BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

"**Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana***"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIATURA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

LIMA DÍAZ DANIELA ESTEFANIA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. CHÁVEZ BRAVO EDITH

CO-DIRECTOR DE TESIS

DRA. HERNÁNDEZ CONDE LILIA ALEJANDRA

NOVIEMBRE 2023

BUAP

Oficio No. FIQ/AC/169/2023
Asunto: Registro de Tema de Tesis

C. DANIELA ESTEFANIA LIMA DÍAZ
PASANTE DE LA LICENCIATURA EN
INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la **Licenciatura en Ingeniería Ambiental** cuyo título es el siguiente:

"Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. *Clinopodium mexicanum y Agastache mexicana ssp. mexicana*"

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Directora de Tesis: Dra. Edith Chávez Bravo.

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **UNICAMENTE POR UN AÑO**.

A t e n t a m e n t e
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 23 de Agosto de 2023

Dra. Valeria Jordana González Coronel
Secretaria Académica

C.c.p. Directora de Tesis: Dra. Edith Chávez Bravo.
C.c.p. Archivo.

Facultad de Ingeniería Química
Av. San Claudio s/n, Col. San Manuel, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. C. P. 72590
01 (222) 229 55 00
Exts. 7250 y 7251

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA **CTC03**

Autorización de Impresión de Tesis

Ingeniería Química	( )	
Ingeniería Ambiental	(X)	Matrícula: 201734125
Ingeniería en Alimentos	( )	
Ingeniería en Materiales	( )	

Al C. Sustentante: Lima Díaz Daniela Estefania.

De acuerdo a la **presentación y revisión** de la **tesis:**

"Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana*"

se aprueba la impresión y empastado de la misma.

Jurado de examen profesional:

Firma

Presidente:	M.I.A Vega Hernández Miriam
Secretario:	M.I Silveti Loeza Ángel
Vocal:	Dra. Chávez Bravo Edith
Vocal:	Dra. Conde Hernández Lilia Alejandra

Fecha de examen: 10 de noviembre de 2023

H. Puebla de Zaragoza a 10 de octubre de 2023.

Comité Tutorial

Dra. Chávez Bravo Edith

Director de Tesis

Centro de Investigación de Ciencias Microbiológicas ICUAP

Dra. Conde Hernández Lilia Alejandra

Co-Director de Tesis

Facultad de Ingeniería Química

Comité Revisor de Tesis

Dra. Chávez Bravo Edith

Dra. Conde Hernández Lilia Alejandra

M.I.A Vega Hernández Miriam

M.I Silveti Loeza Ángel

Jurado de Examen

Dra. Chávez Bravo Edith

Dra. Conde Hernández Lilia Alejandra

M.I.A Vega Hernández Miriam

M.I Silveti Loeza Ángel

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por haberme forjado como la persona que actualmente soy, por los valores, principios, empeño, perseverancia y coraje para lograr mis objetivos, asimismo agradezco el apoyo, comprensión, consejos, amor y la confianza depositada en mi no dejando de lado obligaciones al igual que libertad en la toma de decisiones y por la motivación constante para alcanzar mis anhelos muchos de mis logros se los debo incluido este.

De igual manera, gracias a mis hermanas por el apoyo constante y en especial a quien ha sido parte fundamental de mi vida tanto académica como personal estando presente en cada etapa y por ser un apoyo incondicional espero este sea el inicio de un camino lleno de logros y éxitos en nuestras vidas profesionales y en el crecimiento personal.

Quiero agradecer a los miembros del comité tutorial, que han sido más que generosos con su experiencia y su valioso tiempo. Un agradecimiento especial a la Dra. Edith Chávez Bravo, Directora de Tesis por sus horas, lectura, aliento y, sobre todo, paciencia a lo largo de todo el proceso. De igual manera agradecer a la Dra. Lilia Alejandra Conde Hernández, M.I.A Miriam Vega Hernández y a M.I Ángel Silveti Loeza por aceptar formar parte de mi comité.

También agradecer a todos aquellos que de una u otra forma participaron de esta etapa de mi vida, especialmente a mis amigos, quienes estuvieron presentes en los momentos más difíciles y me ayudaron a seguir adelante.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN 10
JUSTIFICACIÓN: 11
OBJETIVOS: 12
OBJETIVO GENERAL 12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12
HIPÓTESIS: 12
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO 13
1.1. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA 13
1.2 BACTERIAS DE ESTUDIO 15
Pseudomonas aeruginosa 15
Klebsiella pneumoniae, ... 16
Shigella flexneri 17
Staphylococcus. aureus 18
Escherichia coli enteropatógena (EPEC) 19
Escherichia coli enteropatógena (ETEC) 19
Streptococcus pneumoniae 19
1.3 RESISTENCIA MICROBIANA 21
Natural o intrínseca 21
Adquirida 21
1.3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA 21
(i) Disminución del influjo o aumento del eflujo de antibióticos: 21
(ii) Modificación de los antibióticos: 22
(iii) Modificación de la diana antibiótica: 22
1.3.2 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES 23
1.4 ALTERNATIVA CONTRA LA RESISTENCIA BACTERIANA: PLANTAS MEDICINALES CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS 25
1.5 ESENCIAS NATURALES 25
1.5.1 *Clinopodium mexicanum* 27
TAXONOMÍA 28
DESCRIPCIÓN 28
USOS TERAPÉUTICOS 29
COMPOSICIÓN QUÍMICA 30

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 30
1.5.2 *Agastache mexicana ssp. mexicana* 31
TAXONOMÍA 31
DESCRIPCIÓN 32
USOS TERAPEÚTICOS 33
COMPOSICIÓN QUÍMICA 34
1.6 ANTECEDENTES DE LAS PLANTAS DE ESTUDIO 35
CAPÍTULO II METODOLOGÍA 37
2.1 DIAGRAMA DE TRABAJO 37
2.2 ACEITES ESENCIALES DE *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* 38
2.3 BACTERIAS DE ESTUDIO 38
2.4 ACTIVACIÓN DE LOS INÓCULOS BACTERIANOS 39
2.2.1 SELECCIÓN Y AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS 40
2.2.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD 41
2.2.3 PRUEBAS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS COMERCIALES 45
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN 47
3.1 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DEL ACEITE DE *Clinopodium mexicanum* 47
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS 47
BACTERIAS GRAM POSITIVAS 48
3.1.1 ACCIÓN DE METABOLITOS DE *Clinopodium mexicanum* y COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM NEGATIVAS Y GRAM POSITIVAS 51
3.2 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE LAS BACTERIAS DE ESTUDIO ANTE LA PRESENCIA DE *Agastache mexicana ssp. mexicana* 55
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS 55
BACTERIAS GRAM POSITIVAS 56
3.2.1 ACCIÓN DE METABOLITOS DE *Agastache mexicana ssp. mexicana* y COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM NEGATIVAS Y GRAM POSITIVAS 59
3.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE LOS PATÓGENOS A ANTIBIÓTICOS COMERCIALES 62
3.4 CONCLUSIONES 71
3.5 COSTO BENEFICIO 73
3.6 BIBLIOGRAFÍA 74

CONTENIDO FIGURAS

Figura 1 Disminución del influjo o aumento del eflujo de antibiótico 23
Figura 2 Modificación de los antibióticos 23
Figura 3 Modificación de la diana antibiótica 23
Figura 4 Planta *Clinopodium mexicanum* 29
Figura 5 Planta *Agastache mexicana ssp. mexicana* 33
Figura 6 Mapa Edafología del Estado de Puebla 35
Figura 7 Mapa de Edafología del Estado de Puebla 35
Figura 8 Municipio de Tzicatlacoyan en Puebla, México 36
Figura 9 Sembrado por gota de bacterias patógenas 39
Figura 10 Técnica de estria cruzada 40
Figura 11 Bacterias de interés aisladas por estría cruzada 41
Figura 12 Agua peptonada con inóculo estandarizado 43
Figura 13 Tubo Mcfarlad o.5 y material para impregnar los sensidiscos 44
Figura 14 Placa con sensidiscos impregnados y control 44
Figura 15 Incubación de placas 44
Figura 16 Antibiogramas Gram (+) color azul y Gram (-) color rojo 46
Figura 18 Antibiograma *E.coli DH5 α* 63
Figura 19 Antibiograma *E.coli E9034A* 63
Figura 20 Antibiograma *E2348/69- EPEC* 63
Figura 21 Antibiograma *Pseudomonas aeruginosa* 64
Figura 22 Antibiograma *Shigella flexneri S17* 64
Figura 23 Antibiograma *Klebsiella pneumoniae K7* 64
Figura 24 Antibiograma *Staphylococcus aureus* 67
Figura 25 Antibiograma *Streptococcus pneumoniae* 67

CONTENIDO TABLAS

Tabla 1 Proporciones de aceites esenciales y agua destilada estéril 38
Tabla 2 Bacterias patógenas utilizadas 39
Tabla 5 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (-) frente al aceite de *Clinopodium mexicanum* 49
Tabla 6 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (+) frente al aceite de *Clinopodium mexicanum* 50
Tabla 7 Mediciones de halos de inhibición en mm frente al aceite de *Clinopodium mexicanum* 54
Tabla 8 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (-) frente al aceite de *Agastache mexicana ssp mexicana* 57
Tabla 9 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (+) frente al aceite de *Agastache mexicana ssp mexicana* 58
Tabla 10 Mediciones de halos de inhibición en mm frente al aceite de *Agastache mexicana ssp., mexicana* 61
Tabla 11 Mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (-) 65
Tabla 12 Categorización de las bacterias Gram (-) referente a antibiogramas 65
Tabla 13 Comparación aceite *Clinopodium mexicanum* a diferentes concentraciones y antibiótico más utilizado 66
Tabla 14 Mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (+) 68
Tabla 15 Categorización de las bacterias Gram (+) referente a antibiogramas 68
Tabla 16 Comparación aceite *Agastache mexicana ssp.* mexicana a diferentes concentraciones y antibiótico más utilizado 69

INTRODUCCIÓN

La presente investigación hace referencia a la creciente problemática de la resistencia antimicrobiana, relacionada con el uso humano y no humano de antimicrobianos; uno de los temas tratados en el enfoque multisectorial denominado Una Salud, que conjunta a la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de Sanidad Animal (Wernli et al., 2017). Se suponía que los antibióticos eran un arma defensiva de bacterias, pero parece que tienen otras funciones (Fajardo & Martinez, 2008), y que los genes de resistencia servían para que las bacterias se defendieran, pero hay demasiados genes de resistencia en la naturaleza (Sommer et al., 2009). El lema de la OMS es “ninguna acción hoy, ninguna cura mañana”, ya que se estima que la resistencia bacteriana ocasionará 10 millones de muertes por año para el 2050 y una reducción de 2 y 5 % del producto interno bruto en algunos países (WHO, 2011). Para analizar esta problemática es necesario mencionar que a escala mundial más del 50% de los antibióticos se prescriben, dispensan o venden de manera inapropiada (Macfarlane et al., 1997); también puede ser producida por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población (Abreu et al., 2011).

El empleo de medicamentos es cada vez más deficiente, por ello se buscan nuevas alternativas; los aceites esenciales son conocidos desde épocas antiguas por tener propiedades naturales antimicrobianas y disminución de la sobrevivencia de microorganismos (Fischer & Phillips, 2008; Rivera et al., 2015). *Clinopodium mexicanum y Agastache mexicana ssp. mexicana* pertenecen a la familia *Lamiaceae* conocidas como Toronjil del Monte y Rojo, además son ocupados para problemas digestivos, gastrointestinales, del sistema nervioso, efectos sedantes y anticonvulsivos (Estrada-Reyes et al., 2010); por otra parte, para el dolor de estómago, tos, bilis, fiebre, vómito, nervios y ansiedad. y curar "susto" o "espanto" además de que no se ha demostrado actividad antimicrobiana en ellos (Santillán-Ramírez et al., 2008) respectivamente el uso de cada planta. La metodología a emplear consiste en realizar pruebas de susceptibilidad en donde se ponga de manifiesto la inhibición de estas esencias naturales contra bacterias patógenas.

JUSTIFICACIÓN:

Los microbios han desarrollado la capacidad de sobrevivir en las vacuolas del interior de la célula huésped produciendo diversas enzimas para degradar los componentes del sistema inmunitario del huésped; estas cosas hacen que estos organismos sean invencibles para el sistema inmunitario (Finlay & Falkow, 1997).

Los aceites esenciales, que cada vez más atraen la atención de diversos segmentos de la industria debido a sus múltiples funciones, especialmente propiedades antioxidantes (Tuttolomondo et al., 2013). La FAO ha señalado las plantas medicinales como un recurso que contribuye a la salud de las personas y al desarrollo sostenible (Marshall & Howthorne, 2012). El mercado de Sonora es el principal centro de distribución de plantas medicinales de México y el extranjero, mientras que Ozumba es uno de los mercados periféricos que suministran plantas medicinales frescas al mercado de Sonora. La influencia de estos mercados ha generado un aumento en el cultivo de plantas (Linares-Mazari & Bye, 2016).

Es por tal motivo, que se realizará una evaluación de susceptibilidad de la actividad antimicrobiana que presentan una serie de bacterias tanto Gram (+) como Gram (-) ante los aceites esenciales de dos tipos de plantas que son *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* mediante la formación de halos de inhibición. Los aceites esenciales son definidos como los productos obtenidos de diferentes partes de las plantas aromáticas obtenidas por técnicas de destilación con vapor, destilación hidráulica y prensado (Amorati et al., 2013).

Son mezclas líquidas complejas de sustancias volátiles y lipófilas, formadas por el metabolismo secundario de plantas caracterizadas por un olor agradable en la mayoría de ellos presentados (Simões et al., 2007; Bandoni & Czepak, 2008).

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales contra bacterias patógenas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* contra bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-).
- Comparar la eficiencia de inhibición de las plantas *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* contra las bacterias patógenas.
- Proponer nuevas alternativas para inhibir bacterias resistentes a antibióticos.

HIPÓTESIS:

La evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales como *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* indican la presencia de principios bioactivos, por lo que, son una alternativa natural frente a agentes patógenos.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia a antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano, constituye un problema creciente de la salud pública en todo el mundo, puede ser producida por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población (Abreu et al., 2011). En la actualidad, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública, debido a que las infecciones causadas por microorganismos resistentes a menudo fallan en responder al tratamiento, lo que resulta en mayor riesgo de muerte, hospitalización prolongada y altos costos hospitalarios (World Health Organization, 2019; Fair & Tor, 2014).

Los porcentajes de resistencia continúan en ascenso, advirtiendo paso a paso sobre el inicio de una era postantibiótica, en la que se tienen opciones terapéuticas limitadas, a tal punto de carecer por completo de tratamientos disponibles (Maldonado et al., 2014; Vasoo et al., 2015; Logan, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) advierta sobre la llegada, en el siglo XXI, de una era postantibiótica, en la que, a pesar de los más de 200 antibióticos desarrollados, ninguno será lo suficientemente efectivo; en un panorama similar a la era preantibiótica, en la que no se contaba con estos medicamentos (Laxminarayan et al., 2013; Centers for Disease Control and Prevention, 2019). En la actualidad, los porcentajes de resistencia son tan altos, que los clínicos han optado por utilizar antibióticos antes descontinuados por su toxicidad, como la colistina, antibiótico con mecanismos de resistencia también reportados (Loho & Dharmayanti, 2015).

Sumado a la falta de disponibilidad de antibióticos efectivos en las poblaciones con escasos recursos, las barreras de acceso a los servicios de salud, la venta libre de medicamentos en las farmacias y la ausencia de innovación por parte de la industria

farmacéutica, ha contribuido aún más a la complejidad del problema (Laxminarayan et al., 2013; Quizhpe, 2014).

México es un país donde la medicina tradicional aun juega un papel importante en el cuidado y preservación de la Salud, por lo que las plantas medicinales, ofrecen posibilidades para descubrir moléculas con actividad antimicrobiana (Ríos et al, 2003).

A pesar de las posibilidades ilimitadas que ofrece el reino vegetal para la identificación y desarrollo de nuevos fármacos, se realizan pocos trabajos interdisciplinarios acerca de la validación científica y antropológica de los remedios tradicionales (Maxia et al., 2005).

Es por ello que se plantea el estudio de los extractos de las plantas denominadas *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* contra diferentes tipos de bacterias tales como *E. coli* (E2348/69-EPEC), *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Shigella flexneri, Staphylococcus aureus, E. coli* (E9034A), *Streptococcus pneumoniae y E. coli* (DH5α) esto como réplica a la problemática abordada; como una labor para nuevas alternativas frente a agentes antimicrobianos que resulten novedosos y funcionales, utilizando extractos naturales como indicadores o marcadores de presencia de resistencia.

Evidenciando la visualización y posterior cuantificación de los efectos que presente esta alternativa natural contra los antibióticos que generalmente se utilizan.
Siendo así que estudios han demostrado que las plantas, incluidas las de uso popular, producen metabolitos activos, que presentan actividades antibacterianas, antihelmínticas, antifúngicas, antivirales, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otros (Muraina et al., 2009).

1.2 BACTERIAS DE ESTUDIO

Existe un gran número de bacterias patógenas de interés médico, pero las que últimamente han llamado la atención son las multirresitentes, debido a los porcentajes de morbilidad y mortalidad que causan aunado de su resistencia. En este estudio se eligió patógenos de dicho criterio, a continuación, se dan a conocer sus características.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria oportunista Gram negativa, patógeno intrahospitalario en pacientes inmunodeficientes, forma biopelículas en dispositivos médicos, siendo además agente causal de la fibrosis quística, cuyo tratamiento se asocia regularmente al desarrollo de resistencia a ciprofloxacina y a aminoglicósidos (Wilson & Dowling, 1998). Se encuentra en una amplia gama de ambientes, desde suelos secos hiperosmóticos hasta medios acuosos hiposmóticos; tiene gran versatilidad nutricional controlado por numerosos reguladores transcripcionales (Stover et al., 2000). La mayoría de cepas producen uno o más pigmentos, como piocianina (azul-verde), pioverdina (amarillo-verde y fluorescente) y piorubina (rojo-marrón) y tiene un aspecto nacarado (Wu et al., 2015). Es naturalmente resistente a la mayoría de penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y muchas de tercera generación (salvo ceftazidima), tetraciclinas, cotrimoxazol y rifampicina (Vila & Marco, 2010; Lister et al., 2009).

Es el principal microorganismo relacionado con infecciones nosocomiales, responsable aproximadamente de 10 a 15% de infecciones (Yordanov & Strateva, 2009; Gellatly & Hancock, 2013). Se le considera la quinta causa más frecuente en infecciones a nivel mundial, la segunda es neumonía nosocomial, la tercera son infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis (Pereira et al., 2015). Es causante de diferentes cuadros clínicos, entre los que destacan, la infección del tracto respiratorio en forma de neumonía relacionada con la ventilación mecánica o con menor frecuencia con la comunidad y también infecciones crónicas ya sea en pacientes con fibrosis quística (FQ) o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Esta bacteria se

adapta a vías respiratorias de humanos y sigue siendo su localización más frecuente (Garau & Gómez, 2003).

Klebsiella pneumoniae, enterobacteria productora de carbapenemasas (CPE) siguen siendo una de las amenazas sanitarias más urgentes. La carbapenemasa de *K. pneumoniae* (KPC, codificada por blaKPC) es uno de los genes de carbapenemasa más comunes en todo el mundo (Munoz-Price, et al., 2013). Se trata de una bacteria Gram negativa, encapsulada y no móvil, reside en el medio ambiente, incluido el suelo, aguas superficiales y dispositivos médicos (Bagley, 1985; Rock et al., 2014). Es extremadamente resistente cuyo éxito como patógeno parece seguir el modelo de "la mejor defensa para un patógeno es una buena defensa" en lugar de "la mejor defensa para un patógeno es una buena defensa" (Paczosa & Mecsas, 2016).

En esta era de resistencia a los antibióticos, *Klebsiella pneumoniae* representa uno de los patógenos más preocupantes implicados en la resistencia a los antibióticos y, como tal, junto con otros patógenos MDR de gran importancia, ha sido clasificado como un organismo ESKAPE (Boucher et al. 2009). La Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca *Klebsiella pneumoniae* como una de las bacterias multidrogorresistentes de alta prioridad para la investigación (Tacconelli et al., 2018) debido a su capacidad para acumular y diseminar genes de resistencia a los antimicrobianos, y a su elevada carga plasmídica (Wyres & Holt, 2018).

Klebsiella, al igual que gran parte de las enterobacteriáceas, muestra un patrón de resistencia natural mediado por betalactamasas cromosómicas, presentando así resistencia in vitro a las aminopenicilinas y carboxipenicilinas, sensibilidad disminuida a las ureidopenicilinas, conservando la sensibilidad frente a cefalosporinas, cefamicinas, monobactámicos, carbapenémicos y asociaciones con inhibidores de betalactamasas (Navarro et al., 2010; Livermore, 1995). *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista colonizador de piel y mucosas de pacientes hospitalizados que pueden presentar infecciones invasoras como bacteriemias o septicemias (González-Vértiz et al., 2001).

También causa infección del tracto urinario y neumonía en personas sin enfermedades de base, pero la mayoría de las infecciones son adquiridas en el hospital y/o en pacientes con alguna condición debilitante. Es causa además de bacteriemia, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto biliar, peritonitis y meningitis (López & Robledo, 2007).

Shigella flexneri bacteria Gram negativa, con forma de bastoncillo, inmóvil y no formadora de esporas, y agente causal de diarrea aguda que puede evolucionar a diarrea mucoide sanguinolenta, también conocida como disentería bacilar (o shigelosis) (Kahsay & Muthupandian, 2016). Familia *Enterobacteriaceae,* no decarboxilan lisina ni fermentan lactosa dentro de las 48 hora; utilizan glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido, pero no gas. (Della Gaspera et al., 2015). Los cuatro tipos de *Shigella spp*. comprenden el subgrupo A (*S. dysenteriae*), el subgrupo B (*S. flexneri*), el subgrupo C (*S. boydii*) y el subgrupo D (*S. sonnei*). Cada subgrupo contiene varios serotipos. La shigelosis puede presentarse en forma pandémica, epidémica y esporádica. Los informes epidemiológicos han demostrado que el subgrupo epidémico de la diarrea suele producirse como resultado de la infección por *S. flexneri* en los países en desarrollo y por *S. sonnei* en los países industrializados (Kahsay & Muthupandian, 2016; Qu et al., 2012).

