *Pinocamphe*. Recuperado de: <https://antropocene.it/es/2020/11/10/pinocanfene/>
25. Moreno M, Claudia, González E, Rubén, & Beltrán, Constanza. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>

26. Nostro A., Roccaro AS, Bisignano G., Marino A., Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F., Blanco AR. (2007). "Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms." *J.Med. Microbiol.* 2007; 56 :519–523. doi: 10.1099/jmm.0.46804-0.
27. Organización Mundial de la Salud (2020, 13 de octubre) *Resistencia a los antimicrobianos*. Recuperado el 27 de octubre de 2021 de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
28. Reyes F, Palou E, López A. (2012) *Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos.* 6(1): 29-39.
29. Reuter, K., Steinbach, A., & Helms, V. (2016). Interfering with Bacterial Quorum Sensing. *Perspectives in Medicinal Chemistry.* <https://doi.org/10.4137/PMC.S13209>
30. Rodríguez, C. & Obrador, G. (2013) *Fichero farmacológico.* (1 ed) Mc Graw Hill.
31. Ruiz, Candy, Díaz, Camilo, & Rojas, Rosario. (2015). *Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú,* 81(2), 81-94. Recuperado en 27 de octubre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000200002&lng=es&tlng=es.
32. Ricaldi, J., Martínez, A. (2014) *Cromatografía de gases-espectrometría de masas de compuestos fitobioactivos del aceite esencial *Satureja incana*.* *Apuntes de Ciencia y Sociedad* 4(2). Recuperado el 9 de abril de 2022 de <https://doi.org/10.18259/acs.2014033>
33. Rivas, KB, Rivas, MA, Dávila, EL, & Rodríguez, M. (2002). Cefalosporinas: De la Primera a la Cuarta Generación. *Revista de la Facultad de Medicina,* 25(2), 142-153. Recuperado en 31 de mayo de 2022, de: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04692002000200003&lng=es&tlng=es
34. Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. (2014), *Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. Journal of Food Science,* 79: R1231-R1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
35. Trujillo, M. (2017) *Biofilms microbianos.* [Tesis de Licenciatura, Universidad de La Laguna].
36. Valdez-Martínez SC. (2014) *Efecto de siete especies de plantas medicinales sobre el crecimiento de hongos de importancia para la inocuidad alimentaria.* [Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Querétaro].
37. Valencia, B. (2018) *Mecanismos de resistencia antifúngicos y nuevos antifúngicos en desarrollo.* Recuperado el 9 de abril de 2022 de <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/BEATRIZ%20VALENCIA%20TORRES.pdf>
38. Vicente, D. y Pérez-Trallero, E. (2010) *Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol.* *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,* 28(2), 122-130. Recuperado en 31 de mayo de 2022, de: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
39. Villareal JA. (2003) *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Familia Compositae.* Recuperado el 27 de octubre de 2021 de <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOBA/Compositae-Tageteae113.pdf>
40. Zekaria D. (2006) *Los aceites esenciales, una alternativa a los antimicrobianos.* Recuperado el 27 de octubre de 2021, de https://www.wpsaaeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf