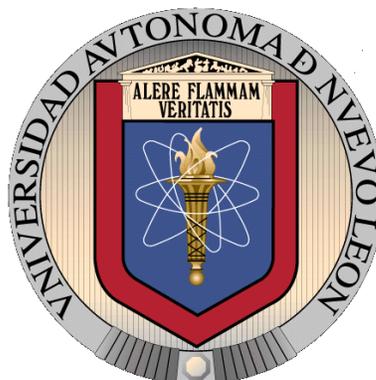


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS
MAYORITARIOS DE *Hedeoma drummondii* SOBRE CRECIMIENTO DE
Mycobacterium tuberculosis Y MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.

POR

CARLOS PEDRAZA RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS
BIÓTICOS

2023

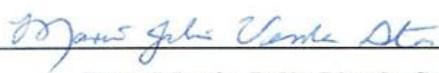
**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS
MAYORITARIOS DE *Hedeoma drummondii* SOBRE CRECIMIENTO DE
Mycobacterium tuberculosis Y MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.**

Comité de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Presidente

Dra. Carmen Amelia Molina Torres
Secretaria



Dra. María Julia Verde Star
Vocal



Dra. Catalina Rivas Morales
Vocal

Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo
Subdirectora de Posgrado



**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS Y COMPUESTOS
MAYORITARIOS DE *Hedeoma drummondii* SOBRE CRECIMIENTO DE
Mycobacterium tuberculosis Y MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS.**

Dirección de Tesis



Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Director

Dra. Carmen Amelia Molina Torres
Directora externa

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL 288-CS-2022.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer principalmente al Dr. José Ezequiel Viveros Valdez y a la Dra. Carmen Amelia Molina Torres por haberme dado la oportunidad de ser parte de este proyecto y brindarme de su constante apoyo, confianza y enseñanza a lo largo de la Maestría.

A mi comité de tesis, Dra. María Julia Verde Star, Dra. Catalina Rivas Morales, Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández por sus consejos para la mejora de mi investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (791651) por el apoyo económico otorgado, así como a PAICYT, UANL (288-CS-2022) por su ayuda para financiar este proyecto.

Al laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas y al Laboratorio de Dermatología del Hospital Universitario José E. González, por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mis queridos amigos de laboratorio: Airam Regalado, Alejandro Ruiz, Andrés Flores, Dariela Riojas, Dany Garza, Mayra Cantú, gracias por haberme recibido con los brazos abiertos y haber estado dispuestos a ayudarme, me siento afortunado de haberlos conocido y siempre recordaré todos los momentos que compartí con ustedes, me llevo gran aprendizaje de todos; así como Anabel Gallardo y Carlos Paz por sus sugerencias y compartirme de sus conocimientos para mejorar mis procedimientos.

A mi compañera de generación Alexa Peña, gracias por ser una gran amiga y por tu ayuda a lo largo de los semestres.

A mi mamá y mi papá, gracias por siempre estar presentes para aconsejarme y darme los ánimos para seguir adelante, les agradezco por estar dispuestos a escucharme en mis momentos de frustración y compartir mis logros con ustedes, los quiero mucho.

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mi mamá, papá y hermanos, por darme de su fuerza y apoyo incondicional.

A todos mis amigos que me acompañaron durante mis estudios.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	III
1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Género <i>Mycobacterium</i>	5
3.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
3.1.2 Micobacterias no tuberculosas.....	6
3.1.2.1 <i>Mycobacterium abscessus</i>	7
3.1.2.2 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	7
3.1.2.3 <i>Mycobacterium intracellulare</i>	7
3.1.2.4 <i>Mycobacterium gordonae</i>	8
3.2 Importancia de las plantas medicinales.....	8
3.2.1 Fitofármacos.....	9
3.2.2 Marcadores químicos.....	10
3.2.3 Efecto antimicobacteriano.....	11
3.3 Familia Lamiaceae.....	11
3.3.1 <i>Hedeoma drummondii</i>	12
3.3.2 Compuestos Mayoritarios en <i>Hedeoma drummondii</i>	14
3.3.2.1 Pulegona.....	14
3.3.2.2 Ácido rosmarínico.....	14
3.3.2.3 Ácido cafeico.....	15
4. JUSTIFICACIÓN.....	17
5. HIPÓTESIS.....	18
6. OBJETIVO GENERAL.....	18
6.1 Objetivos específicos.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1 Obtención de material vegetal.....	19
7.1.2 Preparación de soluciones stock.....	19