Los antibióticos comunes utilizados para tratar infecciones entéricas bacterianas, como trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), ampicilina, tetraciclina y ácido nalidíxico ya no son eficaces en la shigelosis (Hoge et al., 1998). Muchos países de la región del sudeste asiático han informado de la aparición de cepas multirresistentes de *Shigella* en los últimos años. *Shigella flexneri* es la especie más común en países en desarrollo, mientras que *S. sonnei* es la más común en los países desarrollados (Hoge et al., 1998; Lim & Tay, 1991; Chu et al., 1998).

La RAM (Resistencia a Antimicrobianos) dentro del género *Shigella* es un problema para la gestión clínica (Erdman et al., 2008; Thompson et al., 2016). Actualmente, la OMS recomienda la ciprofloxacina como tratamiento de primera línea, siendo el pivmecillinam, ceftriaxona y azitromicina opciones alternativas. Sin embargo,

Shigella spp. es experta en adquirir genes y plásmidos AMR, y los informes de linajes multirresistentes (MDR) o aislados con susceptibilidad reducida a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación están aumentando en todo el mundo (Nuesch-Inderbinen et al., 2016; Aggarwal et al., 2016). Comúnmente es utilizado el antibiótico de Gentamicina; en 2010, alrededor de 40,000 niños murieron a causa de la shigelosis, y en 2013 se registraron aproximadamente 34,400 muertes (Mani et al., 2016). Los estudios de casos realizados en todo el mundo han llevado a la información de que la shigelosis es la diarrea potencialmente mortal en los niños (Kotloff et al., 2013).

Staphylococcus. aureus, clasificada como un coco Gram positivo que se agrupa en racimos, β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo. Se describe que este microorganismo hace parte de la flora normal de los seres humanos encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas (FEFMUR, 2006). Produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas puede ser la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina 1 del síndrome del shock tóxico (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliativas (ETA y ETB) y la leucocidina (Dinges et al., 2000).

En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a antibióticos y se pueden encontrar cepas resistentes y multirresistentes. La resistencia a la meticilina se determina utilizando el antibiótico oxacilina, por lo que se ha sugerido que estas cepas deberían llamarse *S. aureus* resistentes a oxacilina ("oxacillin-resistant *S. aureus*", ORSA), más que MRSA (Saïd-Salim et al., 2003). Resistencia a la vancomicina; debido a la resistencia a la meticilina, se introdujo la vancomicina de manera global a principios de los años 90’s como único antibiótico efectivo contra *S. aureus*. Sin embargo, ya en 1997 se encontraron cepas con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA) y en el 2002 se detectaron las

primeras cepas resistentes a este antibiótico ("vancomycin resistant *S. aureus*", VRSA) (Lee et al., 2005; Srinivasan et al., 2002).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un virotipo importante dentro de las cepas diarreogénicas de *E. coli* y se asocia a diarrea infantil, aguda o persistente, fundamentalmente en países en vías de desarrollo. Pertenece a la familia de patógenos bacterianos que a nivel intestinal causan lesiones de tipo adherencia y borramiento (A/E) (Knutton et al., 1987; McDaniel & Kaper, 1997).

A partir del Segundo Simposio Internacional sobre *EPEC* realizado en San Pablo en 1995, la definición aceptada por consenso es la siguiente: "*EPEC* son cepas diarreogénicas de *E. coli* que producen en las células intestinales lesiones histopatológicas de tipo A/E y que no producen toxinas tipo Shiga. Los cultivos *EPEC* 'típicos' de origen humano presentan un plásmido de virulencia denominado E. coli-adherence-factor (EAF), mientras que las cepas EPEC 'atípicas' no poseen dicho plásmido" (Kaper, 1996; Brinkley et al., 2006).

Escherichia coli enteropatógena (ETEC) este patotipo es un importante agente causal de diarrea, responsable de numerosos casos y muertes en niños menores de cinco años de regiones del mundo con ingresos intermedios y bajos; se estima que produce mil millones de casos de diarrea al año (Saha et al., 2013; Kotloff et al., 2013; Platts-Mills et al., 2015). Debido a que ETEC causa alta mortalidad en niños de zonas endémicas (Kotloff et al., 2013; Hosangadi et al., 2018) y a que se ha asociado con retraso en su crecimiento (stunting), (Bolick et al., 2018) la Organización Mundial de la Salud, por medio del Product Development for Vaccines Advisory Committee, considera una prioridad el desarrollo de vacunas contra este patógeno, ya que una de sus metas para 2025 es reducir la tasa de muertes por neumonía y diarrea en niños menores de cinco años a menos de uno por cada 1000 nacimientos vivos (Hosangadi et al., 2018).

Streptococcus pneumoniae es una bacteria cocácea Gram positiva, capsulada, tienen una forma lanceolada, miden 0,5 a 1,2 m de diámetro y se disponen en pares

o diplos. Son anaerobias facultativas. Para su crecimiento y multiplicación tiene requerimientos específicos, como aportes de proteínas y suplementos hematológicos, por lo que es considerada una bacteria fastidiosa (Preado, 2001). *S. pneumoniae* (neumococo) es un patógeno responsable de una significativa morbilidad y mortalidad en niños y ancianos en todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de 700 mil niños menores de 5 años mueren cada año a nivel mundial a causa del neumococo, y que la mayor parte de ellos viven en países en vías de desarrollo (WHO, 2007). Presenta una resistencia creciente a la penicilina y a otros antimicrobianos a nivel mundial (Appelbaum, 1992), obliga a mantener una vigilancia permanente para orientar el tratamiento. La resistencia de *S. pneumoniae* a los antibióticos es un problema creciente. El desarrollo de cepas resistentes a penicilina se da gradualmente. La resistencia se puede deber a mutaciones genéticas repetidas de la bacteria y por presión selectiva por el uso indiscriminado de antibióticos (Melander et al., 1998; Melander et al., 2000).

En el estudio internacional de vigilancia SENTRY (1999-2003), la resistencia de *S. pneumoniae* a la penicilina osciló entre el 14,7% para Europa y el 15,9% para Norteamérica; el 5,8% de las cepas fueron multirresistentes (resistencia a penicilina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cotrimoxazol) (Johnson et al., 2006).

Los dos principales factores que contribuyen en forma reconocida a la aparición de resistencia a la penicilina son: 1) presión selectiva por la administración excesiva de antibióticos; 2) exposición a numerosos individuos que pueden estar colonizados (Bakir et al., 2003).

1.3 RESISTENCIA MICROBIANA

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Cordiés et al., 1998). La resistencia bacteriana tiene una base genética intrínseca y una adquirida (Tello et al., 2011).

Natural o intrínseca, propiedad específica de bacterias con aparición anterior al uso de antibióticos, como lo demuestra el aislamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos, de una edad estimada de 2000 años encontradas en las profundidades de los glaciares de las regiones árticas de Canadá (Hart, 1998). Además, los microorganismos que producen antibióticos son por definición resistentes. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Couvalin, 1988).

Adquirida, constituye un problema en clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles (Couvalin, 1988). La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la trasmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias.

1.3.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA

(i) Disminución del influjo o aumento del eflujo de antibióticos:

La entrada de antibióticos a la célula se produce a través de porinas presentes en la membrana externa (Blair et al., 2015). Una menor expresión celular de porinas o mutaciones en genes de porinas provoca una menor entrada del antibiótico en la célula, haciéndolo menos eficaz. Las bacterias poseen bombas de eflujo de múltiples fármacos que son responsables de la exportación activa de antibióticos de

la célula. Se han identificado varias de estas bombas en bacterias, y mutaciones en sus secuencias genéticas o su sobreexpresión provocan un aumento del eflujo de antibióticos de la célula de antibióticos de la célula (Figura 1).

(ii) Modificación de los antibióticos:

Una vez que el antibiótico entra en la célula, las bacterias resistentes lo degradan enzimáticamente o modifican de forma que no pueda unirse a su propia diana. Las enzimas que degradan los antibióticos están presentes en varias bacterias. En las bacterias se codifican variantes de β-lactamasas, cada una de las cuales puede degradar varios antibióticos β-lactámicos. Han aparecido bacterias resistentes a todos los antibióticos β-lactámicos y se han identificado nuevas clases de β-lactamasas en bacterias patógenas como *K. pneumoniae, E. coli, P. aeruginosa*, etc. Se conocen varias enzimas que pueden transferir grupos químicos como fosfato, acilo, nucleotidilo, etc. a las moléculas de antibiótico. Estos antibióticos modificados tienen entonces menor afinidad por sus dianas, reduciendo su eficacia (Figura 2).

(iii) Modificación de la diana antibiótica:

Otro mecanismo de disminución de eficacia de antibióticos es mutar, modificar o proteger sus dianas celulares, interfiriendo en la unión de antibióticos (Blair et al., 2015). Favoreciendo mutaciones que conducen a la reducción de la unión del antibiótico sin afectar la actividad de la proteína. Cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina, por ejemplo, contienen mutaciones en el gen rpoB que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (diana de rifampicina). Así mismo, la metilación del ribosoma confiere resistencia a antibióticos dirigidos al ribosoma; la metilación del ARN ribosómico 23S (ARNr) por metiltransferasa Erm confiere resistencia a antibióticos macrólidos (Blair et al., 2015). Las bacterias también pueden adquirir un gen que codifica un homólogo de un fármaco diana que no se une al fármaco. El *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) posee una proteína de unión a la penicilina, PBP2a, además de la PBP codificada cromosómicamente (Katayama et al., 2000). Otra posibilidad es que las bacterias sinteticen una molécula que imite la diana antibiótica y que se una al antibiótico y reduzca su concentración efectiva (Figura 3).

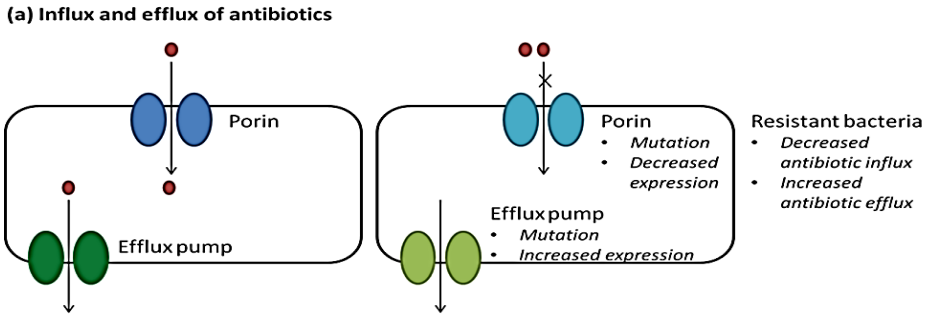


Figura 1 Disminución del influjo o aumento del eflujo de antibiótico

Fuente: Petchiappan, A., & Chatterji, D. (2017). *Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega*

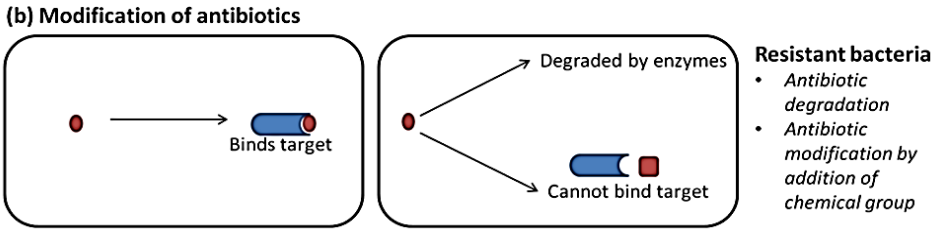


Figura 2 Modificación de los antibióticos

Fuente: Petchiappan, A., & Chatterji, D. (2017). *Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega*

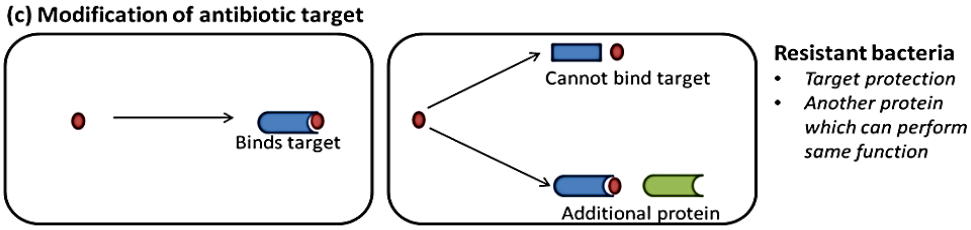


Figura 3 Modificación de la diana antibiótica

Fuente: Petchiappan, A., & Chatterji, D. (2017). *Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega*

1.3.2 TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES

Descrita por primera vez en 1928 por Frederick Griffith, quien demostró la absorción de ADN extraño a través de la transformación en bacterias (Griffith, 1928).

La transferencia horizontal de genes, también conocida como transferencia lateral de genes, es el proceso por el que un organismo incorpora material genético de otro organismo sin aparearse. Tradicionalmente se ha creído que la transferencia horizontal de genes se limita a bacterias y eucariotas unicelulares; sin embargo,

trabajos recientes cuestionan este dogma y defienden una importancia potencialmente más amplia de la transferencia lateral de genes en la evolución y el desarrollo de animales, incluidos los humanos (Ivancevic et al., 2013; Schönknecht et al., 2014; Crisp et al., 2015).

Esta transferencia entre diferentes especies y géneros de bacteria en ambientes naturales es muy común proporciona al organismo varios genes funcionales sin sufrir mutaciones, aporta genes que proporcionan resistencia a antibióticos o patogenicidad al organismo, de modo que éste también puede infectar al huésped; pueden ser resistentes a varios antibióticos. Aparte de las bacterias, los eucariotas también participan en la transferencia horizontal de genes y han adquirido algunos genes funcionales importantes (Soucy et al., 2015).

Existen tres mecanismos de transferencia: **transformación, transducción y conjugación.**

El mecanismo de transducción consiste en el intercambio de genes entre dos bacterias mediante un bacteriófago.

La transformación es el proceso mediante el cual las bacterias atrapan ADN libre, algunas son naturalmente transformables (Wolska, 2003). Este mecanismo juega un papel importante en el ambiente no es tan común como la conjugación. Esta última es la más extensa y contribuye al pool de transferencia horizontal en procariotas (Llosa & De la Cruz, 2005), y consiste en la transferencia de material genético por contacto célula-célula de una bacteria donante a una receptora mediante una maquinaria de conjugación que usualmente esta codificada a nivel plasmídico (Panicker et al., 1985).

La conjugación es el mecanismo encargado de transferir genes de resistencia a antibióticos, responsable de la distribución de genes para la degradación de contaminantes orgánicos, es por eso que la presencia de donantes heterólogos eficientes en poblaciones bacterianas puede acelerar los procesos de transferencia de plásmidos y asimismo el proceso de adaptación bacteriana a los cambios

ambientales llevando a tener tratamientos de biorremediación más eficientes (Wolska, 2003).

1.4 ALTERNATIVA CONTRA LA RESISTENCIA BACTERIANA: PLANTAS MEDICINALES CON PROPIEDADES TERAPÉUTICAS

Hoy en día, existe una marcada tendencia hacia la “fitoterapia”, es decir, al consumo de productos naturales en el tratamiento de enfermedades y dolencias, evitando la administración de fármacos de origen sintético (Torrenegra-Alarcón M., et al 2016). La utilización de sustancias naturales autóctonas, como terapia alternativa de variadas dolencias, surge a partir de la amplia disponibilidad y diversidad en la naturaleza de plantas al alcance de poblaciones o comunidades de zonas rurales, la elección de la planta o parte de ella (raíz, tallo, hoja, flor), muchas veces dada por testimonios de personas de comunidades que la utilizan a diario o en determinadas situaciones asegurando que su consumo tendría beneficios preventivos o curativos (Maldonado Guacho, 2017).

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios o fitoquímicos, muchos de los cuales tienen función protectora contra predadores, contando para esto con características biocidas, antimicrobianas y/o de repelencia a herbívoros. Dentro de estos metabolitos secundarios se conocen actualmente más de 3000 aceites esenciales distintos, de estos, aproximadamente 300 son importantes a nivel comercial e industrial (Bassolé & Juliani, 2012).

1.5 ESENCIAS NATURALES

El término “aceite esencial” se usó por primera vez en el siglo XVI por Paracelsus von Hohenheim, quien nombró el componente efectivo de una droga “Quinta esencial” (Edris, 2007). Hacia la mitad del siglo XX, el rol de los aceites esenciales se redujo solo al uso en perfumes, cosméticos y saborizantes de comida, pero en el contexto de las preparaciones farmacéuticas no fue permitido su uso (Edris, 2007).

Los aceites esenciales son conocidos desde épocas antiguas por su propiedad natural antimicrobiana; muchas plantas han mostrado ser efectivas en diversas aplicaciones como control del crecimiento y disminución de la sobrevivencia de microorganismos (Fischer & Phillips, 2008; Rivera et al., 2015). Son sustancias volátiles, fragantes de consistencia aceitosa, típicamente producida por todos los órganos de las plantas, se pueden elaborar ex vitro o ser extraídos de la planta, siendo la hidrodestilación la técnica más utilizada. Generalmente, son mezclas de veinte a sesenta componentes en concentraciones diferentes, en mayor cantidad se encuentran terpenos, terpenoides y otras moléculas con anillo aromático, las cuales tienen un papel primordial en el efecto biológico antimicrobiano de estos aceites (Bakkali et al., 2008; Bassolé & Juliani, 2012; Perricone et al., 2015).

Con respecto a las características fisicoquímicas, los aceites esenciales presentan una fluidez relativa, olor llamativo y agradable, son muy poco solubles en el agua, incoloros típicamente o levemente coloreados, estables en la presencia de luz, calor y aire (Peters, 2016). Dependiendo de la fuente de origen de los aceites esenciales (especie vegetal y órgano de la planta), y de diversos factores como la fase del ciclo vital de la planta en la que se produjo la extracción de los aceites esenciales, zona geográfica donde crecieron esas plantas y método de extracción empleado, la composición química de los aceites esenciales puede variar en gran medida (Seydim & Sarikus, 2006). En los últimos años, el uso de aceites esenciales ha cobrado importancia debido a sus propiedades biológicas y medicinales, y se emplea como remedios para tratar dolencias, en cosméticos, fragancias, y en la tendencia de difusores de aromas para mejorar los espacios y crear sensaciones de bienestar (Curtis et al., 2016).

La demanda mundial del mercado de aceites esenciales fue de 226.8 kilotoneladas en el año 2018, se espera que crezca a una Compound annual growth rate (CAGR) del 8.6% de 2019 a 2025. El uso de aceites esenciales en industrias aumenta día a día, varios tipos de beneficios relacionados con la salud son ofrecidos por los aceites esenciales y su demanda está aumentando en las aplicaciones médicas y farmacéuticas. La creciente inclinación de los consumidores hacia los productos

orgánicos y naturales está provocando un aumento del uso de aceites esenciales en los sectores de las bebidas, la alimentación y la cosmética. El último informe de Global Market Insights, Inc. indica que el mercado mundial de aceites esenciales alcanzará los 13.000 millones de dólares en 2024. El aumento de la población mundial está sufriendo de diferentes tipos de problemas relacionados con la salud y los aceites esenciales se utilizan en productos de aromaterapia y debido a esta razón, el mercado mundial de aceites esenciales está aumentando día a día (Grand Review Research Inc. US).

Algunas de las aplicaciones en cuanto a inhibición microbiana a partir de aceites esenciales, han demostrado eficacia frente a varios patógenos comunes en la industria alimentaria, dentro de los cuales se encuentran: *E. coli, Salmonella typhimurium, S. aureus, Campylobacter, Enterococcus fecalis, Vibrio parahemolyticus, Listeria monocytogenes*, y otros; solo por mencionar algunos (Chen et al., 2016).

1.5.1 *Clinopodium mexicanum*

Especie nativa de México, localizada en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz (Villaseñor, 2016; Cadena, 2017). Posee distintos nombres según su localización, en Querétaro, su nombre común es “poleo verde”; en algunas regiones de Oaxaca se consume como infusión para aliviar los efectos del alcohol (“hierba del borracho”) y problemas digestivos y gastrointestinales; en Guerrero se le conoce como “toronjil de monte” (Alvarado et al., 2020).

Se encuentra en regiones de clima templado subhúmedo y en menor medida en regiones de climas subhúmedos. Se distribuye en regiones con intervalos de precipitación de 400 a 1500 mm y donde la temperatura media anual oscila entre 14 y 20ºC. Se encuentra en una amplia gama de tipos de vegetación: matorral xerófilo, matorral micrófilo, vegetación secundaria de bosques de Quercus, bosque de

Juniperus, bosque de Pinus. Se encuentra principalmente en suelos de tipo Leptosol y Cambisol calcáreo, con alta pedregosidad (Magallán et al., 2015).

En Ciudad de México, *Clinopodium mexicanum* también se conoce como "Toronjil de Monte". Debido a sus supuestas propiedades tranquilizantes, se comercializa ampliamente en el mercado de Sonora, que es el mayor mercado de plantas medicinales del país (Aguilar et al., 1994). Un estudio realizado en el Valle de Tehuacán (Estado de Puebla) considera que *C. mexicanum* tiene un índice de riesgo alto. Este índice de riesgo considera el valor económico y cultural y el plan de manejo de la especie; así, un índice de riesgo alto implica un alto valor cultural y económico y la falta de un plan de manejo (Arellanes et al., 2013).

TAXONOMÍA

C. mexicanum pertenece a la familia *Lamiaceae,* subfamilia Nepetoideae. Los taxónomos la ubicaban en el género Satureja. Ahora dicho género está confinado a Europa y las 100 especies americanas pertenecen al género *Clinopodium.* De las cuales 14 se distribuyen en México y 10 de ellas son endémicas (Martínez-Gordillo et al., 2013).

DESCRIPCIÓN

Es un arbusto aromático cuyo tallo está cubierto de tricomas; tiene hojas ovadas con márgenes aserrados o serrados. Los márgenes son revolutos y llegan a medir hasta 1 cm. Tiene flores solitarias en las axilas de hojas superiores. El cáliz mide hasta 6 mm de longitud y tiene forma de tubo con 13 venas evidentes y con un anillo de pelos en su interior, y el ápice está dividido en cinco pequeños. La corola es de color rojo o naranja, con forma tubular y mide de 2.2 a 3.4 cm de longitud. Es ligeramente arqueada, se extiende hacia el ápice y está dividida en dos labios; el superior es erecto y el inferior está dividido en tres lóbulos. Tiene cuatro estambres, dos de los cuales son más largos. Estilo dividido en el ápice en dos ramas algo desiguales (Standley, 1922; Epling & Játiva, 1966), como se muestra la Figura 4.

Figura 4 Planta Clinopodium mexicanum
Fuente: Alvarado et al., 2020 Clinopodium mexicanum: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 19 (2): 149 – 160.

USOS TERAPÉUTICOS

En algunas regiones de Oaxaca se consume como infusión para aliviar los efectos del alcohol (“hierba del borracho”) y problemas digestivos y gastrointestinales (Alvarado et al., 2020). En la medicina tradicional mexicana, *C. mexicanum* se utiliza contra el dolor de muelas y como remedio de enfermedades del sistema nervioso (Estrada-Reyes et al., 2010) Su extracto acuoso contiene Neoponcirina como compuesto principal, esta es una sustancia con efectos sedantes, anticonvulsivos, ansiolíticos similares al Diazepam, y antinociceptivos mayores que el Ibuprofeno, similares al Ketorolaco (Estrada-Reyes et al., 2010; Cassani et al., 2013).

En medicina tradicional usada como tranquilizante, para la digestión y como analgésico (Aguilar et al., 1994; García, 2000; Quattrocchi, 2012; Domínguez-Vázquez & Castro Ramírez, 2015). La decocción de *C. mexicanum* se utiliza para tratar dolencias gastrointestinales y reproductivas femeninas (Nambo, 2015); también para dolencias estomacales así mismo la decocción de sus partes aéreas se administra como enema para tratar el estreñimiento, las maceraciones se utilizan como anestésico tópico para el reuma (García-Hernández, 2014; García-Hernández

et al., 2015). Según la metodología de Lorke, el extracto acuoso de *C. mexicanum* fue ligeramente tóxico. La dosis letal media (DL50) fue de 2154 mg / kg (Gallegos-Solis, 2008; Estrada-Reyes et al., 2010). Además, dosis superiores a 1600 mg/kg causaron efectos adversos (Estrada-Reyes et al., 2010).

COMPOSICIÓN QUÍMICA

El aceite esencial de Poleo contiene: acetato de mentol (34,3%), mentol (4,2%), mentona (42,5%), pulegona (5,5%) y limoneno (13,5%). Un estudio posterior informó de que los principales compuestos del aceite esencial eran la pulegona, la piperitona y la d-carvona (Hernández, 2003). Además, se caracteriza por la presencia de compuestos triterpénicos como el ácido ursólico y su isómero, el ácido oleanólico, así como por la presencia de ácido rosmarínico (Viturro et al., 2000). Asimismo, poseen flavonoides libres y glicosilados (Opalchenova & Obreshkova, 1999; Fernández et al., 2006).

El extracto acuoso mediante cromatografía líquida de alta resolución detectó 11 metabolitos de tipo flavonoide; así mismo solo se identificaron estructuralmente cinco metabolitos: 8-hidroxi-salvigenina, 5-demetoxibicilina, neoponcirina, naringenina y hesperidina (Gallegos-Solis, 2008). Por otra parte, la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masas identificó los glucósidos de flavanona: neoponcirina, poncirina e isonaringina. Se identificaron las flavonas 8-hidroxi-salvigenina y gardenina B, así como las flavononas naringenina y 4-O metilnaringenina (Estrada-Reyes, 2015). Se sabe que algunos flavonoides, así como sus glucósidos, ejercen efectos ansiolíticos, sedantes, proconvulsivos y anticonvulsivos en el SNC (Marder et al., 2003; Ibrahim et al., 2008; Kavvadias et al., 2004; Fernández et al., 2004, 2006). Los glucósidos flavanona neoponcirina, poncirina e isonaringenina se han identificado como los principales constituyentes de *C. mexicanum* (Estrada-Reyes et al., 2010).

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

No hay evidencia de que posee actividad antimicrobiana.

1.5.2 *Agastache mexicana ssp. mexicana*

El género *Agastache (Lamiaceae)* consta de 112 especies que se distinguen por ser plantas aromáticas, herbáceas y perennes. La mayoría de las plantas de este género crecen silvestres en el sureste de Asia y Norteamérica y 12 de estas especies son endémicas de México (Lint & Epling, 1945; Sanders, 1987; Rzedowski & Calderón, 2001; Martínez-Gordillo et al., 2013). *Agastache mexicana* se cultiva en los estados de Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Veracruz y en la Ciudad de México (González-Trujano et al., 2015).

En México existen dos subespecies de *Agastache mexicana: Agastache mexicana ssp. mexicana* y *Agastache mexicana ssp. xolocotziana*. Ambas subespecies son conocidas como "toronjil" y son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el alivio de padecimientos de "susto" y "nervios" (Estrada-Reyes et al., 2014). Estas dos subespecies se distinguen fenotípicamente por la forma de las hojas, el color de las flores y su sabor. Sin embargo, no existe preferencia de uso entre ellas entre la población (Santillán-Ramírez et al., 2008).

Bajo la denominación común de "toronjil" varias otras plantas medicinales, como *Dracocephalum moldavica* "toronjil azul" (hisopo azul o hisopo extranjero), *Cedronella mexicana* "toronjil" (hisopo), *Clinopodium mexicanum* "toronjil de monte" (hisopo de monte) y "toronjil" *Melissa officinalis* (Aguilar et al., 1994; Estrada-Reyes et al., 2010; Martínez-Vázquez et al., 2012).

En el estado de Puebla, la población indígena otomí reconoce las dos subespecies como "tama", "toroji" o "toronjil". Los tepehuas, cultura nativa de los estados de Veracruz, Hidalgo y Puebla, denominan a las dos subespecies como "pinkil" (Zolla, 1994).

TAXONOMÍA

Consta de 112 especies que se distinguen por ser plantas aromáticas, herbáceas y perennes. La mayoría de las plantas de este género crecen silvestres en el sureste de Asia y Norteamérica y 12 de estas especies son endémicas de México (Lint &

Epling, 1945; Sanders, 1987; Rzedowski & Calderón, 2001; Martínez-Gordillo et al., 2013).

DESCRIPCIÓN

A. mexicana es una planta vascular nativa de México (Villaseñor, 2016). Es una hierba perenne. Las plantas de ambas subespecies tienen una morfología típica de *Lamiaceae*: hojas opuestas, pecioladas, un tallo de cuatro ángulos y numerosos tricomas (Zielińska & Matkowski, 2014).

En las dos subespecies, el tallo es cuadrangular en sección transversal; en *A. mexicana ssp. mexicana*, la parte basal y media del tallo es púrpura. La cutícula es lisa, pero en los ángulos se observa crenulada, con un grosor de 4-8 µm. Se observan los tres tipos de apéndices epidérmicos descritos para la hoja, pero los tricomas uniseriados no glandulares son abundantes en *A. mexicana ssp. xolocotziana*, mientras que están más dispersos y no son visibles a simple vista en *A. mexicana ssp. mexicana* (Santillán et al., 2008). La altura de la planta alcanza entre 50 y 150 cm (Santillán et al., 2008) y el número cromosómico base es 9. Las plantas tienen rizomas delgados y extendidos (Bye, et al., 1987).

El tallo de *A. mexicana ssp. mexicana* es erecto, ramificado y de cuatro ángulos. La parte basal y media del tallo es púrpura. La forma de las hojas es ovado-lanceolada, midiendo de 4.4 a 6.3 cm de largo y de 2.1 a 2.5 cm de ancho (Santillán et al., 2008). El pecíolo mide 1 cm de largo (Santillán et al., 2008), y la corola es de color rojo púrpura a rojo (Santillán et al., 2008; Bye, et al., 1987). Las semillas miden aproximadamente de 4 a 5 mm, lo mencionado anteriormente se puede observar en la Figura 5.

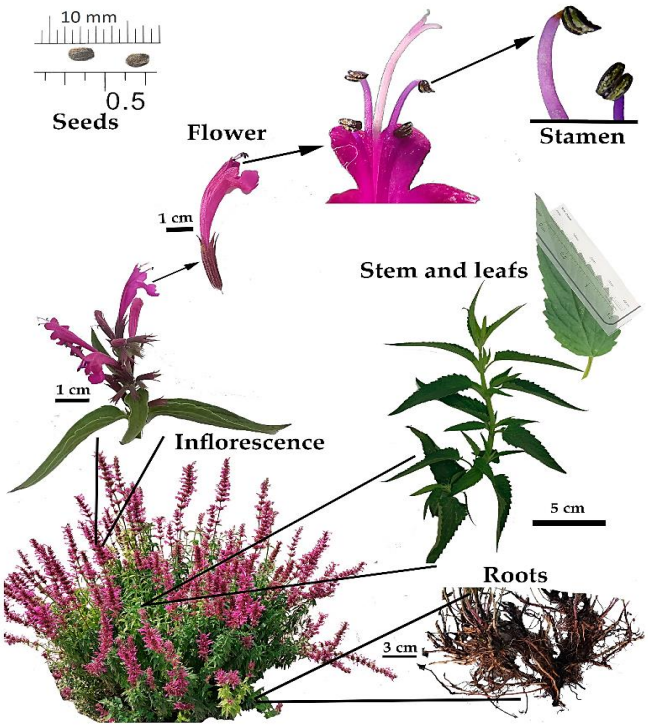


Figura 5 Planta Agastache mexicana ssp. mexicana

Fuente: Palma-Tenango et al., 2021 A Systematic Approach to Agastache mexicana Research: Biology, Agronomy, Phytochemistry, and Bioactivity. Molecules 2021, 26, 3751.

USOS TERAPEÚTICOS

En estudios preclínicos, se analizó el efecto de extractos acuosos de las dos subespecies de *Agastache mexicana (ssp. mexicana y ssp. xolocotziana).* Ambas subespecies redujeron el comportamiento ansioso de manera similar al diazepam, siendo la segunda más potente. Los autores no reportaron efectos tóxicos, lo que sugiere que el consumo de estas especies de *Agastache* no implica un riesgo significativo para la salud (Estrada-Reyes et al., 2014).

Propiedades farmacológicas como comportamientos ansiogénicos (Molina-Hernández et al., 2000) o ansiolíticos (Estrada-Reyes et al.,2014), vasorelajantes (Hernández-Abreu et al., 2009), antioxidantes (Ibarra-Alvarado et al., 2010), antinociceptivos y antiinflamatorios (González-Ramírez et al., 2012) han sido recientemente demostrados en extractos de *A. mexicana*.

Tradicionalmente conocido como "toronjil morado", los usos comunes de esta planta son en el tratamiento del dolor de estómago, tos, bilis, fiebre, vómito, nervios y

ansiedad. Sin embargo, el uso principal de *A. mexicana* es curar "susto" o "espanto", una enfermedad cultural relacionada con la pérdida del alma y caracterizada por la ansiedad (Santillán-Ramírez et al., 2008).

En varios ensayos preclínicos, tiene efecto en actividad espasmolítica (Ventura-Martínez et al., 2017), bronchorelaxante (Navarrete et al., 2017) y antihipertensivo (Flores-Flores et al., 2017). La tilianina, un compuesto bioactivo de *A. mexicana*, tiene actividad vasorelaxante (Carmona-Castro et al., 2019) y ansiolítica (Gonzalez-Trujano et al., 2015), sin efectos tóxicos (Hernández-Abreu, et al., 2013).

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Se ha reportado la presencia de flavonoides como principales metabolitos secundarios que caracterizan a las especies mexicanas del género *Agastache* (Estrada-Reyes et al., 2004). El género *Agastache* produce varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, principalmente fenilpropanoides y terpenoides. *A. mexicana* contiene compuestos terpenoides como monoterpenos (limoneno, pulegona), sesquiterpenos (β-cariofileno), diterpenos (breviflorina), triterpenos (ácido ursólico, corosólico, maslínico); compuestos fenólicos y fenilpropanoides como flavonas (acacetina) y flavonoides (tilianina, hesperitina); ácidos carboxílicos (ácido 9-hexadecenoico, ácido butanoico); y azúcares solubles (glucosa, sacarosa) (Zielińska & Matkowski, 2014).

Los terpenos y flavonoides, como el ácido ursólico, ácido oleanólico, acacetina, apigenina y tilianina, son los más activos (Carmona-Castro et al., 2019). En comparación con otras especies de *Agastache* y miembros de la familia *Lamiaceae,* las inflorescencias de toronjil tienen mayor contenido de polifenoles y flavonoides y mayores propiedades antioxidantes (Najar et al., 2019).

El aceite esencial contiene monoterpenos y fenilpropanoides, como estragol y metil eugenol, que actúan como compuestos antifúngicos. La investigación ha demostrado el potencial de su uso como fungicida botánico no tóxico y como alternativa a los fungicidas sintéticos (Juárez et al., 2015).

El aceite esencial es un candidato a conservante alimentario no tóxico (Juárez et al., 2021). Este aceite esencial ha demostrado actividad antifúngica contra once

cepas aisladas de granos de trigo durante su almacenamiento (Juárez et al., 2015). Los extractos de las hojas de *A. mexicana* contienen compuestos reductores como fenoles y flavonoides y se han utilizado con éxito para proporcionar un medio reductor para la síntesis de nanopartículas, así como su estabilidad (López et al., 2017).

Sin embargo, tampoco ha sido probada su actividad antibacterial.

1.6 ANTECEDENTES DE LAS PLANTAS DE ESTUDIO

Tzicatlacoyan, Puebla; ocupa el 0.81% de la superficie del estado, colinda al norte con los municipios de Puebla, Cuautinchán y Tecali de Herrera; al este con Tecali de Herrera, Atoyatempan y Molcaxac; al sur con Molcaxac, Zacapala, Huatlatlauca, San Juan Atzompa y Huehuetlán el Grande; al oeste con Huehuetlán el Grande y Puebla. Tiene un rango de temperatura de 16-22°C, con clima templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (48.42%), templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad (30.86%) y semicálido subhúmedo con lluvias en verano (20.72%).

En cuando a la conformación de la edafología es de Leptosol (66.76%), Calcisol (18.26%), Vertisol (7.72%), Durisol (2.74%), Phaeozem (1.99%) y Regosol (1.54%); por otra parte, el uso del suelo se encuentra constituido por Agricultura (20.62%) y zona urbana (0.86%) así mismo la vegetación se sitúa con los siguientes porcentajes, bosque (36.42%), pastizal (17.30%), selva (16.73%) y matorral (7.94%) (INEGI, 2010). La Figura 6 muestra la edafología propia del Estado de Puebla.

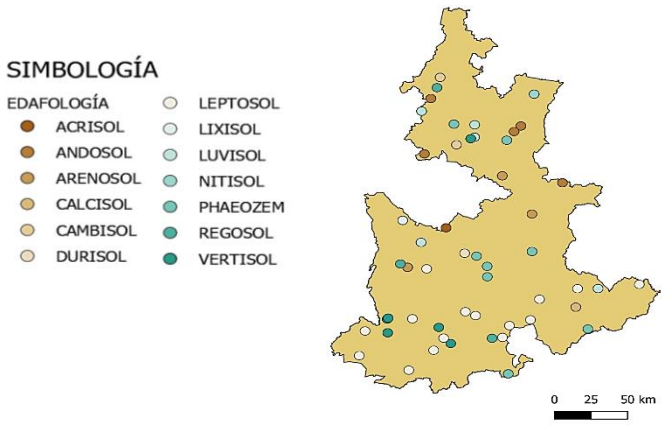


Figura 6 Mapa Edafología del Estado de Puebla
Fuente: INEGI

Las plantas *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* fueron recolectadas en la población de Tzicatlacoyan, Puebla (18° 52’ 12.8’’ Latitud Norte 2095 m) (Figura 8). Posteriormente para la obtención del aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* las partes aéreas fueron secadas a la sombra y adquiridas en “Curamex”, tienda naturista local de Cholula, Puebla, México en agosto de 2022.

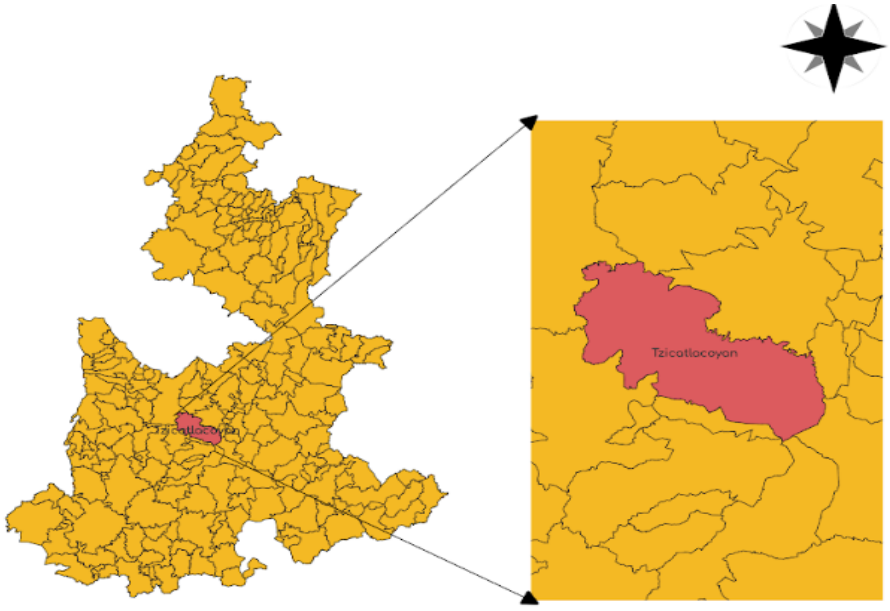


Figura 8 Municipio de Tzicatlacoyan en Puebla, México
Fuente: INEGI

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

2.1 DIAGRAMA DE TRABAJO

El estudio de investigación se centra en la parte experimental para determinar la susceptibilidad de patógenos bacterianos ante la presencia de los aceites esenciales *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* como se visualiza en el siguiente diagrama de trabajo (Figura 9).

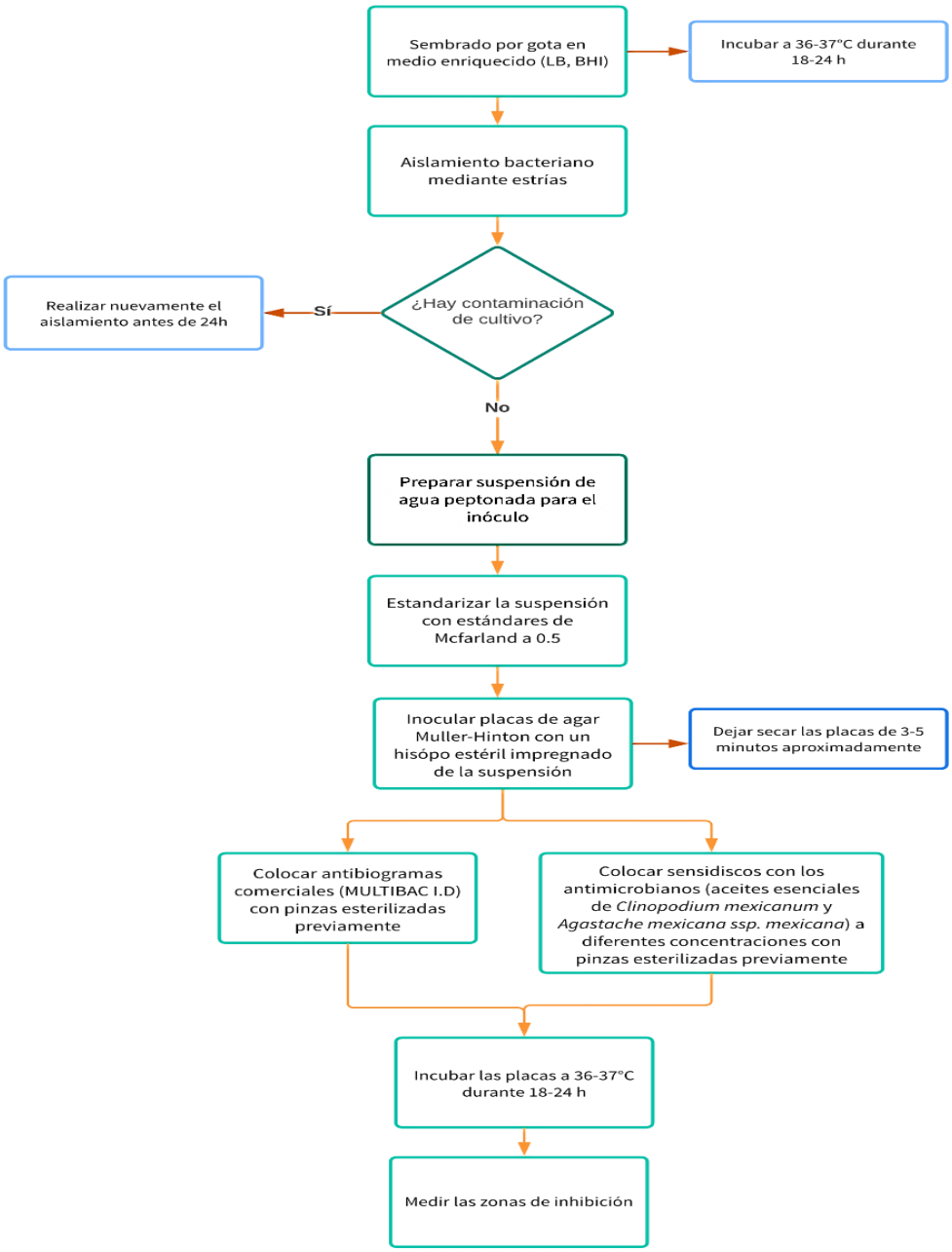


Figura 9 Diagrama de trabajo para la experimentación

2.2 ACEITES ESENCIALES DE *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana*

Los aceites esenciales empleados, fueron extraídos por destilación simple, el método más utilizado. Se genera vapor normalmente en un hervidor y luego se inyecta al destilador por donde pasa a través del material botánico. El principio básico de la destilación de dos líquidos heterogéneos, como el agua y un aceite esencial, es que cada uno ejerce su propia presión de vapor como si el otro componente estuviera ausente. Cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión del recinto, la mezcla hierve. Aceites esenciales con puntos de ebullición de hasta 300ºC, evaporaran a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. Se utilizan aceites esenciales de las plantas ante mencionadas con distintas concentraciones, debido a que el estudio se estará evaluando concentraciones a las cuales pueden reaccionar las diferentes bacterias, se realizan diluciones con los aceites esenciales a probar, que son *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana*. Las concentraciones que se preparan son a 100%, 80%, 60%, 40% y 20%; las diluciones se realizan con agua destilada estéril; con los siguientes porcentajes, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 Proporciones de aceites esenciales y agua destilada estéril

Porcentajes	Aceite esencial	Agua destilada estéril
100%	25 µ	0 µ
80%	20 µ	5 µ
60%	15 µ	10 µ
40%	10 µ	15 µ
20%	5 µ	20 µ

2.3 BACTERIAS DE ESTUDIO

Las bacterias utilizadas fueron proporcionadas por el cepario bacteriano del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Se seleccionaron bacterias patógenas gram positivas y gram negativas de interés médico (Tabla 2).