7.2 Cromatografía capa fina.....	19
7.3 Cepas micobacterianas y condiciones de cultivo	20
7.3.1 Ajuste de la suspensión bacteriana.....	20
7.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	20
8. RESULTADOS.....	23
8.1 Análisis cromatográfico	23
8.2 Determinación de la CMI en <i>M. tuberculosis</i>	25
8.3 Determinación de la CMI en MNT	26
8.4 Correlación Pearson.....	27
9. DISCUSIÓN	29
10. CONCLUSIONES.....	33
11. PERSPECTIVAS	34
12. BIBLIOGRAFÍA.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No	Título	Página
1	Actividad antimicobacteriana en los extractos y compuestos mayoritarios de <i>H. drummondii</i> frente a <i>M. tuberculosis</i> .	25
2	Actividad antimicobacteriana en los extractos y compuestos mayoritarios de <i>H. drummondii</i> frente a MNT.	27
3	Correlación de Pearson entre la actividad antimicobacteriana de los extractos y compuestos mayoritarios de <i>H. drummondii</i> frente a <i>M. tuberculosis</i> .	28
4	Correlación de Pearson entre la actividad antimicobacteriana de los extractos y compuestos mayoritarios de <i>H. drummondii</i> frente a MNT.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No	Título	Página
1	<i>Hedeoma drummondii</i>	13
2	Pulegona	14
3	Ácido rosmarínico	15
4	Ácido cafeico	16
6	Cromatografía en capa fina de extracto hexánico de <i>H. drummondii</i> . A: Extracto hexánico; B: Pulegona Revelador: Ácido sulfúrico 0.5%.	23
7	Cromatografía en capa fina de extracto hexánico de <i>H. drummondii</i> . A: Extracto hexánico; B: Pulegona Revelador: Yodo sublimado	23
8	Cromatografía en capa fina de extracto metanólico de <i>H. drummondii</i> . A: Extracto metanólico; B: Ácido rosmarínico; C: Ácido cafeico Revelador: Yodo sublimado.	24
9	Cromatografía en capa fina de extracto metanólico de <i>H. drummondii</i> . A: Extracto metanólico; B: Ácido rosmarínico; C: Ácido cafeico Revelador: DPPH	24
10	CMI 125 µg/mL de pulegona frente a la cepa 428-98 de <i>M. tuberculosis</i> en microplaca con Azul Alamar.	26
11	CMI >500 µg/mL de ácido rosmarínico frente a la cepa 41-99 de <i>M. tuberculosis</i> en microplaca con Azul Alamar.	26
12	CMI 312.5 µg/mL del extracto metanólico frente a la cepa MLIID1 de <i>M. fortuitum</i> en microplaca.	27
13	CMI 39.06 µg/mL del extracto hexánico frente a la cepa LMMP de <i>M. abscessus</i> en microplaca.	27

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ATCC	Cepa de referencia certificada (American Type Culture Collection)
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d	Día
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramo
h	Hora
m	Metro
mg	Miligramo
MNT	Micobacterias no tuberculosas
OMS	Organización Mundial de la Salud
Rf	Factor de retención
TB	Tuberculosis
UFC	Unidad formadora de colonias
µg	Microgramos
µL	Microlitro