Tabla 2 Bacterias patógenas utilizadas

B A C T E R I A S

GRAM (-)	GRAM (+)
E. coli DH5 α	*Staphylococcus aureus*
E. coli enterotoxigénica (E9034A) ETEC	*Streptococcus pneumoniae*
E. coli enteropatógena (E2348/69) EPEC	
Pseudomonas aeruginosa (PA01)	
Shigella flexneri (S17)	
Klebsiella pneumoniae K7	

2.4 ACTIVACIÓN DE LOS INÓCULOS BACTERIANOS

Las bacterias patógenas al estar perservadas a temperaturas bajo 0ºC se reactivaron de manera gradual a temperatura ambiente y posteriormente se realizó un sembrado por gota en un medio enriquecido (LB, BHI para que la bacteria pueda crecer tras incubar a 36-37°C de 18 a 24 h (Figura 10).

Figura 10 Sembrado por gota de bacterias patógenas

2.2.1 SELECCIÓN Y AISLAMIENTO DE CEPAS BACTERIANAS

Todas las bacterias patógenas se sembraron de forma individual por estría cruzada en medios solidos de LB y BHI, para ello se utilizó un asa bacteriológica con el inóculo bacteriano y se deposita sobre una tercera parte de la superficie de la placa de Petri previamente se esteriliza el asa y se efectúan una serie de estrías en dirección perpendicular. Una vez inoculadas las placas se incuban durante 24 – 48 h, a 36.5 ± 0-5 ºC (Figura 11). Utilizando esta metodología de siembra se obtiene el aislamiento de colonias, separadas unas de otras, permitiendo a partir de las mismas la obtención de cultivos puros mediante resiembra en otro medio de cultivo (Reynoso et al., 2015).

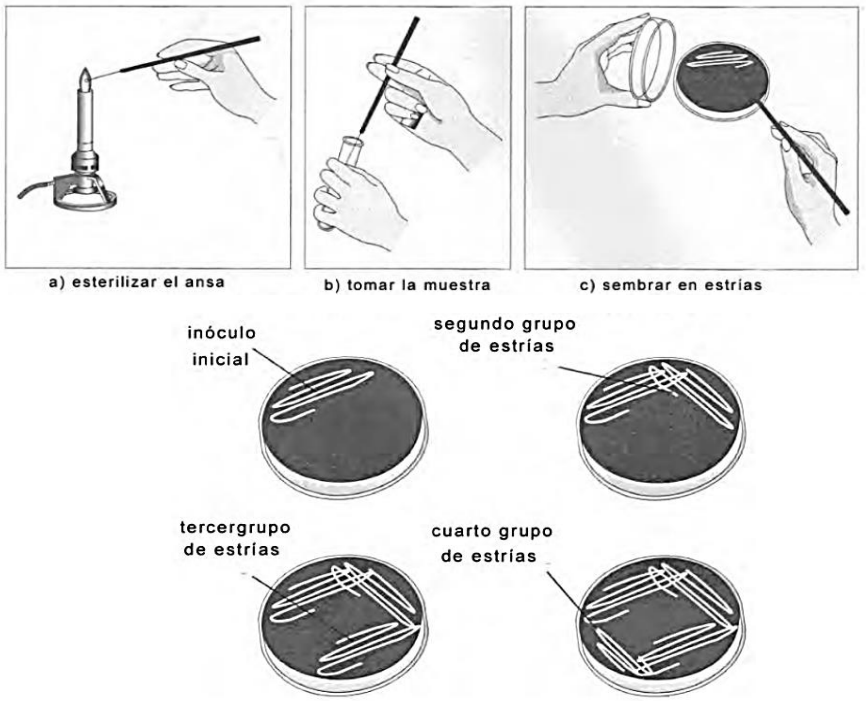


Figura 11 Técnica de estria cruzada
Fuente: Ingraham J & Ingraham C. Introducción a la Microbiología. Ed Reverté SA, España, 1998)

Las colonias aisladas de cada una de las bacterias de estudio *E. coli E2348/69-EPEC*, *Pseudomonas aeruginosa ref PA01*, *Klebsiella pneumoniae K7*, *Shigella flexneri S17, Staphylococcus aureus, E. coli E9034A, Streptococcus pneumoniae* y *E. coli DH5 α.* se observan en la Figura 12.

.

Figura 12 Bacterias de interés aisladas por estría cruzada
Fuente propia

2.2.2 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobianas de las bacterias de estudio ante los aceites se siguió el método KIRBY BAUER, este método de difusión en disco fue estandarizado y actualmente es recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (Comité l'Antibiogramme de la Société Française, de Microbiologie, 1996; S. National Committee for Clinical Laboratory, 1997).

Una vez que se han aislado colonias bacterianas, es necesario proceder de la siguiente manera para realizar la prueba de susceptibilidad (Cavalieri & American Society for Microbiology, 2009).

1. Preparar una suspensión del inóculo
2. Estandarizar la suspensión del inóculo
3. Inocular la placa
4. Colocar discos de antimicrobiano
5. Incubar la placa
6. Medir las zonas de inhibición

Estándares de turbidez McFarland se utilizan como estándar de referencia para aproximar el número de células microbianas en una suspensión líquida (McFarland, 1907). Mediante el uso de estos inóculos estandarizados, el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS). Las suspensiones bacterianas se comparan visualmente con los estándares McFarland para estimar la densidad bacteriana. Para *E. coli,* un estándar McFarland de 0,5 corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Remel, 2009). Los patrones de McFarland se preparan añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario que produce la formación de un precipitado de sulfato de bario suspendido.

Para estandarizar la suspensión del inóculo se utilizó la suspensión directa de colonias, donde las colonias no deben sobrepasar las 18–24 horas de aislamiento. Se estandarizó el inóculo al tiempo que preparó la suspensión en solución salina o caldo; luego, se ajustó el inóculo al estándar 0,5 de McFarland. Se puede comparar la turbidez de las suspensiones poniendo los tubos frente a un papel (Cavalieri & American Society for Microbiology, 2009).

El agar Mueller-Hinton considerado el mejor medio para las pruebas de susceptibilidad rutinarias de bacterias no fastidiosas por las siguientes razones:

- Muestra una reproducibilidad aceptable
- Bajo en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas.
- Permite el crecimiento satisfactorio de la mayoría de patógenos no fastidiosos (Winn et al., 2006).

El pH del agar MH debe situarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente tras la solidificación y debe comprobarse al prepararse el medio por primera vez. Si el pH es <7,2, algunos fármacos parecerán perder potencia (aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos), mientras que otros agentes pueden parecer tener una actividad excesiva (tetraciclina). Si el pH es >7,4, puede ocurrir lo contrario, resultados opuestos (Hudzicki, 2009). 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez, se sumergen hisopos estériles en la suspensión bacteriana normalizada y se presiona contra la pared del para eliminar el exceso; se inocula el agar extendiendo el hisopo contra la placa, girando la placa 60° y repetir la operación para conseguir una distribución uniforme del inóculo, se deja secar la superficie durante 3-5

minutos, pero no más de 15, para que se absorba el exceso de humedad. exceso de humedad (LaPierre et al., 2020).

Para aplicar los sensidiscos, se colocan discos con los agentes antimicrobianos dentro de los 15 minutos siguientes a la inoculación de la placa Mueller-Hinton, pueden ser colocados uno a uno o con un dispensador de discos multi-canal o con pinzas estériles. Se presiona cada disco firmemente para asegurar el contacto completo con la superficie de agar (Cavalieri & American Society for Microbiology, 2009). A continuación, se incubaban a 36.5 ± 0-5 ºC por 24 horas (Mbata et al., 2006) luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado y con el control. La lectura de los resultados representa la actividad In vitro de la sustancia.

Siguiendo esta línea, se procedió a tomar una colonia como resultado del aislamiento, posteriormente se colocó en un tubo con 3 ml de agua peptonada; alcanzando la turbidez del tubo de Mcfarland 0.5, equivalentes a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml; el cual contiene una suspensión de un precipitado donde asemeja a suspensiones bacterianas en cuanto a la opacidad (Figura 13).

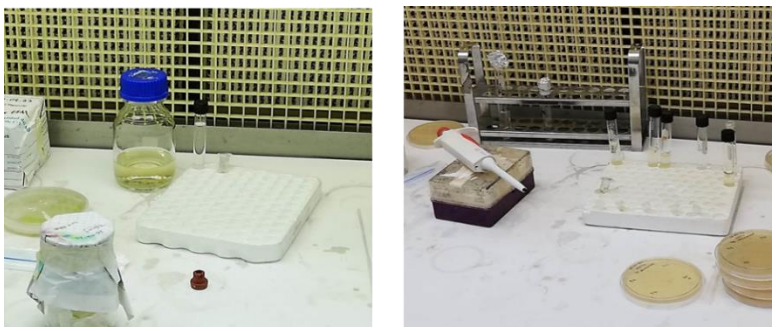


Figura 13 Agua peptonada con inóculo estandarizado
Fuente propia

Una vez que se ajustó el inóculo con el tubo 0.5 de Mcfarland, se inocularon placas circulares de 90X100 mm de diámetro con 20 ml de agar Mueller-Hinton con ayuda de un hisopo impregnado de la suspensión preparada anteriormente, se realizó un estriado masivo en la superficie (Figura 14).

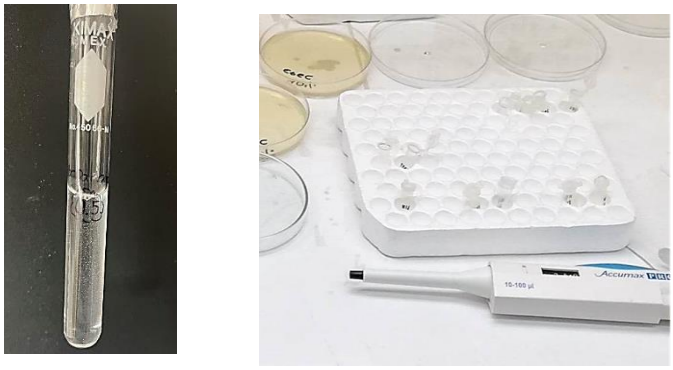


Figura 14 Tubo Mcfarlad o.5 y material para impregnar los sensidiscos
Fuente propia

Se colocaron cuidadosamente los sensidiscos impregnados con una concentración dada del aceite sobre la superficie del agar, todos los ensayos se realizaron por triplicado y colocando el control con solo agua destilada (Figura 15).

Figura 15 Placa con sensidiscos impregnados y control
Fuente propia

Posteriormente se incubaron los medios a 36.5 ± 0-5 ºC por 18 a 24 horas, pasado el tiempo se midió el diámetro de los halos de inhibición en milímetros como unidad de medición (Figura 16).

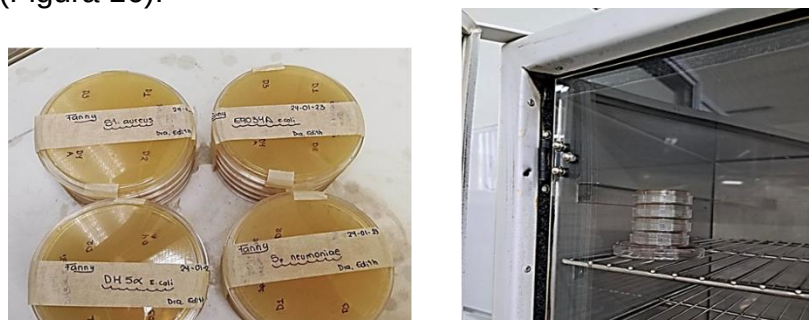


Figura 16 Incubación de placas
Fuente propia

2.2.3 PRUEBAS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS COMERCIALES

El antibiograma evalúa la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. Las primeras pruebas de sensibilidad se realizaron en la década de 1920 (Poupard, 1994). La lectura interpretada del antibiograma surge como una oportunidad de mejorar el uso de antibióticos. Es relevante para la elección de tratamientos y se convierte en una herramienta imprescindible en las medidas de control de infecciones y en el establecimiento de las políticas de antimicrobianos de cada centro de salud (Cantón, 2010; Nodarse, 2013; Tascini et al., 2016).

La resistencia (R) ocurre cuando un microorganismo es incapaz de verse afectado por elevadas dosis de algún antibiótico al que previamente era sensible. Las bacterias, los virus y algunos parásitos pueden desarrollar resistencia como un mecanismo de defensa o de competencia y ser inmunes a los efectos de los antibióticos, los antivirales o a los antipalúdicos respectivamente (Senok et al., 2012). Las cepas que presentan susceptibilidad intermedia (I), tienen una respuesta variable a un antimicrobiano y son clínicamente susceptibles y/o resistentes, pero pueden ser eliminadas si el antibiótico se concentra en el sitio de la infección o se aumenta la dosificación (EUCAST). Una cepa susceptible (S) o sensible se refiere a las bacterias que se ven afectadas por los antimicrobianos como consecuencia de la pérdida o inactivación de sus mecanismos de defensa. De acuerdo a este término se puede inferir que un tratamiento con la dosis habitual del antimicrobiano puede detener la infección causada por la bacteria (EUCAST).

En esta misma línea, se realizaron antibiogramas con antibióticos prescriptos para bacterias Gram positivas y Gram negativas de las bacterias de estudio, los antibióticos para Gram positivas fueron Ampicilina (AM), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CFX), Ciprofloxacino (CPF), Clindamicina (CLM), Dicloxacilina (DC), Eritromicina (E), Gentamicina (GE), Penicilina (PE), Tetraciclina (TE), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT) y Vancomicina (VA); por otra parte para Gram negativas fueron Amikacina (AK), Ampicilina (AM), Carbenicilina (CB), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CFX), Ciprofloxacino (CPF), Cloranfenicol (CL), Gentamicina

(GE), Netilmicina (NET), Nitrofurantoína (NF), Norfloxacino (NOF) y Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT) (Figura 15).

La dosis especificada por cada medicamento se encuentra en la tabla 3 para Gram positivos y para Gram negativos en la tabla 4.

Figura 17 Antibiogramas Gram (+) color azul y Gram (-) color rojo
Fuente propia

Tabla 3 Antibióticos para bacterias Gram (+)

GRAM (+)	
Antibiótico	**Dosis**
AM	10 µg
CF	30 µg
CFX	30 µg
CPF	5 µg
CLM	30 µg
DC	1 µg
E	15 µg
GE	10 µg
PE	10 U
TE	30 µg
SXT	25 µg
VA	30 µg

Tabla 4 Antibióticos para bacterias Gram (-)

GRAM (-)	
Antibiótico	**Dosis**
AK	30 µg
AM	10 µg
CB	100 µg
CF	30 µg
CFX	30 µg
CPF	5 µg
CL	30 µg
GE	10 µg
NET	30 µg
NF	300 µg
NOF	10 µg
SXT	25 µg

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DEL ACEITE DE *Clinopodium mexicanum*

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Tras realizar la prueba de Kirby Bauer con las bacterias de estudio ante la presencia del aceite de *Clinopodium mexicanum* los resultados revelaron diferentes halos de inhibición para cada una de las bacterias Gram negativas (Tabla 5). Para ***Escherichia coli (DH5 α)*** se halló inhibición en las cinco diferentes concentraciones del aceite (al 100%, 80%, 60% y 40%). Para los halos de inhibición que produjo *Clinopodium mexicanum* al crecimiento bacteriano de *E. coli* se consideró son proporcionales a las concentraciones, es decir al 20% no se obtuvo un halo de inhibición, al 40% se registró un halo de 6.6mm, al 60% fue de 8mm, al 80% de 7.6mm y por último la concentración de 100% fue resulto ser de 13.3mm.

Para ***Escherichia coli enterotoxigénica (E9034A),*** *Clinopodium mexicanum* inhibió su crecimiento conforme iba aumentando su concentración se registró un halo de 6mm a concentración de 20%, para 40% se obtuvo una medición ligeramente mayor con valor de 6.6mm, seguida de 9.3mm para 60%, 11.6 mm a 80% y el último halo fue de 16.3mm correspondiendo al 100%.

Para ***Escherichia coli enteropatógena (EPEC) E2348/69,*** *Clinopodium mexicanum*, registró las siguientes mediciones para la concentración mínima del aceite 20% contó con un halo de 7mm en comparación con la concentración siguiente de 40% incremento ligeramente a 7.6mm, para 60% de 10mm, posteriormente aumentó considerable a 22mm al 80% y el mayor halo fue de 37.3mm a la mayor concentración que es 100%.

Pseudomonas aeruginosa PA01 *ante la presencia del aceite Clinopodium mexicanum,* para este caso, se registraron halos a diferentes concentraciones siendo que para concentraciones de 20% y 40% no se obtuvo inhibición, mientras

que para el 60% 15.6 mm siendo que para el 80% disminuyo ligeramente el halo a 15.3mm y el halo mayor alcanzado fue por la concentración de 100% de 17.6mm

Para ***Shigella flexneri S17*** los resultados obtenidos por *Clinopodium mexicanum,* manifestaron los siguientes resultados, para 20% fue de 7.3mm, de 8.3 para el 40%, posteriormente el diámetro de los halos fue aumentando gradualmente acorde al incremento de la concentración del aceite en cuestión, siendo que para el 60% se registró una medida de 13mm, para el 80% 16.6mm y de 17mm para el 100%.

En el caso de ***Klebsiella pneumoniae K7,*** *Clinopodium mexicanum* registró resultados referentes a la actividad contra el aceite esencial, para el porcentaje más bajo que es el 20% no hubo inhibición, se obtuvo 7mm para el 40%, incrementó considerablemente el halo a 18.3 mm para el 60% y al 80% resultó el mayor halo de 24.6mm y finalmente a 100% registro un valor de 13mm.

BACTERIAS GRAM POSITIVAS

El aceite esencial de *Clinopodium mexicanum* también produjo inhibición en bacterias Gram positivas (Tabla 6) Para ***Staphylococcus aureus*** se registró diferentes halos de inhibición, sin embargo, a 20% y 40% no se obtuvo halo de inhibición, pero para el 60% aumentó considerablemente el halo con medida de 15.6mm, para el 80% con 19.6mm y la concentración mayor corresponde a 100% tuvo el mayor halo de 37mm.

Para finalizar, se probó la bacteria ***Steptococcus pneumoniae,*** *Clinopodium mexicanum* compartió medidas nulas para las concentraciones de 20% y 40%*;* por otra parte, se consiguió un halo de 7mm al 60%, siguió aumentando el halo acuerdo a las concentraciones, por consiguiente, se obtuvo 9mm al 80% y a 100% registró un valor de10.3mm.

Tabla 3 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (-) frente al aceite de Clinopodium mexicanum

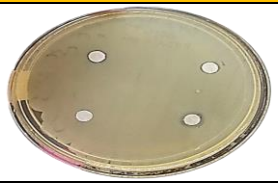
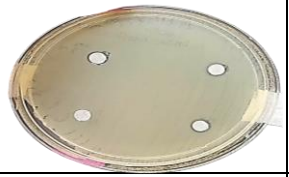
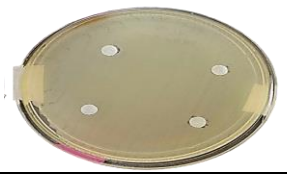
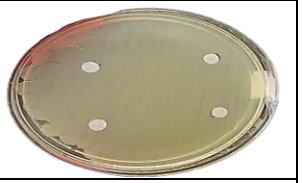
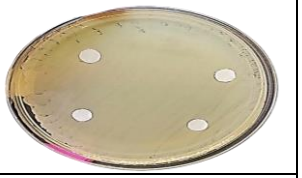
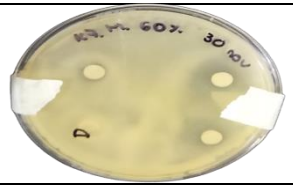
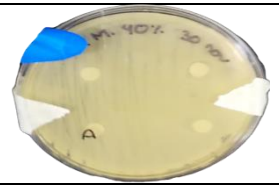
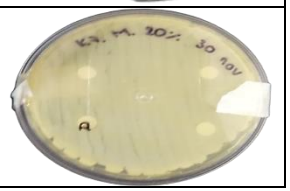
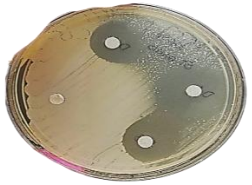
PATÓGENO	100%	80%	60%	40%	20%
Escherichia coli (DH5 α)					
Escherichia coli enterotoxigénica (E9034A)					
Escherichia coli enteropatógena (EPEC) E2348/69					
Pseudomonas aeruginosa PA01					
Shigella flexneri S17					
Klebsiella pneumoniae K7					

Tabla 4 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (+) frente al aceite de Clinopodium mexicanum

PATÓGENO	**100%**	**80%**	**60%**	**40%**	**20%**
Staphylococcus aureus					
Steptococcus pneumoniae					

3.1.1 ACCIÓN DE METABOLITOS DE *Clinopodium mexicanum* y COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM NEGATIVAS Y GRAM POSITIVAS

La evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales como indicadores o marcadores de presencia de resistencia de las plantas *Clinopodium mexicanum* resulta ser una nueva alternativa natural frente a bacterias patógenas y resistentes. La Tabla 5 y 6 muestran los resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad efectuado por el aceite esencial de la planta denominada *Clinopodium mexicanum* contra la serie de bacterias patógenas a las cuales fueron antagonistas, siendo *E. coli E2348/69-EPEC, Pseudomonas aeruginosa PA01, Klebsiella pneumoniae K7, Shigella flexneri S17, Staphylococcus aureus, E. coli* E9034A, *Streptococcus pneumoniae y E. coli* DH5α; dicho ensayo se realizó por triplicado, obteniendo los siguientes resultados promedio de las tres medidas en cuestión.

De acuerdo a la Tabla 7 que contiene las medidas promedio de los halos de inhibición en mm, el aceite esencial de *Clinopodium mexicanum*, demostró ser eficiente contra bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), lo que demuestra que cuenta con un amplio espectro para contrarrestar ambas bacterias. Teniendo medidas promedio de diámetros de halos de inhibición de hasta 37.3mm la cual resultó ser la mayor medida que es el caso de *E2348/69-EPEC* esto a una concentración de 100% del aceite esencial de igual manera logró tener un efecto en todas las concentraciones de dicho aceite así como también 37mm en *Staphylococcus aureus*, donde obtuvo respuesta nula a concentraciones de 40% y 20%; la tercera medida más representativa pertenece a la bacteria *Klebsiella pneumoniae K7* donde obtuvo su mayor medida del halo de inhibición a una concentración de 80% esto puede resultar a que el aceite requirió un medio acuoso en el cual pudiera desenvolver con una mayor efectividad su actividad.