1. RESUMEN

La tuberculosis (TB) permanece como un importante problema de salud a nivel mundial presentando 133 casos por cada 100,000 habitantes, donde el surgimiento de cepas multirresistentes a fármacos de primera línea se ha convertido en el mayor obstáculo para su tratamiento. Por otro lado, la incidencia de las micobacterias no tuberculosas (MNT) en humanos se ha incrementado notablemente en los últimos años. La búsqueda de nuevos y mejores tratamientos para combatir las infecciones micobacterianas es una constante global por lo que en este trabajo nos propusimos investigar el efecto de los extractos y compuestos mayoritarios de *Hedeoma drummondii* contra aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y las micobacterias no tuberculosas: *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*, esto con miras a establecer marcadores de la bioactividad, lo que permitiría el desarrollo de fitomedicamentos antimicobacterianos. Para determinar la actividad antimicobacteriana se utilizó el ensayo de microdilución para establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las diferentes cepas de *Mycobacterium*. El extracto metanólico presentó la mejor actividad frente a *M. tuberculosis*, inhibiendo diez de las doce cepas analizadas con CMI de 19.53 µg/mL contra las cepas 168-99 y 142-99, mientras que el ácido rosmarínico y cafeico mostraron CMI de 125 µg/mL para las cepas 434-98, 168-99, 142-99 y 376-98; el extracto hexánico presentó la mejor actividad contra las micobacterias no tuberculosas (MNT) al inhibir ocho de las diez cepas estudiadas, siendo la más sensible *M. abscessus* LMMP con un CMI de 39.06 µg/mL y la pulegona obtuvo valores de 15.625 µg/mL para *M. abscessus* 139-10 y *M. abscessus* LMMP, así como 31.25 µg/mL para *M. gordonae* A702. Con la finalidad de encontrar posibles marcadores con actividad antituberculosa se utilizó la correlación de Pearson entre las CMI obtenidas, presentando una correlación fuerte entre el extracto hexánico con la pulegona ($r=0.53$) en las cepas de MNT. En conclusión, los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* presentan actividad antimicobacteriana, así mismo existe una correlación positiva fuerte entre la actividad antimicobacteriana de la pulegona y el extracto hexánico contra cepas no tuberculosas, por lo que este compuesto podría servir como marcador de predictibilidad contra este tipo de microorganismos.

1. ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains as a major health problem worldwide, presenting 133 cases per 100,000 inhabitants, where the emergence of multi-resistant strains to first-line drugs has become the biggest obstacle to its treatment. On the other hand, the incidence of non-tuberculous mycobacteria (NTM) in humans has increased remarkably in recent years. The search for new and better treatments against mycobacterial infections is a constant at a global level, hence, in this work we propose to investigate the antimycobacterial effect of the extracts and major compounds of *Hedeoma drummondii* against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria: *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* and *M. gordonae*, this with a view to establishing bioactivity markers, which would allow the development of antimycobacterial phytomedicines. To determine the antimycobacterial activity, the microdilution assay was used to establish the minimum inhibitory concentration (MIC) of the different strains of *Mycobacterium*. The methanolic extract presented the best activity against *M. tuberculosis*, inhibiting ten of the twelve strains analyzed with MIC of 19.53 µg/mL against strains 168-99 and 142-99, while rosmarinic and caffeic acid showed MIC of 125 µg /mL for strains 434-98, 168-99, 142-99 and 376-98; the hexanic extract presented the best activity against non-tuberculous mycobacteria (NTM) by inhibiting eight of the ten strains studied, being *M. abscessus* LMMP the most sensitive with a MIC of 39.06 µg/mL and pulegone obtained values of 15.625 µg /mL for *M. abscessus* 139-10 and *M. abscessus* LMMP, as well as 31.25 µg/mL for *M. gordonae* A702. In order to find possible markers with antituberculous activity, Pearson's correlation was used between the MICs obtained, showing a correlation between the hexanic extract and pulegone ($r=0.53$) in the MNT strains. In conclusion, the majority of *H. drummondii* extracts and compounds present antimycobacterial activity, in addition, there is a strong positive correlation between the antimycobacterial activity of pulegone and the hexanic extract against non-tuberculous strains, so this compound could serve as a predictability marker against this type of microorganisms.

2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad pulmonar infecciosa y mortal causada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual ha estado amenazando a la humanidad por años y permanece como un importante problema de salud a nivel mundial (Abbas y Baker 2020). Según el reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su informe global sobre la tuberculosis 2018, en el 2017 se tiene estimado 10 millones de nuevos casos de TB, equivalente a 133 casos por cada 100,000 habitantes (Baptista et al. 2021). El surgimiento de TB multirresistente se debe principalmente al uso inadecuado de fármacos antituberculosos de primera línea, el incremento de la prevalencia de dichas cepas se ha convertido en un obstáculo importante en el tratamiento de TB y una carga financiera en el sector salud (Bermejo et al. 2007). Como resultado, existe una necesidad urgente de nuevos medicamentos antituberculosos rentables con diferentes mecanismos de acción y menos oportunidad de desarrollar resistencia (Mazlun et al. 2019).