Seguido de 17.6mm para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa PA01* en donde de igual manera esto se consiguió a una concentración de 100% sin embargo a concentraciones de 40% y 20% ya no se consiguió tener efecto, para *Shigella*

flexneri S17 tuvo una medida del diámetro promedio de 17mm a 100% al igual que logro mantener su efecto de inhibición en todas las concentraciones y para *E. coli E9034A* alcanzo 16.3mm a la mayor concentración; por último también logro valores en *E.coli DH5 α* que a pesar de ser un control positivo el efecto del aceite esencial no logra identificar a bacterias patógenas de controles positivos sino que reacciona. Se puede notar que arremete con mayor éxito contra bacterias Gram (-), ya que tiene efecto en ellas hasta un 40% a comparación de lo que ocurre con las bacterias Gram (+) así como con el control + al cual también resulto ser antagónico el aceite. Una característica importante de los aceites esenciales y sus componentes es su hidrofobicidad, que les permite particionar los lípidos de la membrana celular bacteriana y la mitocondria, alterando las estructuras celulares y haciéndolas más permeables (Knobloch et al., 1986; Sikkema et al., 1994). Las fugas extensas de las células bacterianas o la salida de moléculas e iones críticos provocan la muerte (Denyer & Hugo, 1991).

Las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas están formadas predominantemente por peptidoglicano unido a otras moléculas como proteínas o ácido teicoico (Nazzaro et al., 2013). Por otro lado, las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que contiene lipopolisacáridos hidrofílicos (LPS), que crean una barrera frente a compuestos hidrofóbicos como los que se encuentran en los AE (Nikaido, 1994; Nikaido, 2003). Por lo tanto, se considera que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a los efectos de los AE que las Gram positivas (Trombetta et al., 2005).

Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que el aceite esencial de *Cliniopodium mexicanum,* tiene un mayor efecto en bacterias patógenas Gram (-) que en las Gram (+); algunos investigadores averiguaron que la actividad antimicrobiana de aceites esenciales no mostró diferencias notables entre los valores de MIC de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Saleem & Saeed, 2020; Ou et al., 2015; Diep et al., 2021; Mandalari et al., 2007; Al-Saman et al., 2019). Aunque se ha hipotetizado que la membrana externa es casi impermeable a los compuestos hidrofóbicos, Plesiat et al. (Plesiat & Nikaido, 1992) argumentaron

que algunos compuestos hidrofóbicos podrían cruzar la membrana externa a través de los canales de porina. El modo de acción del aceite esencial depende de su perfil químico y de la relación entre sus componentes activos (Bora et al., 2020).

El éxito obtenido también tiene una estrecha relación con las diferentes sustancias químicas propias de la planta como lo son los metabolitos secundarios los cuales actúan en defensa, así como pueden tener la acción de inhibir agentes patógenos; a esto se le atribuye que la Piperitona que aumenta las actividades antibacterianas de la nitrofurantoína y el furanidazol para los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Shahverdi et al., 2004a, 2004b), el ácido oleanólico (AO) y su isómero el ácido ursólico (AU), compuestos importantes que forman parte de la cera presente en la cutícula que recubre el fruto o las hojas (Koch & Ensikat, 2008), el AU tiene propiedades son atribuidas a metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas de la familia *Lamiaceae*, esta molécula ha mostrado, actividad antioxidante (Kashyap et al., 2016), anti-microbial (Mallavadhani et al., 2004), gastroprotectora (Rodríguez, et al., 2003), anti-inflamatoria y analgésica (Vasconcelos et al., 2014). Así mismo se ha demostrado que el ácido ursólico y sus derivados tienen actividad antimicrobiana, como la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus,* organismos gramnegativos y *Mcrosporium lenosum* (Zaletova et al., 1986).

Por consiguiente, la Naringenina es un flavonoide natural encontrado en grandes cantidades en frutas y verduras ha evidenciado tener actividad antioxidante, antibacteriana contra diferentes cepas y no muestra citotoxicidad (Porto et al., 2018; Song et al., 2020). Otra propiedad es que actúa como inhibidor de Quórum Sensing (QS) durante la formación de biopelículas por bacterias Gram – y Gram +, también actúa contra bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*, por ende, se piensa que este flavonoide puede ser utilizado como agente antimicrobiano (Céliz et al., 2011; Yue & Yang, 2018). Otro elemento que puede estar jugando un papel importante para la resistencia que esta planta presenta ante algunas bacterias es la carvona (p-menta-6,8-dien-2-ona) es una sustancia saborizante ampliamente utilizada en productos farmacéuticos, goma de mascar,

pasta dental, enjuagues bucales, alimentos y bebidas (Rhodes & Winskill, 1985; Davey et al., 2002; Carter et al., 2003; Pergentino et al., 2007). Adicionalmente, la carvona se conoce como agente fungicida, insecticida y antibacterial (Carter et al., 2003; De Carvalho & Da Fonseca, 2006; Tachibana et al., 2007).

Por otro lado, la hesperidina que a partir de ella se forma la hesperitina y la rutinosa (Cho, 2006; Kumar et al., 2014), y demuestra varias propiedades biológicas: éstas presentan una amplia gama de propiedades farmacológicas, como actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, anticancerígena, antitrombótica y antivírica (Hirata et al., 2005; Hao et al., 2021; Olas, 2021; Paredes et al., 2003; Pyrzynska, 2022).

Así mismo, en numerosos estudios han demostrado que la poncirina también presenta diversas actividades farmacológicas, como efectos protectores contra las enfermedades gástricas (Lee et al., 2009), antiinflamatorias (Kim et al., 2007), anti-Alzheimer (Ali et al., 2019), antibacterianas y antivirales, además de defensa contra el estrés (Bae et al., 1999; Kim et al., 1999). Las sustancias mencionadas anteriormente contribuyeron al efecto de inhibición al ponerse en contacto con las diferentes bacterias patógenas proporcionándole al aceite capacidades de resistirlas, eso dependiendo de la concentración a la cual fueron utilizadas cada una de ellos, así como con el tipo de bacteria en específico, siendo así que a pesar de ello se obtuvieron resultados favorables.

Tabla 5 Mediciones de halos de inhibición en mm frente al aceite de Clinopodium mexicanum

Clinopodium mexicanum	**Microorganismos**							
% Extracto	*E. coli DH5 α*	*E. coli enterotoxigénia E9034A*	*E. coli enteropatóge na E2348/69-EPEC*	*Pseudomo nas aeruginosa PA01*	*Shigella flexneri S17*	*Klebsiella pneumoniae K7*	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcu s pneumoniae*
100%	**13.3 mm**	**16.3 mm**	**37.3 mm**	**17.6 mm**	**17 mm**	13 mm	**37 mm**	**10.3 mm**
80%	7.6 mm	11.6 mm	22 mm	15.3 mm	16.6 mm	**24.6 mm**	19.6 mm	9 mm
60%	8 mm	9.3 mm	10 mm	15.6 mm	13 mm	18.3 mm	15.6 mm	7 mm
40%	6.6 mm	6.6 mm	7.6 mm	0 mm	8.3 mm	7 mm	0 mm	0 mm
20%	0 mm	0 mm	7 mm	0 mm	7.3 mm	0 mm	0 mm	0 mm

3.2 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE LAS BACTERIAS DE ESTUDIO ANTE LA PRESENCIA DE *Agastache mexicana ssp. mexicana*

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Los resultados de pruebas de sensibilidad del aceite *Agastache mexicana ssp. mexicana* para la bacteria ***Escherichia coli (DH5 α)***, halló halos de inhibición de diferentes concentraciones que corresponden a 100%, 80%, 60%, 40% y 20%. La Tabla 8 registró las bacterias Gram negativas donde, muestra que a concentraciones bajas no hubo inhibición alguna, a 60% 9.3mm, al 80% se registró un halo de 10.6 mm y al 100% de 12.6 mm.

A la bacteria ***Escherichia coli enterotoxigénica (E9034A)****, Agastache mexicana ssp. mexicana* inhibió su crecimiento, donde a medida que aumentaba la concentración también lo hacían los halos de inhibición, es decir, al 20% se registró 5.3mm, a 40% fue de 6mm para la concentración de 60% fue de 6.6mm para el 80% aumentó a 8.3 mm y al 100% se consiguió un valor de 9.6mm de diámetro del halo de inhibición.

En el caso de la bacteria ***Escherichia coli enteropatógena (EPEC)***, el aceite de *Agastache mexicana ssp. mexicana* mostró un efecto inhibitorio nulo a la primera concentración de 20%, para el 40% incremento a 6.3mm, posterior a ello a 9.3mm por parte del 60%, así mismo el 80% registró una medida de 10.3mm y terminando con 12.3mm de la mayor concentración a 100% visualmente más notable.

No obstante, para ***Pseudomona aeruginosa PA01***, *Agastache mexicana ssp. mexicana*, no obtuvo inhibición en las concentraciones más bajas que corresponden al 20%, 40% y 60%; sin embargo, a la concentración del 80% logró registrar un halo de 2.6mm y a la concentración de 100% tampoco se obtuvo medida del halo.

Por lo que se refiere a la bacteria ***Shigella flexneri S17,*** el aceite de *Agastache mexicana ssp. mexicana* tuvo efecto en las distintas concentraciones a las cuales fue expuesta, resultando un halo de 6.6mm a 20%, 8.3mm para el 40% se observó

un incremento para el 60% resultando un halo de 12mm, seguido de 13.6mm que corresponde al 80% y así finalmente el mayor halo fue a 15.6mm que es al 100%.

Lo que concierne a ***Klebsiella pneumoniae K7***, *Agastache mexicana ssp. mexicana*, logró inhibición en todas las concentraciones a las cuales fue expuesto, dentro de las cuales los halos fueron incrementando gradualmente de acuerdo a las concentraciones tratadas, resultando para 20% 5.6mm de halo de inhibición, para 40% 7.6mm, seguido de un halo de 8.6mm correspondiente al 60%, para el 80% 9.3mm y la última medición corresponde a la concentración del 100% con 11.6mm

BACTERIAS GRAM POSITIVAS

El aceite Agastache mexicana ssp. mexicana logró inhibiciones para las bacterias Gram positivas como lo muestra la Tabla 9 que para la bacteria ***Staphylococcus aureus,*** el aceite de *Agastache mexicana ssp. mexicana* presentó inhibición a partir de la concentración del 40% dando un halo de 6.3mm, seguido de 8.3mm del 60%, para la concentración del 80% se registró un halo de 9.6mm y por último para el aceite puro que corresponde al 100% se alcanzó un halo de 12.3mm.

Terminando con ***Streptococcus pneumoniae*** en donde *Agastache mexicana ssp. mexicana*, a pesar de que en las primeras dos concentraciones correspondientes al 20% y 40% no se obtuvieron halos de inhibición, sin embargo, para el 60% resultó ser 5.3mm, en la concentración del 80% un valor de 8.6mm y por último a 100% se registró el mayor halo con medida de 10.6mm.

Tabla 6 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (-) frente al aceite de Agastache mexicana ssp mexicana

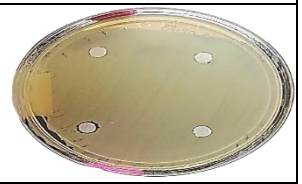
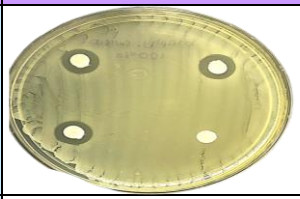
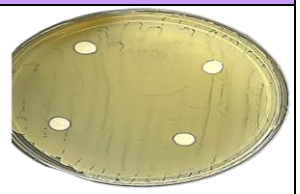
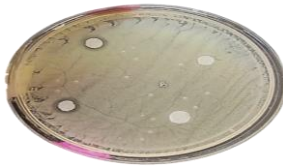
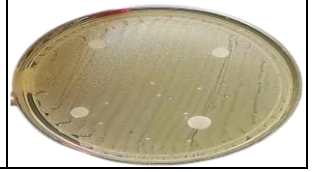
PATÓGENO	100%	80%	60%	40%	20%
Escherichia coli (DH5 α)					
Escherichia coli enterotoxigénica (E9034A)					
Escherichia coli enteropatógena (EPEC) E2348/69					
Pseudomonas aeruginosa PA01					
Shigella flexneri S17					
Klebsiella pneumoniae K7					

Tabla 7 Compendio de halos de inhibición de bacterias patógenas Gram (+) frente al aceite de Agastache mexicana ssp mexicana

PATÓGENO	**100%**	**80%**	**60%**	**40%**	**20%**
Staphylococcus aureus					
Steptococcus pneumoniae					

3.2.1 ACCIÓN DE METABOLITOS DE *Agastache mexicana ssp. mexicana* y COMPARACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS GRAM NEGATIVAS Y GRAM POSITIVAS

La Tabla 10 muestra resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad efectuado por el aceite esencial de la planta denominada *Agastache mexicana ssp mexicana* contra la serie de bacterias patógenas a las cuales fueron antagonistas, siendo *E. coli E2348/69-EPEC, Pseudomonas aeruginosa PA01, Klebsiella pneumoniae K7, Shigella flexneri S17, Staphylococcus aureus, E. coli* E9034A, *Streptococcus pneumoniae* y *E. coli* DH5α; dicho ensayo se realizó por triplicado, obteniendo los siguientes resultados promedio de las tres medidas en cuestión.

En este caso, el mayor halo de inhibición se obtuvo por la bacteria denominada *Shigella flexneri S17* con 15.6mm a una concentración de 100%, sin embargo, demostró tener un efecto en todas las demás concentraciones además de que al igual que con el aceite esencial de *Cliniopodium mexicanum* ambos tienen un impacto en esta bacteria; la bacteria *E. coli DH5 α* obtuvo la segunda medición más alta considerando que es un control positivo el aceite la combatió del mismo modo que si se tratara de alguna bacteria patógena; *Staphylococcus aureus* y *E2348/69-EPEC* consiguieron alcanzar 12.3mm de inhibición a una concentración de 100% siendo bacterias Gram (+) y Gram (-) respectivamente aunado a ello se puede observar que para ambos casos para el 20% ya no se tiene efectividad; en cuanto a *Klebsiella pneumoniae K7* a una concentración de 100% registró una medida de 11.6mm y también obtuvo respuesta positiva en todas las demás concentraciones y *Streptococcus pneumoniae* tuvo 10.6mm a la mayor concentración, sin embargo, a 40% y 20% no tuvo reacción alguna así como para E9034A a pesar de que no tuvo un valor un alto a concentración de 100% que resulta ser de 9.6mm obtuvo mediciones en todas las demás concentraciones y finalmente para *Pseudomonas aeruginosa PA01* solo se registró una medida a una concentración del 80%.

Se ha descubierto que los productos naturales tienen grandes efectos en la alteración de la membrana bacteriana (Langeveld et al, 2013). Es probable que se deba a la presencia de compuestos lipofílicos como hidrocarburos cíclicos, terpenos y aromáticos que se encuentran en abundancia en las plantas aromáticas (Sikkema

et al., 1995). Del mismo modo, Van de Vel et al. (Van de Vel et al., 2019) creen que algunas moléculas de aceites esenciales son más activas contra las bacterias Gram-positivas, mientras que otras son activas contra bacterias Gram-negativas, pero los mecanismos siguen siendo desconocidos. La mayoría de los estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales han utilizado microorganismos modelo para representar bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente (Phan et al., 2019; Zhang et al., 2016; Wang et al., 2020).

Así mismo, en el caso de la planta *Agastache mexicana ssp. mexicana*, se puede deducir una vez observadas las reacciones que tuvieron las bacterias patógenas al estar en contacto directo el aceite esencial, tal como las imágenes anteriores puede mostrarlo, tomando eso en cuenta se puede alegar que metabolitos secundarios tales como los fenilpropanoides juegan un papel muy importante en la habilidad que tienen las plantas para contrarrestar el ataque de patógenos, entre estos se incluye de manera general a las ligninas y compuestos fenólicos como los flavonoides, los cuales toman parte en alguna de las múltiples rutas precedidas por esta vía (Dixon et al., 2002; Vogt, 2010).

Compuestos de la familia de los terpenoides con propiedades antimicrobianas de los cuales derivan de un precursor de cinco átomos de carbono, el difosfato de isopentenilo y con base al número de unidades de isopentenilo se clasifican como mono-, sesqui-, diterpenoides, entre otros, además la presencia y/o ausencia de algunos grupos funcionales específicos que diversifican aún más los compuestos que pertenecen a la misma subclase biosintética (Radulovic et al., 2013). Otro compuesto terpenoide, el β-cariofileno, (BCP), encontrándose en muchos aceites esenciales de especias en algunos alimentos y plantas medicinales (Horváth et al., 2012; Gertsch et al., 2008; Gertsch, 2008). Se ha demostrado que el cariofileno tiene propiedades: antiedémico (Shimizu, 1990), fagorepelente (Keeler & Tu 1991), antiinflamatorio (Shimizu, 1990), antitumoral (Zheng et al., 1992), bactericida (Kang et al., 1992), insecticida (Jacobson et al., 1990) y espasmolítico (Duke, 1992).

Al igual que la planta *Clinipodium mexicanum*, que cuenta con la presencia de triterpenos como el ácido ursólico, también cuenta con el ácido corosólico (AC), un

triterpenoide pentacíclico, que es un componente activo del espino blanco (Crataegus pinnatifida Bunge. var. major), ha venido mostrando diversas actividades farmacológicas como efectos antidiabéticos, antibacterianos, anticancerígenos, antiinflamatorios y antioxidantes.

Otro de los flavonoides, es la acacetina que revela diversas actividades biológicas, como antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante, antiobesidad, antipalúdica y vasorrelajante (Zhou et al., 2014). La acacetina es ampliamente conocida por su actividad antimicrobiana contra distintos tipos de microbios. En un informe anterior, la acacetina mostró efectos sinérgicos con la oxacilina o la ampicilina. Mostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina aislado clínicamente (Cha et al., 2014).

No solo exhibe un efecto pronunciado sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, sino que también mostró una inhibición moderada *contra Enterococcus faecalis, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Komape et al., 2014). Informes anteriores indicaron que la acacetina inhibe el crecimiento de varios microbios grampositivos, gramnegativos, acidorresistentes y hongos (Joseph et al., 2015).

Tabla 8 Mediciones de halos de inhibición en mm frente al aceite de Agastache mexicana ssp., mexicana

Agastache mexicana ssp. mexicana	**Microorganismos**							
% Extracto	*E. coli DH5 α*	*E. coli enterotocigénica E9034A*	*E. coli enteropatógena E2348/69-EPEC*	*Pseudomonas aeruginosa PA01*	*Shigella flexneri S17*	*Klebsiella pneumoniae K7*	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus pneumoniae*
100%	**12.6 mm**	**9.6 mm**	**12.3 mm**	0 mm	**15.6 mm**	**11.6 mm**	**12.3 mm**	**10.6 mm**
80%	10.6 mm	8.3 mm	10.3 mm	**2.6 mm**	13.6 mm	9.3 mm	9.6 mm	8.6 mm
60%	9.3 mm	6.6 mm	9.3 mm	0 mm	12 mm	8.6 mm	8.3 mm	5.3 mm
40%	0 mm	6 mm	6.3 mm	0 mm	8.3 mm	7.6 mm	6.3 mm	0 mm
20%	0 mm	5.3 mm	0 mm	0 mm	6.6 mm	5.6 mm	0 mm	0 mm

3.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD DE LOS PATÓGENOS A ANTIBIÓTICOS COMERCIALES

Se obtuvo el comparativo de inhibición que presentaron las diferentes bacterias con respecto a los antibióticos, los cuales se dividen en Gram negativos y Gram positivos de las bacterias patógenas utilizadas, donde se pueden observar los halos de inhibición resultantes de las bacterias que resisten la serie de antibióticos a las cuales son expuestas. Como primera parte se pueden observar los halos de inhibición de las bacterias Gram negativas acompañadas de la Tabla 11 de Mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (-), por otra parte la Tabla 14 respecta a bacterias Gram positivas donde presenta Mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (+) donde se encuentran los diferentes antibióticos a los cuales fueron expuestas las bacterias patógenas, así como la dosis que contiene el antibiograma de cada medicamento, además de los diámetros de inhibición resultantes de cada respectivo grupo de bacterias.

Por otra parte, Tabla 12 muestra la categorización de las bacterias Gram (-) y la Tabla 15 de categorización de bacterias Gram (+), donde las interpretaciones seguidas por las normas establecidas por el NCCLS que corresponde al resultado de los halos donde se indica si una cepa es sensible, intermedio o resistente; en donde sensible hace referencia a que la infección por la cepa puede tratarse adecuadamente empleando dosis habituales de antimicrobiano, se dice intermedio cuando el halo se aproximado a las concentraciones de antimicrobiano emplean dosis más elevadas de lo habitual y es resistente cuando los microorganismos que no se inhiben a concentraciones habituales o microorganismos en los que existen mecanismo de resistencia específicos para el agente estudiado.

Siguiendo lo anterior la Tabla 13 y 16 muestran la categorización, de los aceites esenciales de *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* a diferentes concentraciones y con el antibiótico más utilizado para la serie de

bacterias patógenas pudiendo apreciar una comparativa en la inhibición por parte de antibióticos comerciales y aceites naturales.