Por otro lado, las micobacterias no tuberculosas (MNT) se encuentran presentes en una gran diversidad de superficies y su incidencia en humanos está aumentando significativamente a nivel mundial (To et al. 2020). Cabe mencionar que el progreso para tratar este tipo de micobacterias ha sido lento debido al alto número de especies de MNT y a sus similitudes clínicas, así como a la poca susceptibilidad frente a los antibióticos disponibles, lo que dificulta el correcto diagnóstico y posterior tratamiento (Loddenkemper et al. 2016). Uno de los desafíos más importantes al escoger un tratamiento eficiente frente a las MNT ha sido la falta de correlación entre los patrones de susceptibilidad *in vitro* y la respuesta clínica (Griffith et al. 2007). En la mayoría de las especies no tuberculosas, no existen recomendaciones de tratamiento basadas en evidencia, por lo que los médicos deben tomar decisiones específicas para cada caso por separado. Por esto es urgente encontrar una nueva estrategia para combatir las infecciones micobacterianas (Bento et al. 2020).

Debido a la resistencia presente en las micobacterias, hace años se ha realizado una búsqueda sistemática de compuestos capaces de hacer frente a este grupo de microorganismos; ocupando los productos naturales un papel importante en esta búsqueda, muchos de estos esfuerzos están encaminados al estudio de plantas

medicinales, ya que estas son utilizadas de manera empírica para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las respiratorias (Zambrano-Intriago et al. 2015). La investigación y estandarización de plantas medicinales ha contribuido al desarrollo de fitofármacos, los cuales en la mayoría han resultado ser de bajo costo y con poca toxicidad (Gallegos 2016).

Con relación a lo anterior, en la región noreste de México se han reportado 234 especies de plantas medicinales utilizadas para curar enfermedades respiratorias; destacando la familia de las Lamiaceae con 12 menciones (Macouzet et al. 2013).

Dentro de esta familia aromática, se encuentra *H. drummondii*; ya se ha reportado que sus extractos poseen actividad antibacteriana, sobre todo los de baja polaridad (Tovar 2007, Viveros -Valdez et al. 2011). En este extracto destaca el alto contenido del monoterpeno pulegona, mientras que en los polares se han reportado a los ácidos rosmarínico y cafeico como los compuestos mayoritarios bioactivos (Viveros-Valdez et al. 2008, 2010, 2011).

En el presente trabajo se plantea determinar el efecto antimicobacteriano de los extractos y compuestos mayoritarios de *Hedeoma drummondii* contra aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y de las micobacterias no tuberculosas *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. goodnae*.

3. ANTECEDENTES

3.1 Género *Mycobacterium*

Dentro de las características generales de los microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium* se tiene que son bacilos delgados, aerobios obligados, no presentan motilidad ni formación de esporas además de ser acidorresistentes (Pfyffer 2011).

La estructura de su pared celular está conformada por peptidoglucano, donde se adhieren polisacáridos de cadena ramificada, proteínas y lípidos, a lo largo de su pared celular se encuentran porinas y otras proteínas (Trejo-Márquez et al. 2003). De gran importancia es la presencia de ácidos grasos de cadena larga llamados ácidos micólicos y lipoarabinomanano (LAM), un complejo lípido-polisacárido que se extiende de la membrana plasmática a la superficie, esto otorga una pared celular con un contenido elevado de lípidos que abarca más del 60% de la masa total de su pared celular (Ryan 2017). La estructura de su pared otorga propiedades hidrofóbicas causando una baja permeabilidad, esto se ha asociado a la presencia de resistencia intrínseca a los procesos de desinfección, así como a los antibióticos. La carga, tamaño e hidrofobicidad de los antibióticos son los determinantes de la penetración a través de la membrana celular (Mata et al. 2016).

3.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es el microorganismo más importante del género *Mycobacterium* al ser el agente causante de la tuberculosis (TB), una de las principales enfermedades infecciosas en el mundo que anualmente origina alrededor de 10 millones de nuevos enfermos y 1.5 millones de decesos (Garza-Velasco et al. 2017).

La TB se transmite a través de aerosoles orales y nasales provenientes de una persona infectada, siendo las gotas de menor tamaño inhaladas con mayor eficacia por su fácil acceso a las vías respiratorias y por su facilidad para permanecer por mayores periodos de tiempo en el aire; la transmisión puede ser también indirecta ya que son resistentes a

la desecación y se puede encontrar en el polvo o en los objetos de uso diario (Morán López y Lazo Amador 2001).

Durante su reproducción son capaces de originar, mediante mutaciones aleatorias, variaciones resistentes a los fármacos administrados en el paciente enfermo; se estima que en el 2014 hubo 480,000 casos de TB con resistencia a múltiples fármacos, específicamente frente a isoniazida y rifampicina, que por mucho tiempo resultaron ser los más eficaces para el tratamiento de pacientes infectados (Garza-Velasco et al. 2017).

Se sabe que hasta la fecha un 3.4% de los nuevos casos de TB presentan multirresistencia a los fármacos actualmente empleados, lo que ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, donde las plantas proveen una gran cantidad de principios activos aún sin estudiar (OMS 2020).

3.1.2 Micobacterias no tuberculosas

Las MNT son especies que forma parte del género *Mycobacterium*, pero fuera del complejo *M. tuberculosis* o fuera de la especie *M. leprae*. Actualmente se encuentran descritas alrededor de 190 especies, clasificándose en dos grupos: lento y rápido crecimiento, de acuerdo con el tiempo requerido para formar colonias visibles en medio sólido (mayor o menor a 7 días respectivamente). Las especies más relevantes de MNT causantes de enfermedad en humanos son las especies de lento crecimiento dentro del complejo *M. avium*, *M. kansasii* y *M. xenopi*; mientras que las más importantes de rápido crecimiento son las del complejo *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum* (Bento et al. 2020).

Las MNT tienen la característica de ser patógenos oportunistas donde su reservorio principal es en el medio ambiente como sería el caso del agua, suelo o aire contaminado. Su mecanismo de transmisión es mediante la vía aérea o cutánea mientras que el ser humano tiene un papel poco relevante como transmisor de las MNT (Rodríguez 2006).

Las formas clínicas en las que se pueden manifestar las MNT son las enfermedades pulmonares (forma más común), infecciones en la piel y tejidos blandos, enfermedades linfáticas y enfermedad diseminada (Valdés y Cid 2004).

Otro factor importante es el mal diagnóstico de las infecciones por MNT que ocurre en los países en desarrollo, donde la incidencia de TB es alta y los diagnósticos no suelen distinguir entre MNT y TB. Como resultado, un número significativo de infecciones por MNT se clasifican como TB y en consecuencia los pacientes reciben terapia anti-TB que no es tan efectiva frente a las MNT (Bento et al. 2020).

3.1.2.1 *Mycobacterium abscessus*

Dentro de las micobacterias de rápido crecimiento es responsable del 65 al 80% de las enfermedades pulmonares, siendo la especie normalmente asociada a este padecimiento en Estados Unidos; además es responsable de infecciones en tejidos blandos e infección diseminada en pacientes inmunodeprimidos (Jeon et al. 2009). Debido a su resistencia adquirida frente a varios antibióticos, no se tiene establecido un tratamiento específico para la enfermedad pulmonar originada por esta especie (León-Landa y Aguillón-García 2017).

3.1.2.2 *Mycobacterium fortuitum*

Pertenece a las micobacterias de rápido crecimiento y se encuentra relacionada con infecciones en implantes de prótesis, además de ser capaces de resistir a los desinfectantes clorados, por lo que se favorece su presencia en los ambientes hospitalarios (Pastor et al. 2006).

Los factores de riesgo relacionados a su patología respiratoria sería la fibrosis quística, bronquiectasias y presentar antecedentes de infecciones previas por otras micobacterias; para las infecciones cutáneas sus factores de riesgo serían presentar antecedentes de traumatismos o haber tenido una cirugía previa (Corti et al. 1999).

3.1.2.3 *Mycobacterium intracellulare*

Forma parte del complejo *Mycobacterium avium* (MAC) y es de lento crecimiento, se encuentra en el segundo lugar después de *M. tuberculosis* en importancia y frecuencia de las enfermedades que causan en países desarrollados, donde los casos en humanos son

cada vez más prominentes (Ryan 2017). Es capaz de causar una enfermedad pulmonar progresiva que conlleva a insuficiencia respiratoria e incluso a la muerte en pacientes originalmente sanos, mientras que la enfermedad diseminada se presenta en pacientes inmunocomprometidos (Saldías et al. 2013).