ANTIBIOGRAMAS GRAM (-)

E. coli DH5α

a) b)

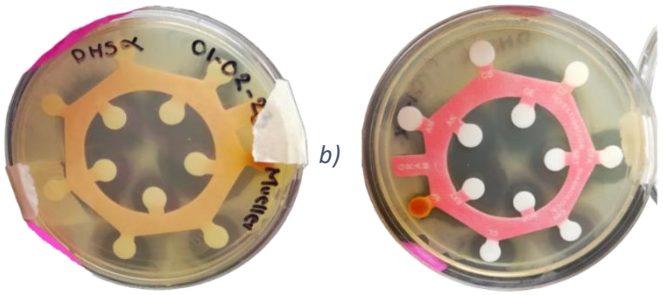


Figura 18 Antibiograma E.coli DH5 α
a) Posterior b) Frontal

E. coli enterotoxigénica E9034A

a) b)

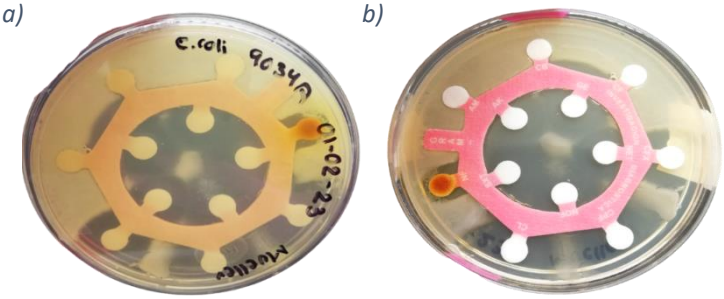


Figura 19 Antibiograma E.coli E9034A
a) Posterior b) Frontal

E. coli enteropatógena E2348/69-EPEC

a) b)

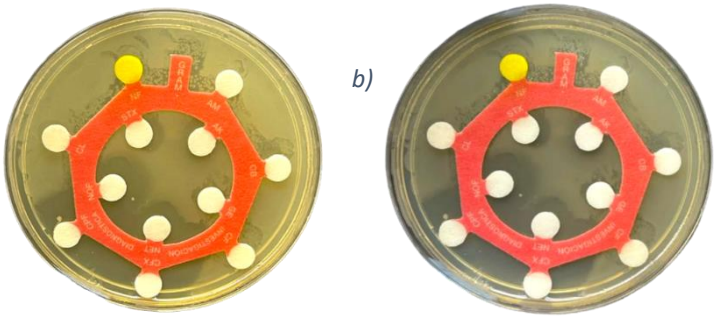


Figura 20 Antibiograma E2348/69- EPEC
a) Posterior b) Frontal

Pseudomonas aeruginosa PA01

a) b)

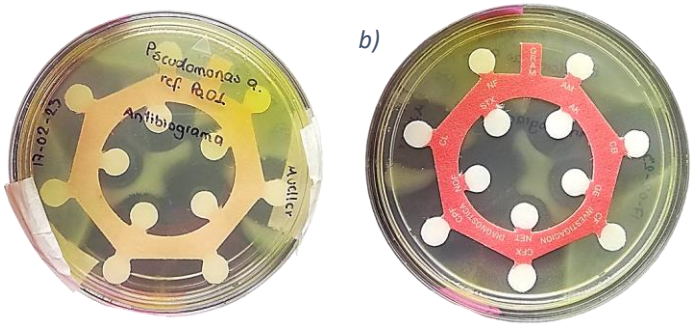


Figura 21 Antibiograma de Pseudomonas aeruginosa

a) Posterior b) Frontal

Shigella flexneri S17

a) b)

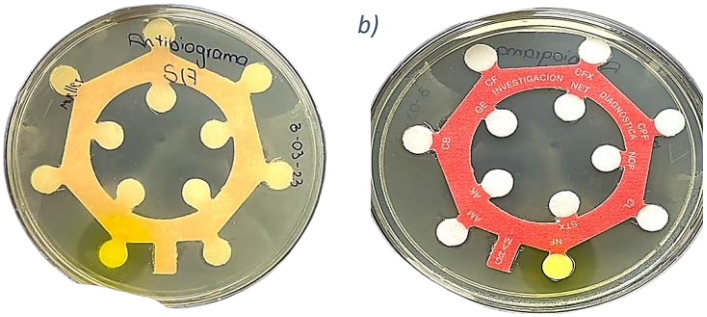


Figura 22 Antibiograma de Shigella flexneri S17

a) Posterior b) Frontal

Klebsiella pneumoniae K7

a) b)

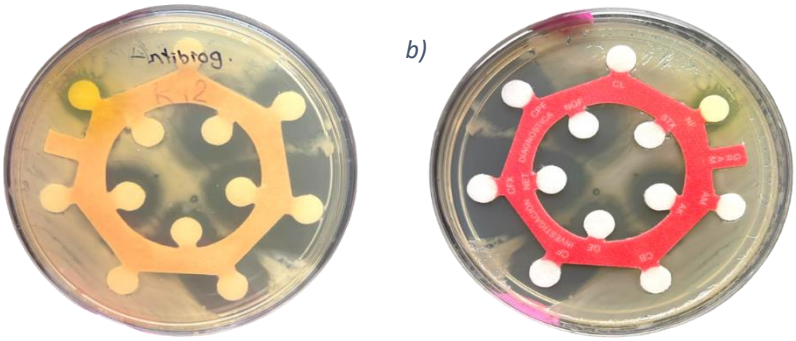


Figura 23 Antibiograma Klebsiella pneumoniae K7

a) Posterior b) Frontal

Tabla 9 Mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (-)

		ANTIBIÓTICOS											
		AK	**AM**	**CB**	**CF**	**CFX**	**CPF**	**CL**	**GE**	**NET**	**NF**	**NOF**	**SXT**
CARGA DISCO		30 µg	10 µg	100 µg	30 µg	30 µg	5 µg	30 µg	10 µg	30 µg	300 µg	10 µg	25 µg
MICROORGANISMOS GRAM (-)	*E. coli-DH5 α*	12 mm	11 mm	0 mm	0 mm	16 mm	18 mm	13 mm	14 mm	15 mm	7 mm	11 mm	20 mm
	E. coli- E9034A	13 mm	0 mm	0 mm	0 mm	18 mm	20 mm	23 mm	13 mm	0 mm	9 mm	11 mm	16 mm
	E2348/69-EPEC	8 mm	0 mm	0 mm	0 mm	18 mm	17 mm	0 mm	8 mm	13 mm	0 mm	13 mm	0 mm
	Pseudomonas aeruginosa PA01	13 mm	0 mm	20 mm	0 mm	22 mm	23 mm	15 mm	11 mm	11 mm	0 mm	13 mm	11 mm
	Shigella flexneri S17	12 mm	0 mm	0 mm	22 mm	25 mm	18 mm	0 mm	12 mm	14 mm	16 mm	17 mm	0 mm
	Klebsiella pneumoniae K7	12 mm	0 mm	0 mm	12 mm	24 mm	16 mm	0 mm	11 mm	13 mm	9 mm	15 mm	0 mm

Tabla 10 Categorización de las bacterias Gram (-) referente a antibiogramas

		ANTIBIÓTICOS											
		AK	**AM**	**CB**	**CF**	**CFX**	**CPF**	**CL**	**GE**	**NET**	**NF**	**NOF**	**SXT**
CARGA DISCO		30 µg	10 µg	100 µg	30 µg	30 µg	5 µg	30 µg	10 µg	30 µg	300 µg	10 µg	25 µg
MICROORGANISMOS GRAM (-)	*E. coli-DH5 α*	R	R	R	R	I	I	I	I	S	R	R	S
	E. coli- E9034A	R	R	R	R	I	I	S	I	R	R	R	S
	E2348/69-EPEC	R	R	R	R	I	I	R	R	I	R	I	R
	Pseudomona aeruginosa PA01	R	-	S	R	I	S	I	R	R	R	I	I
	Shigella flexneri S17	R	R	R	S	S	I	R	R	I	I	S	R
	Klebsiella pneumoniae K7	R	R	R	R	S	I	R	R	I	R	I	R

****Interpretación de resultados:**

S=Sensible, I=Intermedio, R=Resistente

Tabla 11 Comparación aceite Clinopodium mexicanum a diferentes concentraciones y antibiótico más utilizado

Clinopodium mexicanum		**Porcentajes de dilución del aceite**				
Microorganismos)	**Antibiótico más utilizado**	**100%**	**80%**	**60%**	**40%**	**20%**
E. coli DH5 α	Gentamicina GE	**I** 13.3 mm	**R** 7.6 mm	**R** 8 mm	**R** 6 mm	-
E. coli enterotoxigénicaE9034A	Netilmicina NET	**S** 16.3 mm	**R** 11.6 mm	**R** 9.3 mm	**R** 6.6 mm	-
E. coli enteropatógenaE2348/69-EPEC	Amikacina AK	**S** 37.3mm	**S** 22mm	**R** 10mm	**R** 7.6mm	**R** 7mm
Pseudomonas aeruginosa PA01	Ciprofloxacino CPF	**I** 17.6mm	**I** 15.3mm	**I** 15.6mm	-	-
Shigella flexneri S17	Ampicilina AM	**S** 17mm	**S** 16.6mm	**I** 13mm	**R** 8.3mm	**R** 7.3mm
Klebsiella pneumoniae K7	Gentamicina GE	**I** 13mm	**S** 24.6mm	**S** 18.3mm	**R** 7mm	-
Staphylococcus aureus	Vancomicina VA	**S** 37mm	**S** 19.6mm	**S** 15.6mm	-	-
Streptococcus pneumoniae	Cefotaxima CFX	**R** 10.3mm	**R** 9mm	**R** 7mm	-	-

****Interpretación de resultados:**

S=Sensible, I=Intermedio, R=Resistente

Rangos de halos de sensibilidad en mm:

- Amikacina; R= ≤14, I=15-16, S= ≥ 17
- Netilmicina: R= 12, I=13-14, S=≥ 15
- Gentamicina; R= 12, I=13-14, S=≥ 15
- Ampicilina; R= ≤11, I= 12-13, S=≥ 14
- Vancomicina; S= ≥ 15
- Cefotaxima; R= ≤14, S= ≥ 23
- Ciprofloxacino; R= ≤14, I=15-20, S= ≥ 21

De acuerdo a lo mostrado anteriormente, ahora procede el perfil de susceptibilidad por parte de las bacterias Gram positivas, frente a las bacterias patógenas a las cuales fue expuesto, de la misma manera se cuenta con una tabla que contiene las mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (+), así como la interpretaciones seguidas por las normas establecidas por el NCCLS que corresponde al resultado de los halos donde se indica si una cepa es sensible, intermedio o resistente que corresponde a la Tabla 15 Categorización de las bacterias Gram (+) referente a antibiogramas

ANTIBIOGRAMAS GRAM (+)

Staphylococcus aureus

a) b)

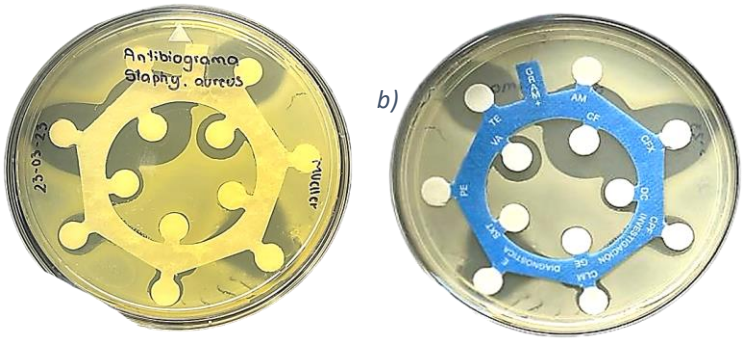


Figura 24 Antibiograma Staphylococcus aureus
a) Posterior b) Frontal

Streptococcus pneumoniae

a)

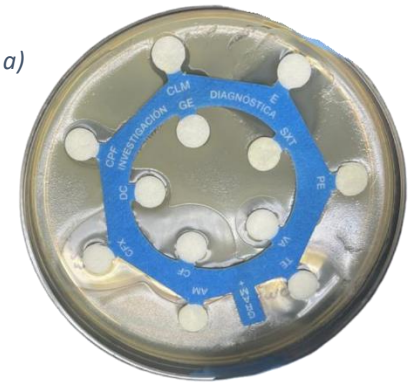


Figura 25 Antibiograma Streptococcus pneumoniae

a) Frontal

Tabla 12 Mediciones de la resistencia en mm de antibiogramas a las diferentes bacterias Gram (+)

		ANTIBIÓTICOS											
		AM	**CF**	**CFX**	**CPF**	**CLM**	**DC**	**E**	**GE**	**PE**	**TE**	**SXT**	**VA**
CARGA DISCO		10 µg	30 µg	30 µg	5 µg	30 µg	1 µg	15 µg	10 µg	10 U	30 µg	25 µg	30 µg
MICROORGANISMOS GRAM (+)	*Staphylococcus aureus*	0 mm	19 mm	9 mm	8 mm	3 mm	7 mm	10 mm	0 mm	0 mm	14 mm	0 mm	5 mm
	Streptococcus pneumoniae	0 mm	17 mm	11 mm	12 mm	6 mm	3 mm	13 mm	5 mm	0 mm	8 mm	0 mm	8 mm

Tabla 13 Categorización de las bacterias Gram (+) referente a antibiogramas

		ANTIBIÓTICOS											
		AM	**CF**	**CFX**	**CPF**	**CLM**	**DC**	**E**	**GE**	**PE**	**TE**	**SXT**	**VA**
CARGA DISCO		10 µg	30 µg	30 µg	5 µg	30 µg	1 µg	15 µg	10 µg	10 U	30 µg	25 µg	30 µg
MICROORGANISMOS GRAM (+)	*Staphylococcus aureus*	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Streptococcus pneumoniae	R	I	R	R	R	-	R	R	R	R	R	R

****Interpretación de resultados:**

S=Sensible, I=Intermedio, R=Resistente

Tabla 14 Comparación aceite Agastache mexicana ssp. mexicana a diferentes concentraciones y antibiótico más utilizado

Agastache mexicana ssp. mexicana		**Porcentajes de dilución del aceite**				
Microorganismos	**Antibiótico más utilizado**	**100%**	**80%**	**60%**	**40%**	**20%**
E. coli DH5 α	Gentamicina GE	**I** 12.6 mm	**R** 10.6 mm	**R** 9.3 mm	-	-
E. coli enterotoxigénica E9034A	Netilmicina NET	**R** 9.6 mm	**R** 8.3 mm	**R** 6.6 mm	**R** 6 mm	**R** 5.3 mm
E. coli enteropatógena E2348/69-EPEC	Amikacina AK	**R** 12.3 mm	**R** 10.3 mm	**R** 9.3 mm	**R** 6.3 mm	-
Pseudomonas aeruginosa Pa01	Ciprofloxacino CPF	-	**R** 2.6 mm	-	-	-
Shigella flexneri S17	Ampicilina AM	**S** 15.6 mm	**S** 13.6 mm	**I** 12 mm	**R** 8.3 mm	**R** 6.6 mm
Klebsiella pneumoniae K7	Gentamicina GE	**R** 11.6 mm	**R** 9.3 mm	**R** 8.6 mm	**R** 7.6 mm	**R** 5.6 mm
Staphylococcus aureus	Vancomicina VA	**I** 12.3 mm	**R** 9.6 mm	**R** 8.3 mm	**R** 6.3 mm	
Streptococcus pneumoniae	Cefotaxima CFX	**R** 10.6 mm	**R** 8.6 mm	**R** 5.3 mm	-	-

****Interpretación de resultados:**

.

S=Sensible, I=Intermedio, R=Resistente

Rangos de halos de sensibilidad en mm:

- Amikacina; R= ≤14, I=15-16, S= ≥ 17
- Netilmicina: R= 12, I=13-14, S= ≥ 15
- Gentamicina; R= 12, I=13-14, S= ≥ 15
- Ampicilina; R= ≤11, I= 12-13, S= ≥ 14
- Vancomicina; S= ≥ 15
- Cefotaxima; R= ≤14, S= ≥ 23
- Ciprofloxacino; R= ≤14, I=15-20, S= 21

En lo que respecta a la Tabla 13 que hace referencia a la Categorización de *Clinopodium mexicanum* de bacterias Gram negativas y Gram positivas a diferentes concentraciones y con el antibiótico más utilizado, se puede observar que en la mayoría de los casos se logró obtener que una inhibición considerable por parte del aceite esencial, puesto que de las ocho bacterias patógenas la mitad de ellas resultaron ser sensibles a la mayor concentración de aceite, por otra parte tres bacterias resultaron tener una inhibición intermedia y solamente una ellas resultó ser resistente. Así mismo la concentración a la cual resultó el aceite esencial de *Clinipodium mexicanum* tener efectividad fue a 60% en la mayoría de los casos.

Al observar la Tabla 12 que respecta a la Categorización de las bacterias Gram (-) referente a antibiogramas, se puede notar que los antibióticos utilizados con mayor frecuencia o de primera línea que se prescriben para cada bacteria se muestra que tiene un perfil que resulta ser resistente esto referente a antibiogramas de tipo comercial, los medicamentos corresponden a Amikacina (AK), Ampicilina (AM) y Carbenicilina (CB); en donde estos medicamentos generan halos de inhibición que demuestra ser Resistente siendo igual o menor a 14 mm, Intermedio con un intervalo de 15 a 16 mm y Sensible a 17mm en el caso de Amikacina ; Resistente igual o menor a 11 mm, Intermedio a un intervalo de 15 a16 mm y Sensible a 14 mm para Ampicilina y es Resistente igual o menor a 18 mm, Intermedio a intevalo de 18 a 22 mm y Sensible a 23 mm para Carbenicilina; en donde al comparar esto con el aceite esencial de *Clinipodium mexicanum* puro logra superar dichas medidas de diámetro con 37.3 mm para la bacteria *E. coli enteropatógena E2348/69 EPEC;* al remitirse nuevamente a la Tabla 13 estos medicamentos fueron superados por la inhibición que provoco el aceite esencial.

Por otra parte, la Tabla 16 donde muestra la Categorización de *Agastache mexicana ssp. mexicana* a diferentes concentraciones y con el antibiótico más utilizado para el grupo de bacterias Gram positivas y Gram negativas con el antibiótico mas utilizado en cada caso, en dicha tabla se puede observar que solamente una bacteria fue sensible que corresponde a *Shigella flexneri* que en ambos aceites

esenciales resulto tener inhibición, mientras que dos bacterias resultaron tener una inhibición intermedia y la mayoría de ellas resultó ser resistente.

Y en la Tabla 15, la Categorización de las bacterias Gram (+) referente a antibiogramas logró demostrar que para los primeros antibióticos de primera línea que se prescriben son Ampicilina (AM), Cefalotina (CF) y Cefotaxima (CFX). En donde los halos de sensibilidad comprenden las siguientes medidas, para Ampicilina es Resistente igual o menor a 11 mm, Intermedio a un intervalo de 12 a 13 mm y Sensible a 14 mm; para Cefalotina es Resistente igual o menor a 14 mm, Intermedio a un intervalo de 15 a17 mm y Sensible a 18 mm y por último para Cefotaxxima es Resistente igual o menor a 14 mm y Sensible a 23 mm. Por lo que el aceite esencial de *Agastache mexicana ssp. mexicana* desarrollo diámetro de 15.6 mm para *Shigella flexneri* lo cual supera la sensibilidad que causa la Ampicilina.

3.4 CONCLUSIONES

La presente investigación, evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Clinopodium mexicanum* y *Agastache mexicana ssp. mexicana* contra bacterias patógenas, así como la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana contra estas bacterias Gram (+) y Gram (-) comparando la eficiencia de inhibición que presentan y como representan una alternativa. Los resultados de este estudio apoyan la idea de que los aceites esenciales de estas plantas tienen una actividad antimicrobiana que resulta ser un buen antimicrobiano. Los experimentos ejecutados confirman que ***Clinopodium mexicanum*** logró inhibir el crecimiento de todas las bacterias, sin embargo, en algunas de ellos se obtuvieron mejores resultados generando una mayor inhibición con el aceite puro, como *E. coli E2348/69-EPEC* y *Staphylococcus aureus* con halos de valores de 37.3 y 37 mm.

Al comparar el antimicrobiano con el antibiótico más utilizado para la bacteria *E. coli E2348/69-EPEC* que es Amikacina (AK) se pudo demostrar que es sensible a

este aceite esencial pues funge como antimicrobiano a concentraciones de 100% y 80%; para *Staphylococcus aureus* resulto obtener una resistencia en concentraciones de 100%, 80%% y 60% donde actualmente el antibiótico más utilizado es la Vancomicina (VA).

En cuanto a ***Agastache mexicana ssp. mexicana*** demostró la inhibición de algunas bacterias, en menor proporción que en comparación de la primera planta, aunado a eso la mayor inhibición se logró en la bacteria *Shigella flexneri S17* donde se logró obtener una medida promedio de 15.6 mm a una concentración del 100%, seguido de una medida de 12.6mm en *E. coli DH5 α.* Al comparar el antimicrobiano con el antibiótico más utilizado para tratar a la bacteria *Shigella flexneri S17* que es Ampicilina (AM) donde demostró que a una concentración de 100% y 80% tiene un rango de inhibición que corresponde a que es sensible en ambos casos y a 60% resultó ser intermedia, por otra parte, para la bacteria *E. coli DH5 α* solamente consiguió tener un resultado intermedio en la concentración de 100%.

Se logó evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales testeados de que contienen principios bioactivos y una vez sustentado y comparados los resultados de eficiencia de inhibición arrojados por los antibióticos y aceites esenciales de plantas se puede estimar que estos aceites poseen una actividad antimicrobiana la cual les confirió el poder de inhibición contra bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-) por lo cual resultan ser nuevas alternativas para inhibir bacterias resistentes a antibióticos, además de que no se habían probado las propiedades antimicrobianas que pueden llegar a tener estos aceites lo cual hace innovadora esta propuesta natural. Es importante resaltar que los aceites esenciales ocupados son de plantas endémicas las cuales poseen características que les permitió inhibir a bacterias patógenas probadas, causantes de enfermedades tanto respiratorias como gastrointestinales, sin embargo, se requerirían estudios más detallados para encontrar aquellas sustancias bioactivas que son propias de las plantas y que al ser comparadas con antibioticos de prescripción médica resultan tener un mayor éxito en cuanto a la inhibición que estos generan .

3.5 COSTO BENEFICIO

Finalmente, se pudo demostrar que los aceites esenciales de *Clinopodum mexicanum* y *Agastache mexicana spp. mexicana* tienen una actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas por lo que resultan ser una nueva alternativa natural frente a estos patógenos y en comparación con antibióticos comerciales los cuales cada vez resultan menos efectivos y aunado a ello sus precios van incrementando; el uso de aceites esenciales no implica un gasto mayor y se evidencio que tiene un gran impacto antagónico contra bacterias tanto gran positivas como negativas es decir es de amplio espectro.

En cuanto a gastos reportados por el Laboratorio Fiq 5, 305 en la Facultad de Ingeniería Química de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se tiene que para la planta de *Clinopodum mexicanum* la cual manifestó un mayor efecto antagonista contra las bacterias resistentes a antibióticos en el mercado tiene un valor comercial de $160.00 el kilogramo de planta seca.

Contando gastos generados como lo son insumos, energía eléctrica y las corridas necesarias para la obtención del aceite esencial se registró que 1 ml de aceite esencial de *Clinopodum mexicanum* tiene un valor de $56. Para el estudio realizado se ocuparon 75µ de aceite esencial por bacteria, testeando un total de 8 bacterias patógenas en total se ocuparon 600µ de aceite esencial lo que equivale a 0.6 ml siendo así un total de $33.6.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Wernli D, Jorgensen PS, Harbarth S, Carroll SP, Laxminarayan R, Levrat N, et al. (2017). Antimicrobial resistance: The complex challenge of measurement to inform policy and the public. PLoS Med 14(8): e1002378.
- Fajardo A, Martínez JL. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. Curr Opin Microbiol 11:161–167. http://dx.doi.org /10.1016/j.mib.2008.02.006.
- Sommer, M. O., Dantas, G., and Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325, 1128–1131. doi: 10.1126/science.1176950
- World Health Organizatio (2011). World Health Day. Suiza: WHO.
- Macfarlane, J., Holmes, W., Macfarlane, R. and Britten, N. (1997) Influence of Patients' Expectations on Antibiotic Management of Acute Lower Respiratory Tract Illness in General Practice: Questionnaire Study. British Medical Journal, 315, 1211-1214. https://doi.org/10.1136/bmj.315.7117.1211
- Abreu O, Alpuche C, Arathoon E, Arbo A. (2011). Tratamiento de las enfermedades infecciosas. Quinta edición Washington, D.C: OPS
- Fischer K., and C. Phillips. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends Food Sci. Technol. 19:156-164. doi:10.1016/j.tifs.2007.11.006
- Rivera J., Crandall P.G., O'Bryan C.A., and S.C. Ricke S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems: A review. Food Control 54:111-119. doi:10.1016/j.foodcont.2014.12.040
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez M., Gallegos-Solís A., Heinze G., Moreno J. (2010). Depressant effects of Clinopodium mexicanum Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. J. Ethnopharmacol. 130: 1-8.
- Santillán-Ramírez, M.A., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Rodríguez, A., Aguilar-Contreras, A., (2008). Etnobotany, leaf architecture, and vegetative anatomy of Agastache mexicana ssp. Mexicana and A. Mexicana ssp. Xolocotziana. Rev Mex. Biodivers. 79, 513-524
- Finlay, B.B., Falkow, S., (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisitedMicrobiol. Mol. Biol. Rev.: MMBR 61 (2), 136-169Retrieved from. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid 5 232605&tool 5 pmcentrez&rendertype 5 abstract
- Tuttolomondo T., La Bella S., Licata M., et al. (2013). Biomolecular characterization of wild sicilian oregano: phytochemical screening of essential oils and extracts, and evaluation of their antioxidant activities. Chemistry and Biodiversity. 2013;10(3):411–433.
- Marshall CA, Hawthorne WD. (2012). Regeneration ecology of the useful flora of the Putu Range Rainforest, Liberia. Econ Bot 66: 398 - 412. https://doi.org/10.1007/s12231-012-9217-0
- Linares-Mazari ME, Bye R. (2016). La dinámica de un mercado periférico de plantas medicinales en México: el tianguis de Ozumba, Estado de México, como centro acopiador para el mercado de Sonora (Mercado Central). http://www.historicas.unam.mx/publicaciones/publicadigital/libros/caminosymercados/cm031.pdf
- Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. J Agric Food Chem. (2013). Nov 20;61(46):10835-47
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (2007). Farmacognosia: da Planta ao medicamento, 6th ed.; UFSC/UFRGS: Porto Alegre, Brazil, p. 1104.
- Bandoni, A.L., Czepak, M.P. (2008). Os Recursos Vegetais Aromáticos no Brasil: Seu Aproveitamento Industrial Para a Produção de Aromas e Sabores, 1st ed.; EDUFES: Vitória, Brazil, pp. 345–367.
- World Health Organization. Antibiotic resistance [internet]; 2019 [citado 2023 junio]. Disponible en: https://www.who.int/ en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance
- Fair RJ, Tor Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. Perspect Medicin Chem. 2014;6:25-64. doi: https://doi. org/10.4137/PMC.S14459
- Maldonado NA, Múnera MI, López JA, et al. (2014). Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012: resultados de seis años de vigilancia. Biomedica. 2014;34(3):433-46. doi: https://doi. org/10.7705/biomedica.v34i3.1658
- Vasoo S, Barreto JN, Tosh PK. (2015). Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: An update for the practicing clinician. Mayo Clin Proc. 2015;90(3):395-403. doi: https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.12.002
- Logan LK. (2012). Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: An emerging problem in children. Clin Infect Dis. 2012;55(6):852- 9. doi: https://doi.org/10.1093/cid/cis543.

- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, et al. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013;13(12):1057- 98. doi: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9
- Centers for Disease Control and Prevention. Biggest Threats and Data [internet]. 2019. [citado 2023 junio]. Disponible en: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fdrugresistance%2Fbigest_threats.htmlhttp://www.cdc. gov/drugresistance/threat-report-2013/.
- Loho T, Dharmayanti A. Colistin. (2015). An antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. Acta Med Indones. 2015;47(2):157-68
- Quizhpe A, editor (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. Cuenca, Ecuador: ReAct Latinoamérica, Facultad de Ciencias Médicas, Asociación de Facultades Ecuatorianas de Ciencias Médicas y de la Salud (afeme).
- Ríos, M., Aguilar, B., Navarro, V. (2003). Two new benzofuranes from Eupatorium aschenbornianum and their antimicrobial activity. Planta Medica 2003; 69:967-970.
- Maxia A., Lancioni C., Mura L. y Mongiano P.D. (2005). Plantas usadas en la práctica etnoveterinaria en el Nuorese (Cerdeña, Italia). Revista de Fitoterapia 5(2): 155-161.
- Muraina IA, Picard J, Eloff JN. (2009). Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organism. Phytomedicine. 2009 Mar;16(2-3):262-4.
- Wilson R, Dowling R. (1998). Pseudomonas aeruginosa and other related species. Thorax. 1998;53:213-9.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P et al. (2000). Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000;406:959–964
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa. Molecular Medical Microbiology, 753–767.* doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x
- Villa J, Marco F. (2010). Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28:726–36.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. (2009). Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009;22:582–610
- Yordanov D, Strateva T. (2009). Pseudomonas aeruginosa - a phenomenon of bacterial resistance. J. Med. Microbiol. 2009; 58(9): 1133-48. doi: 10.1099/jmm.0.009142-0.
- Gellatly SL, Hancock RE. (2013). Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog. Dis. 2013; 67(3): 159- 73. doi: 10.1111/2049-632X.12033
- Pereira SG, Rosa AC, Cardoso O. (2015). Virulence factors as predictive tools for drug resistance in Pseudomonas aeruginosa. Virulence 2015; 6 (7): 679-83. doi: 10.1080/21505594.2015.1048958.
- Garau J., Gómez L. (2003). Pseudomonas aeruginosa pneumonia. Curr Opin Infect Dis, 16:135-143.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. Lancet Infect Dis 2013;13:785e96.
- Bagley ST.(1985). Habitat association of Klebsiella species. Infect Control 6:52–58.
- Rock C, Thom KA, Masnick M, Johnson JK, Harris AD, Morgan DJ. (2014). Frequency of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing Klebsiella species contamination ofhealthcare workers and the environment. Infect Control Hosp Epide-miol35:426–429.http://dx.doi.org/10.1086/675598.
- Paczosa MK, Mecsas J. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. (2016). Microbiol Mol Biol Rev. 2016 Jun 15;80(3):629-61. doi: 10.1128/MMBR.00078-15.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS et al. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2009;48:1–12.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318-27. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Wyres K, Holt K. (2018). Klebsiella pneumoniae as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. Curr Opin Microbiol. 2018;45:131-139. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
- Navarro F, Miro E, Mirelis B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28(9):638-645.
- Livermore D. (1995). b-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clinical microbiology reviews 1995; 8(4):557-584

- González-Vértiz A, Alcántar-Curiel D, Cuauhtli M, Daza C, Gayosso C, Solache G et al. (2001). Multiresistant extended-spectrum β-lactamaseproducing Klebsiella pneumoniae causing an outbreak of nosocomial bloodstream infection. Infect Control Hosp Epidemiol 2001; 22:723-725.
- López JA, Robledo J. (2007). Enterobacterias y otros bacilos gramnegativos. Microbiología de las Infecciones Humanas. Medellín: Fondo Editorial CIB; 2007; 130-167.
- Kahsay AG, Muthupandian S. (2016). A review on sero diversity and antimicrobial resistance patterns of Shigella species in Africa, Asia and South America, 2001–2014. BMC Res Notes. 2016;9 (1):422. doi:10.1186/s13104-016-2236-7
- Della Gaspera, Anabella, María Inés Caffer, Marcela Panagópulo, María R. Viñas, Hebe A. Barrios, Silvia S. Viora, and Ricardo J. Anselmo. (2015). *Brote De Shigelosis En La Ciudad De Luján, Argentina*. Informe Breve, ISSN 0325-7541, Rev. Argent. Microbiol., 47, 112-117.
- Qu F, Bao C, Chen S, et al. (2012). Genotypes and antimicrobial profiles of Shigella sonnei isolates from diarrheal patients circulating in Beijing between 2002 and 2007. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74(2):166–170. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.026
- Hoge CW, Gambel JM, Srijan A, Pitarangsi C, Echeverria P. (1998). Trends in antibiotic resistance among diarrheal pathogens isolated in Thailand over 15 years. Clin Infect Dis 1998; 26: 341-5
- Lim YS, Tay L. (1991). Serotype distribution and antimicrobial resistance of Shigella isolates in Singapore. Diarrhoeal Dis Res 1991; 9: 328-31.
- Chu YW, Houang ETS, Lyon DJ, Ling M, Ng TK, Cheng AFB. (1998). Antimicrobial resistance in Shigella flexneri and Shigella sonnei in Hong Kong, 1986 to 1996. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 440- 3.
- Erdman SM, Buckner EE, Hindler JF. (2008). Options for treating resistant Shigella species infections in children|. *J Pediatr Pharmacol Ther* 13:29–43
- Thompson CN, Thieu NT, Vinh PV, Duc AN, Wolbers M, Vinh H, Campbell JI, Ngoc DT, Hoang NV, Thanh TH, The HC, Nguyen TN, Lan NP, Parry CM, Chau NV, Thwaites G, Thanh DP, Baker S. (2016). Clinical implications of reduced susceptibility to fluoroquinolones in paediatric Shigella sonnei and Shigella flexneri infections. *J Antimicrob Chemother* 71:807–815.
- Nuesch-Inderbinen M, Heini N, Zurfluh K, Althaus D, Hachler H, Stephan R. (2016). Shigella antimicrobial drug resistance mechanisms, 2004-2014. Emerg Infect Dis 22:1083–1085. https://doi.org/10.3201/eid2206.152088.
- Aggarwal P, Uppal B, Ghosh R, Krishna Prakash S, Chakravarti A, Jha AK, Rajeshwari K. (2016). Multi drug resistance and extended spectrum beta lactamases in clinical isolates of Shigella: a study from New Delhi, India. Travel Med Infect Dis 14:407– 413. https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016 .05.006
- Mani, S., Wierzba, T., Walker, R.I., (2016). Status of vaccine research and development for Shigella. Vaccine 34 (26), 2887-2894.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., et al., (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet 382 (9888), 209-222.
- Etiopatogenia microbiológica Género Staphylococcus. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2nd ed. FEFMUR; 2006;259-266.
- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. (2000). Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev 2000; 13:16- 34
- Saïd-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. (2003). Communityacquired methicillin-resistant Staphylococcusaureus: an emerging pathogen. Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24:451-5.
- Lee SY, Kuti JL, Nicolau DP. (2005). Antimicrobial management of complicated skin and skin structure infections in the era of emerging resitance. Surgical Infect 2005; 6:283-95.
- Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. (2002). Vancomycin resistance in staphylococci. Clin Microbiol 2002; 15:430-8.
- Knutton S, Lloyd DR, McNeish AS. (1987). Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. Infect Immun 1987; 55: 69-77
- McDaniel TK, Kaper JB. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12. Mol Microbiol 1997; 23: 399-407.
- Kaper J B. (1996). Defining EPEC. Rev Microbiol 1996; 27: 130-3.
- Brinkley C, Burland V, Keller R, Rose DJ, Boutin AT, Klink SA, et al. (2006). Nucleotide sequence analysis of the enteropathogenic Escherichia coli adherence factor plasmid pMAR7. Infect Immun 2006; 74: 5408-13
- Preado J., Valeria. (2001). Conceptos microbiológicos de Streptococcus pneumoniae: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS. *Revista chilena de infectología*, *18*(Supl. 1), 6-9. https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182001000000002

- Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. Wkly Epidemiol Rec. 2007;82(12):93-104
- Appelbaum PC. (1992). Antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae: an overview. Clin Infect Dis 1992; 15(1): 77-83.
- Melander E, Môlstad S, Persson K, Hansson HB, Sôderstrôm M, Ekdahl K. (1998). Previous antibiotic consumption and other risk factors for carriage of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae in children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17(12):834-8.
- Melander E, Ekdahl K, Jônsson G, Môlstad S. (2000). Frequency of penicillinresistant pneumococci in children is correlated to community utilization of antibiotics. Pediatr Infect Dis J. 2000;19(12):1172-7
- Johnson DM, Stilwell MG, Fritsche TR, Jones RN. (2006). Emergence of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1999-2003). Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;56:69-74
- Bakir, J., de Gentile, A. S., López H, G., Procopio, A., & Vázquez, M. (2003). Perfil epidemiológico de las infecciones invasivas por Streptococcus pneumoniae. *Revista Chilena de Pediatria*, *74*(1). https://doi.org/10.4067/s0370-41062003000100015
- Cordiés L, Machado A, Hamiton M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Acta Médica Cubana 1998; 8(1):18-20.
- Tello A, Austin B, Telfer TC. (2011). Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. Environ Health Perspect.
- Hart CA. (1998). La resistencia a los antibióticos. ¿un problema creciente? Br Med J (Ed Latinoam) 1998;6:147-8
- Couvalin AJ. (1998). El final de la edad de oro de los antibióticos. Ther Nat 1988; 314(3):50-2.
- Blair, J. M.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol. 2015, 13, 42−51
- Katayama, Y.; Ito, T.; Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44, 1549−1555.
- Griffith, F., (1928). The significance of pneumococcal types. J. Hyg. (Lond.) 27, 113–159
- Ivancevic, A.M., Walsh, A. M., Kortschak, R.D., Adelson, D.L., (2013). Jumping the fine LINE between species: Horizontal transfer of transposable elements in animals catalyses genoma evolution. Bioessays 35 (12), 1071-1082
- Schönknecht, G., Weber, A.P., Lercher, M.J., (2014). Horizontal gene acquisitions by eukaryotes as drivers of adaptive evolution. Bioessays 36 (1), 9-20.
- Crisp, A., Boschetti, C., Perry M., Tunnacliffe, A., Micklem, G., (2015). Expression of multiple horizontally acquired genes is a hallmark of both vertebrate and invertebrate genomes. Genomes Biology 16 (1), 50.
- Wolska, K. I. (2003). Horizontal DNA Transfer Between Bacteria in the Environment. Acta Microbiologica Polonica 52 (3): 233-243
- Llosa, M., De la Cruz, F. (2005). Bacterial Conjugation: a Potential Tool for Genomic engineering. Research in Microbiology 156 (1): 1-6.
- Panicker, M. M., Minkley, E. G. Jr. (1985). DNA Transfer Occurs During a Cell Surface Contact Stage of F Sex Factor-Mediated Bacterial Conjugation. Journal of Bacteriology 162 (2): 584-590
- Soucy, S.M., Huang, J., Gogarten, J.P., (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. Nat. Rev. Genet. 16 (8), 472.
- Torrenegra-Alarcón, M., Granados-Conde, C., Durán-Lengua, M., León-Méndez, G., Yáñez-Rueda, X., Martínez, C., & Pájaro-Castro, N. (2016). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de Minthostachys mollis. Orinoquia, 20(1), 69-74. https://www.redalyc.org/pdf/896/89647074008.pdf
- Maldonado Guacho, V. R. (2017). Efecto inhibitorio del extracto de toronja (citrus paradisi) en diferentes concentraciones sobre el streptococcus mutans. Estudio in vitro (Bachelor's thesis, Quito: UCE). http://www.dspace.uce.edu.ec/ bitstream/25000/13247/1/T-UCE-0015-805.pdf
- Bassolé, I.H., and H.R. Juliani. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 17:3989-4006. doi:10.3390/molecules17043989
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. Phytother. Res. 2007, 21 (4), 308–323. https://doi.org/10.1002/ptr.2072.

- Bakkali, F., S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar. (2008). Biological effects of essential oils - A review. Food Chem. Toxicol. 46:446-475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Perricone, M., E. Arace, M.R. Corbo, M. Sinigaglia, and A. Bevilacqua. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. Front. Microbiol. 6:76. doi:10.3389/fmicb.2015.00076
- Peters, M. (2016). Essential Oils: Historical Significance, Chemical Composition, and Medicinal Uses and Benefits; Ed.; Chemistry research and applications; Nova Publishers: New York.
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research International, 39(5), 639-644.
- Curtis, S.; Thomas, P.; Johnson, F. (2016). Essential Oils: All-Natural Remedies and Recipes for Your Mind, Body, and Home, First American edition.; DK Publishing: New York, New York.
- Grand Review Research Inc. US. Available from: https://www.grandviewresearch.com/
- Chen Lin, P., Lee, J.J. and Chang, I. (2016). Essential oils from Taiwan: Chemical composition and antibacterial activity against Escherichia coli. Journal of Food and Drug Analysis, 24(3), 2016, p. 464-470
- Villaseñor JL. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. Rev Mex Biodivers 87: 559 - 902.
- Cadena G. (2017). Revisión taxonómica del género Clinopodium L (Lamiaceae) en México. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Alvarado, A. M., F. García-Trejo, A. Cardador-Martínez, F. Magallán-Hernández. (2020). Clinopodium mexicanum: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. Bol. Latinoam. y del Caribe Plant. Medic. y Arom. 19: 149-160.
- Magallán F, Alvarado A, Ocampo R, Guerrero L. (2015). Informe técnico: protocolos de propagación de plantas nativas aromáticas y medicinales con uso potencial en la industria farmacéutica y cosmética. Fondo de vinculación tecnológica. Universidad Autónoma de Querétaro, Queretaro, México.
- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jaquez, P., López, M.E., (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, p. 110
- Arellanes Y, Casas A, Arellanes A, Vega E, Blancas J. (2013). Influence of traditional markets on plant management in the Tehuacán Valley. J Ethnobiol Ethnomed 9: 38. https://doi.org/10.1186/1746-4269-9-38
- Cassani, J., A. G. Escalona-Araujo, M. Martínez-Vazquez, N. Manjarrez, J. Moreno, y R. Estrada-Reyes. (2013). Anxiolyticlike and antinociceptive effects of 2(S)-Neoponcirin in mice. Molecules. 18: 7584 - 7599.
- García RH. (2000). Enciclopedia de plantas medicinales mexicanas. Ed. Posada, México DF, México
- Quattrocchi U. (2012). CRC World dictionary of medicinal and poisonous plants: coomon names,scientific names, eponyms,synonyms and etymology. CRC Press, Boca Raton, USA
- Domínguez-Vázquez G, Castro- Ramírez AE. (2015). Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México. Etnobiología 2:19-31
- Nambo CA. (2015). Etnobotánica de Santiago Huauclilla, Oaxaca y evaluación farmacológica de Zinnia peruviana,Tesis, Universidad Autónoma de México.México
- García Hernández YK. (2014). Sistema médico tradicional rru ngigua (chocho) y el complejo uso de plantas medicinales en San Miguel Tulancingo, Oaxaca. Tesis,Colegio de Posgraduados,Texcoco,México.
- García-Hernández KY, Vibrans H, Rivas-Guevara M, Aguilar -Contreras A. (2015).This plant treats that illness? The hot–cold system and therapeutic procedures mediate medicinal plant use in San Miguel Tulancingo, Oaxaca, Mexico.JEthnopharmacol 163:12-30
- Gallegos-Solis A. (2008). Perfil farmacológico de un extracto acuoso y estudio fitoquímico de extractos orgánicos de toronjil de monte (Satureja mexicana Benth. Briq.). Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R., Montiel, O., (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. Revista Mexicana Biodivers. 84, 30-86
- Standley PC. (1922). Trees and shrubs of Mexico. Gliricidia. Contributions from the US National Herbarium 23: 482 – 483
- Epling C, Játiva C. (1966). A descriptive key to the species of Satureja indigenous to North America. Brittonia 18: 244 - 248. https://doi.org/10.2307/2805363

- Hernández OS. (2003). Estudio fitoquímico de Satureja mexicana Benth y Satureja macrostema Kunth. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México
- Viturro CI, Molina A, Guy I, Charles B, Guinaudeau H, Fournet A. (2000). Essential oils of Satureja boliviana and S. parvifolia growing in the region of Jujuy, Argentina.Flavour Frag J15:377-382.
- Opalchenova G, Obreshkova D. (1999). Antibacterial action of extracts of Clinopodium vulgare L. curative plant. Drug Dev Ind Phar 25:323-328 https://doi.org/10.1081/ddc-100102177
- Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, Marder M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. Eur J Pharmacol 539:168-176
- Gallegos-Solis A. (2008). Perfil farmacológico de un extracto acuoso y estudio fitoquímico de extractos orgánicos de toronjil de monte (Satureja mexicana Benth. Briq.). Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Estrada Reyes R. (2015). Estudio fitoquímico y evaluación neurofarmacológica de los "toronjiles", Clinopodium mexicanum, Dracocephalum moldavica y Agastache mexicana subespecie mexicana y subespecie xolocotziana, utilizados en la medicina tradicional mexicana como tranquilizantes. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Fernández, S., Medina, J.H., Paladini, A.C., (2003). 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. Pharmacology Biochemistry and Behavior 75, 537–545.
- Ibrahim, G, Abdulmumin, S., Musa, K.Y., Yaro, A.H., (2008). Anticonvulsant of crude flavonoid fraction of the stem bark of Ficus sycomorus (Moraceae). Journal of Pharmacology and Toxicology 3, 351–356.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdin, K.A., Qaise, M.Z., Rice-Evans, C., Baur, R., Siegel, E., Rausch, W.D., Rieder, P., Schreier, P., (2004). The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood–brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. British Journal of Pharmacology 142, 811–820.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Paladini, A.C., Marder, M., (2004). Sedative and sleepenhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from Valeriana officinalis. Pharmacology Biochemistry and Behavior 77, 399–404.
- Fernández, S.P., Wasowski, C., Loscardo, L.M., Granger, R.E., Johnston, G.A.R., Paladini, A.C., Marder, M., (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. European Journal of Pharmacology 539, 168–176.
- Lint, H., Epling, C., (1945). A revisión of Agastache. Am. Midl. Nat. 33, 207-230.
- Sanders, R.W., (1987). Taxonomy of Agastache section Brittonastrum (Lamiaceae Nepeteae). Syst. Botany Monogr. 15, 1–92.
- Rzedowski, J., Calderon, G., (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. CONABIO. Instituto de Ecología y Centro Regional del Bajío, México. p. 1405
- González-Trujano. M. E., Ponce-Muñoz, H., Hidaldo-Figueroa, S., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S., (2015). Depressant effects of Agastache mexicana methanol extract and one of major metabolites tilianin. Asian Pac. J. Trop. Med. 8, 185-190.
- Estrada-Reyes, R., López-Rubalcava, C., Ferreyra-Cruz, O.A., Dorante-Barron, A.M. Heinze, G., Moreno-Aguilar, J., Martínez-Vázquez, M., (2014). Central nervous system effects and chemical composition of two subspecies of Agastache mexicana; an ethnomedicine of Mexico. J. Ethnopharmacol. 153, 98-110.
- Estrada-Reyes, R., Martínez-Vázquez, M., Gallegos-Solís, A., Heinze, G., Moreno, J., (2010). Depressant effects of Clinopodium mexicanum Benth. Govaerts (Lamiaceae) on the central nervous system. J. Ethnopharmacol. 130, 1–8
- Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Martínez-Laurrabaquio A, López-Rubalcava C, Heinze G. (2012). Neuropharmacological study of Dracocephalum moldavica L. (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. J Ethnopharmacol 141: 908 - 917. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.028
- Zolla, C., (1994). Diccionario Enciclopédico de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México D.F., Mexico
- Molina-Hernández M, Téllez-Alcántara P, Martínez, E. (2000). Agastache mexicana may produce anxiogenic-like actions in the male rat. Phytomedicine 2000; 7: 199-203
- Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. (2009). Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from Agastache mexicana are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. Biochem Pharmacol. 2009 Jul 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016

- Ibarra-Alvarado C, Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez DM, Hernández-Sandoval L, et al. (2010). Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. Pharm Biol 2010; 48: 732-739.
- González-Ramírez A, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the Agastache mexicana extracts by using several experimental models in rodents. J Ethnopharmacol 2012; 142: 700-705.
- Ventura-Martínez, R., Rodríguez, R., González-Trujano, M. E., Ángeles-López, G. E., Déciga-Campos, M., & Gómez, C. (2017). Spasmogenic and spasmolytic activities of Agastache mexicana ssp. mexicana and A. mexicana ssp. xolocotziana methanolic extracts on the guinea pig ileum. Journal of ethnopharmacology, 196, 58-65
- Flores-Flores, A.; Hernandez-Abreu, O.; Rios, M.Y.; Leon-Rivera, I.; Aguilar-Guadarrama, B.; Castillo-Espana, P.; Perea-Arango, I.; Estrada-Soto, S. (2016). Vasorelaxant mode of action of dichloromethane-soluble extract from Agastache mexicana and its main bioactive compounds. Pharm. Biol. 2016, 54, 2807–2813.
- Navarrete, A.; Avila-Rosas, N.; Majin-Leon, M.; Balderas-Lopez, J.L.; Alfaro-Romero, A.; Tavares-Carvalho, J.C. (2017). Mechanism of action of relaxant effect of Agastache mexicana ssp.mexicana essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle. Pharm. Biol. 2017, 55, 96–100.
- Carmona-Castro, G.; Estrada-Soto, S.; Arellano-Garcia, J.; Arias-Duran, L.; Valencia-Diaz, S.; Perea-Arango, I. (2019). High accumulation of tilianin in in-vitro cultures of Agastache mexicana and its potential vasorelaxant action. Mol. Biol. Rep. 2019, 46, 1107–1115.
- Gonzalez-Trujano, M.E.; Ponce-Munoz, H.; Hidalgo-Figueroa, S.; Navarrete-Vazquez, G.; Estrada-Soto, S. (2015). Depressant effects of Agastache mexicana methanol extract and one of major metabolites tilianin. Asian Pac. J. Trop. Med. 2015, 8, 185–190.
- Hernandez-Abreu, O.; Torres-Piedra, M.; Garcia-Jimenez, S.; Ibarra-Barajas, M.; Villalobos-Molina, R.; Montes, S.; Rembao, D.; Estrada-Soto, S. (2013). Dose-dependent antihypertensive determination and toxicological studies of tilianin isolated from Agastache mexicana. J. Ethnopharmacol. 2013, 146, 187–191.
- Zielińska, S.; Matkowski, A. (2014). Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochem. Rev.* 2014, *13*, 391–416.
- Bye, R.; Linares, E.; Ramamoorthy, T.P.; García, F.; Collera, O.; Palomino, G.; Corona, V. *Agastache mexicana* Subs. xolocotziana (Lamiaceae). (1987). A new taxon from mexican medicinal plants. *Phytologia* 1987, *62*, 156–163.
- Najar, B.; Marchioni, I.; Ruffoni, B.; Copetta, A.; Pistelli, L.; Pistelli, L. (2019). Volatilomic analysis of four edible flowers from agastache genus. *Molecules* 2019, *24*, 4480
- Juárez, Z.N.; Hernández, L.R.; Bach, H.; Sánchez-arreola, E.; Bach, H. (2015). Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. xolocotziana and Porophyllum linaria against post-harvest pathogens. *Ind. Crop. Prod.* 2015, *74*, 178–182
- Juárez, Z.N.; Bach, H.; Bárcenas-Pozos, M.E.; Hernández, L.R. (2021). Impact of the Persistence of Three Essential Oils with Antifungal Activities on Stored Wheat Grains, Flour, and Baked Products. Foods 2021, 10, 213.
- López, J.L.; Baltazar, C.; Torres, M.; Ruíz-Baltazar, A.; Esparza, R.; Rosas, G. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Extracts of Mexican Medicinal Plants. (2017). In *Characterization of Metals and Alloys*; Campos Pérez, R., Cuevas Contreras, A., Muñoz Esparza, R., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; p. 255. ISBN 9783319316949.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010). *Compendio de informacióngeográca municipal 2010, Tzicatlacoyan Puebla*. Org.mx. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21193.pdf
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2015). *Manual de microbiología general* (1.ª ed., pp. 41–43). Río Cuarto, Argentina: UniRío Editora. Río Cuarto, Argentina: UniRío Editora. ISBN 978-987-688-124-1
- Comité l'Antibiogramme de la Société Française, de Microbiologie., "Technical recommendations for in vitro susceptibility testing", Clin Microbiol Infect, Vol. 2, S11, 1996.
- S. National Committee for Clinical Laboratory, "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., Vol. 17(1), 1997.
- Cavalieri, S. J. y American Society for Microbiology. (2009). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano. American Society for Microbiology. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/ susceptibilidad-antimicrobiana-manualpruebas-2005.pdf

- McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument forestimating the numbers of bacteria in suspensions used forcalculating the opsonic index for vaccines. J. Am. Med. Assoc.49:1176-1178.
- Remel (2009). McFarland equivalence turbidity standards. Instruction for use IFU:20410.
- Winn, Jr., W., et al. (2006). Konemann's color atlas and diagnostic text of microbiology, 6th ed., p. 945–1021. Lippencott Williams & Wilkins Publishers, Philadelphia, PA.
- Hudzicki, J. (2009) Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology
- Lapierre, L., Cornejo, J., Asun, A., Vergara, C., & Varela, D. (2020). Laboratory guide: Methodologies for antimicrobial susceptibility testing. Apec.org. https://www.apec.org/docs/default-source/Publications/2020/5/Laboratory-Guide---Methodologies-for-Antimicrobial-Susceptibility-Testing/220_CTI_SCSC_Laboratory-Guide-Methodologies-for-Antimicrobial-Susceptibility-Testing.pdf
- Mbata TI, Debiao L, Saikia A., (2006). "Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea", African Journal of Biotechnology, Vol. 7(19), pp. 1571, 2006.
- Poupard JA, Rittenhouse SF, Walsh LR. (1994). The evolution of antimicrobial susceptibility testing methods. En: Poupard JA, Walsj LR, Kleger B, editores. Antimicrobial susceptibility testing. New York, NY: Plenum Press; 1994. p. 3–14.
- Cantón R. (2010). Interpretive reading of the antibiogram: a clinical necessity. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010 Jun;28(6):375-85. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381926
- Nodarse R. (2013). Lectura interpretada del antibiograma. Rev Cubana Med Mil. 2013 Dic;42(3):502-6. Disponible en: http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572013000400012&lng=es
- Tascini C, Sozio E, Viaggi B, Meini S. (2016). Reading and understanding an antibiogram. Italian Journal of Medicine. 2016;10(4):289-300. Disponible en: http://www.italjmed.org/index.php/ijm/article/view/794
- Senok AC, Botta GA, Soge OO. (2012). Emergence and Spread of Antimicrobial-Resistant Pathogens in an Era of Globalization. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.
- EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Disponible en: http://www. eucast.org/resistance_mechanisms/.
- Shahverdi AR, Rafii F, Tavassoli F, Bagheri M, Attar F, Ghahraman A. (2004): Piperitone from Mentha longifolia var. chorodictya Rech f. reduces the nitrofurantoin resistance of strains of Enterobacteriaceae. Phytother Res 18: 911–914.
- Koch, K., & Ensikat, H. J. (2008). The hydrophobic coatings of plant surfaces; Epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. Micron, http://doi.org/10.1016/j.micron.2007.11.010
- Kashyap, D.; Tuli HS, S. AK. (2016). Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. Life Sci. 2016, 13, 146-201. DOI: http://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.017
- Mallavadhani, U.V.; Mahapatra A, J. K, Reddy PS. (2004). Antimicrobial Activity of some Pentacyclic Triterpenes and Their Synthesized 3-O-Lipophilic Chains. Biol. Pharm. Bull. 2004, 27, 1576-1579. DOI: http://doi.org/10.1248/bpb.27.1576
- Rodríguez, J. A.; Astudillo, L.; Schmeda-Hirschmann, G. (2003). Oleanolic acid promotes healing of acetic-induced chronic gastric lesions in rats. Pharmacol Res. 2003, 48, 291-294. DOI: https://doi.org/10.1016/S1043-6618(03)00155-5
- Vasconcelos L., M. A.; Royo, V. A.; Ferreira, D. S.; Miller-Crotti, A. E.; Andrade-e Silva, M. L.; Carvalho, J. C. et al. (2014). In vivo Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ursolic Acid and Oleanoic Acid from Miconia Albicans (Melastomataceae). Z. Naturforschung C. 2014, 61, 447-482. DOI: https://doi.org/10.1515/znc-2006-7-803.
- Zaletova, N.I., Shchavlinskii, A.N., Tolkachev, O.N. et al. (1986) Preparation of some derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. Chemical Absrracts 106, 18867e
- Porto ICCM, Nascimento TG, Oliveira JMS, Freitas PH, Haimeur A, França R. (2018). Use of polyphenols as a strategy to prevent bond degradation in the dentin–resin interface. Eur J Oral Sci. 2018;126(2):146–58.
- Song, H.-S.; Bhatia, S.K.; Gurav, R.; Choi, T.-R.; Kim, H.J.; Park, Y.-L.; Han, Y.-H.; Park, J.Y.; Lee, S.M.; Park SL. (2020). Naringenin as an antibacterial reagent controlling of biofilm formation and fatty acid metabolism in MRSA. bioRxiv. 2020;340–52
- Céliz G, Daz M, Audisio MC. (2011). Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. J Appl Microbiol. 2011;111(3):731–8.
- Yue J, Yang H. (2018). Influence of naringenin on the biofilm formation of Streptococcus mutans. J Dent. 2018; 76:24–31.
- Rhodes, P.M., & Winskill, N. (1985). Microbiological process for the preparation of 1- carvone. United States Patent No. 4,495,284.

- Davey, P.N., Newman, C.P., Thiam, W.A., & Tse, C.L. (2002). Preparation of carvone. United States Patent No. 6,500,989.
- Carter, O.A., Peters, R.J., & Croteau, R. (2003). Monoterpene biosynthesis pathway construction in Escherichia coli. Phytochemistry 64 (2), 425-433.
- Pergentino de S., D., Ferreira de F.-N., & Nobrega de A., R. (2007). Influence of the chirality of (R)-(-) and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. Chirality 19 (4), 264-268.
- De Carvalho, C.C.R., & Da Fonseca, M.M.R. (2006). Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. Food Chemistry 95 (3), 413-422.
- Tachibana, S., Maegawa, Y., & Nomura, M. (2007). Synthesis and physiological activity of ureas and amides with carvone residues. Journal of Oleo Science 56 (6), 303-307.
- Cho J. (2006). Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. Arch Pharm Res 2006;29:699-706.
- Kumar A, Lalitha S, Mishra J. (2014). Hesperidin potentiates the neuroprotective effects of diazepam and gabapentin against pentylenetetrazole-induced convulsions in mice: Possible behavioral, biochemical and mitochondrial alterations. Indian J Pharmacol 2014;46:309-315
- Hirata, A.; Murakami, Y.; Shoji, M.; Kadoma, Y.; Fujisawa, S. (2005). Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res.* 2005, *25*, 3367–3374.
- Hao, Y.; Wei, Z.; Wang, Z.; Li, G.; Yao, Y.; Dun, B. (2021). Biotransformation of flavonoids improves antimicrobial and anti-breast cancer activities in vitro. *Foods* 2021, *10*, 2367.
- Olas, B. (2021). A review of in vitro studies of the anti-platelet potential of citrus fruit flavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 2021, *150*, 112090.
- Paredes, A.; Aluzuru, M.; Mendez, J.; Rodriguez-Ortega, M. (2003). Anti-sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, *26*, 108–109
- Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients* 2022, *14*, 2387
- J.H. Lee, S.H. Lee, Y.S. Kim, C.S. Jeong, (2009). Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of Poncirus trifoliata on potential gastric disease, Phytother. Res. 12 (2009) 1748–1753.
- J.B. Kim, A.R. Han, E.Y. Park, J.Y. Kim, W. Cho, J. Lee, E.K. Seo, K.T. Lee, (2007). Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NFkappa B inactivation in RAW 264.7 macrophage cells, Biol. Pharm. Bull. 30(2007) 2345–2351.
- M.Y. Ali, S. Jannat, N. Edraki, S. Das, W.K. Chang, H.C. Kim, S.K. Park, M.S. Chang, (2019). Flavanone glycosides inhibit β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 and cholinesterase and reduce Aβ aggregation in the amyloidogenic pathway, Chem. Biol. Interact. 309 (2019) 108707
- E.A. Bae, M.J. Han, D.H. Kim, (1999). In vitro anti-Helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites, Planta Med. 65 (1999) 442–443.
- D.H. Kim, E.A. Bae, M.J. Han, (1999). Anti-Helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from Poncirus trifoliata by human intestinal bacteria, Biol. Pharm. Bull. 22 (1999) 422–4
- Dixon, R.A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.; Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. Molecular Plant Pathology. 3: 371– 390.
- Vogt, T., (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular plant 3, 2-20.
- Radulovic, N.S., Blagojevic, P.D., Stojanovic-Radic, Z.Z., Stojanovic, N.M. (2013). Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. Current Medicinal Chemistry, 20(7): 932–952. doi:10.2174/0929867311320070008
- Horváth, B.; Mukhopadhyay, P.; Kechrid, M., Patel, V.; Tanchian, G., Wink, D. A.; Pacher, J. G. P.; *Free Radical Biol. Med.* 2012,*52*,1325
- Gertsch, J.; Leonti, M.; Raduner, S.; Racz, I.; Chen, J. Z.; Xie, X.Q.; Altmann, K. H.; Karsak, A. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008,*105*,9099.
- Gertsch, J.; *Commun. Integr. Biol.* 2008,*1*,S26.
- Shimizu M (1990). Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants. *Chem Pharm Bull 38*: 2283-2287.
- Keeler RF, Tu AT (1991). Toxicological of Plant and Fungal Compounds; Handbook of Natural Toxins; *Marcel Dekker: Nova York,*c p. 665.
- Zheng GQ, Kenney PM, Lam LKT (1992). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. *Nat Prod 55*: 999-1003
- Kang R, Helms R, Stout MJ, Jaber H, Nakatsu T (1992). Vietnamese culinary herbs in the United States. *J Agric Food Chem 40*: 2328-2332.

- Jacobson M (1990). Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents, *CRC Press: Boca Raton.*
- Duke JA (1992). Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities, *CRC Press: Boca Raton.*
- Zhou, Y.Y., Zhong, B.H., Shi, W.G., (2014). Progress in research of acacetin biologic properties. Chin. J. New Drugs 23 (9), 1053–1056+1080.
- Cha, J.D., Choi, S.M., Park, J.H., (2014). Combination of acacetin with antibiotics against methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from Clinical Specimens. Adv. Biosci. Biotechnol. 5 (4), 398–408.
- Komape, N.P., Aderogba, M., Bagla, V.P., Masoko, P., Eloff, J.N., (2014). Anti-bacterial and anti-oxidant activities of leaf extracts of Combretumvendae (Combretecacea) and the isolation of an anti-bacterial compound. Afr. J. Tradit., Complementary Altern. Med. 11 (5), 73–77.
- Joseph, Ngoupayo, Kasali, F´elicien Mushagalusa, Patrice, Djiele Ngameni, Turibio, Tabopda Kuate, Ali, Muhammad Shaiq, (2015). Anti-microbial of extract and compounds from the bark of Drypetes afzelii (Pax). Hutch J. Pharmacog. Phytochem. 4 (4), 250–255.
- Hernández-Abreu O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. (2009). Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from Agastache mexicana are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. Biochem Pharmacol. 2009 Jul 1;78(1):54-61. doi: 10.1016/j.bcp.2009.03.016
- Hernández-Abreu O, Durán-Gómez L, Best-Brown R, Villalobos-Molina R, Rivera-Leyva J, Estrada-Soto S. (2011).Validated liquid chromatographic method and analysis of content of tilianin on several extracts obtained from Agastache mexicana and its correlation with vasorelaxant effect. J Ethnopharmacol. 2011 Nov 18;138(2):487-91. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.041.
- Knobloch K, Weigand H, Weis N, Schwarm H-M, Vigenschow H. (1986). Action of terpenoids on energy metabolism. In Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils Edited by: Brunke EJ. De Gruyter, Berlin; 1986:429-445.
- Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. J Biol Chem 1994, 269:8022-8028.
- Denyer SP, Hugo WB. (1991). Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In Mechanisms of Action of Chemical Biocides Edited by: Denyer SP, Hugo WB. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford; 1991:171-188.
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* (2013) 6:1451–74. doi:10.3390/ph6121451
- Nikaido H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382–8. doi:10.1126/science.8153625
- Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593–656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003
- Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2474–8. doi:10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005
- Saleem, M.; Saeed, M.T. (2020). Potential application of waste fruit peels (orange, yellow lemon and banana) as wide range natural antimicrobial agent. *J. King Saud Univ. Sci. 32*, 805–810.
- Ou, M.C.; Liu, Y.H.; Sun, Y.W.; Chan, C.F. (2015). The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. 2015*, 804091
- Diep, T.T.; Yoo, M.J.Y.; Pook, C.; Sadooghy-Saraby, S.; Gite, A.; Rush, E. (2021). Volatile Components and Preliminary Antibacterial Activity of Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). *Foods* 2021,*10*, 2212.
- Mandalari, G.; Bennett, R.N.; Bisignano, G.; Trombetta, D.; Saija, A.; Faulds, C.B.; Gasson, M.J.; Narbad, (2007). A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *J. Appl. Microbiol.* 2007, *103*, 2056–2064.
- Al-Saman, M.A.; Abdella, A.; Mazrou, K.E.; Tayel, A.A.; Irmak, S. (2019). Antimicrobial and antioxidant activities of different extracts of the peel of kumquat (*Citrus japonica* Thunb). *J. Food Meas. Charact.* 2019, *13*, 3221–3229.
- Bora, H.; Kamle, M.; Mahato, D.K.; Tiwari, P.; Kumar, P. (2020). Citrus Essential Oils (CEOs) and Their Applications in Food: An Overview. *Plants* 2020, *9*, 357
- Plesiat, P.; Nikaido, H. (1992). Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* 1992, *6*, 1323–1333.
- Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA. (2013). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. Crit Rev Microbiol 2013; 40(1): 76-94.

- Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 1995; 59(2): 201-2.
- Van de Vel, E.; Sampers, I.; Raes, K. (2019). A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019, *59*, 357–378.
- Phan, A.D.T.; Chaliha, M.; Sultanbawa, Y.; Netzel, M.E. (2019). Nutritional characteristics and antimicrobial activity of Australian grown feijoa (*Acca sellowiana*). *Foods* 2019, *8*, 376
- Zhang, Y.; Liu, X.; Wang, Y.; Jiang, P.; Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* 2016, *59*, 282–289
- Wang, X.; Shen, Y.; Thakur, K.; Han, J.; Zhang, J.G.; Hu, F.; Wei, Z.J. (2020). Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 2020, *25*, 3955
- Saha DR, Guin S, Krishnan R, Nag D, Koley H, Shinoda S, Ramamurthy T. (2013). Inflammatory diarrhea due to enteroaggregative Escherichia coli: evidence from clinical and mice model studies. Gut Pathog. 2013;5:36
- Kotloff K, Nataro J, Blackwelder W, Nasrin D, Farag T, Panchalingam S, et al. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. Lancet. 2013;382:209-222.
- Platts-Mills JA, Babji S, Bodhidatta L, Gratz J, Haque R, Havt A, et al. (2015). Pathogen-specific burdens of community diarrhoea in developing countries: a multisite birth cohort study (MAL-ED). Lancet Glob Health. 2015; 3:e564-e575.
- Hosangadi D, Smith PG, Kaslow DC, Giersing BK, WHO ETEC & Shigella Vaccine Consultation Expert Group. WHO consultation on ETEC and Shigella burden of disease, Geneva, 6-7th April 2017: Meeting report. Vaccine. 2018;pii: S0264.
- Bolick DT, Medeiros P, Ledwaba SE, Lima AA, Nataro JP, Barry EM, et al. (2018). Critical role of zinc in a new murine model of enterotoxigenic Escherichia coli diarrhea. Infect Immun. 2018;86:e00183
- Petchiappan, A., & Chatterji, D. (2017). *Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega, 2(10), 7400–7409.* doi:10.1021/acsomega.7b01368
- Alvarado AM., García-Trejo F., Cardador-Martínez A., Magallán-Hernández F. (2020). Clinopodium mexicanum: potential and difficulties for the sustainable use of a Mexican medicinal plant. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 19 (2): 149 – 160.
- Palma-Tenango, M.; Sánchez-Fernández, R.E.; Soto-Hernández, M. A (2021). Systematic Approach to Agastache mexicana Research: Biology, Agronomy, Phytochemistry, and Bioactivity. Molecules 2021, 26, 3751. https:// doi.org/10.3390/molecules26123751