3.1.2.4 *Mycobacterium gordonae*

Se encuentra dentro de las micobacterias no tuberculosas de lento crecimiento, se encuentra comúnmente en el agua y suelo a pesar de que se suele considerar como un contaminante. *M. gordonae* ha sido capaz de causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos (García-García et al. 2005) principalmente, infecciones pulmonares, infecciones en piel y tejidos blandos además de infección diseminada (Chang et al. 2021).

3.2 Importancia de las plantas medicinales

Las plantas medicinales hacen referencia a todas aquellas que contienen principios activos, que, al ser administrados en una dosis suficiente, son capaces de curar dolencias en las personas. Se estima que de las 260,000 especies de plantas que se conocen actualmente el 10% contienen propiedades medicinales de acuerdo a tratados médicos de fitoterapia actuales (Pérez 2008).

La medicina tradicional se ha llegado a implementar en niveles internacionales con un incremento en su importancia económica. En los últimos años el uso de productos naturales con fines terapéuticos ha llegado a alcanzar hasta aproximadamente el 80% de la población en los países en vías de desarrollo (Ramírez-Hernández et al. 2013). Actualmente los organismos mundiales recomiendan y promueven el uso de productos naturales con fines medicinales (Torres-Chatí et al. 2017).

En el caso de los países en desarrollo el uso de la medicina tradicional puede llegar a ser la única manera de alcanzar tratamientos accesibles y de bajo costo, un ejemplo es el caso de Uganda que se encuentra con una proporción 1:200 de personas practicando la

medicina tradicional mientras que la disponibilidad de médicos se encuentra en 1:20,000 (Bussman y Sharon 2015). En otros casos como en China, donde se encuentra disponible medicina occidental, una gran parte de la población sigue practicando el uso de la medicina tradicional (Álvarez-Monjarás 2014).

Actualmente existe un mayor interés en la búsqueda de tratamientos naturales debido a la aparición de patógenos con nuevos mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos convencionales (Rodríguez-Sauceda 2011), provocando que varios medicamentos utilizados actualmente se vuelvan ineficaces para prevenir o tratar infecciones; provocando además problemas económicos y efectos adversos en los pacientes como sería la hepatotoxicidad por la necesidad de aumentar las dosis efectivas o realizar tratamientos multifármacos (Torres-Chatí et al. 2017).

3.2.1 Fitofármacos

La OMS, define a los fitofármacos como un producto medicinal acabado y etiquetado, que es elaborado mediante procesos como extracción, fraccionamiento o purificación a partir de las partes aéreas o subterráneas de plantas u otros materiales vegetales, su elaboración requiere conocer los metabolitos secundarios responsables de su bioactividad, esto con el objetivo de garantizar una adecuada y correcta estandarización del mismo y así mantener la actividad farmacológica (Chateauneuf y Benavides 2015).

En la actualidad, los fitofármacos se utilizan en todas partes del mundo para tratar dolencias y lograr satisfacer las necesidades sanitarias. Las cifras del porcentaje de población que ha utilizado al menos una vez los fitofármacos en algunos países desarrollados son: 48% en Australia, 70% en Canadá, 42% en EE UU, 38% en Bélgica y 75% en Francia (Guzmán y Rivera 2014).

Otro aspecto fundamental en el desarrollo de un fitofármaco es el aseguramiento de la calidad en su efecto farmacológico, así como la presencia uniforme de las sustancias bioactivas que contienen, esto se logra a través de la estandarización (Romero y Tortoriello 2007); en un producto estandarizado se facilita establecer las dosis necesarias

y se disminuye la aparición de efectos adversos al presentar uniformidad en contenido y sustancias activas, esto se logra a través del uso de marcadores (Avello y Cisternas 2010).

3.2.2 Marcadores químicos

Los marcadores químicos son constituyentes de interés con la finalidad de control de calidad en un preparado vegetal o fitomedicamento, su función es calcular la cantidad de preparado vegetal en un producto final una vez que el marcador haya sido determinado cuantitativamente (Hernández et al. 2017).

En el caso de los marcadores químicos, se definen por ser formados a partir de metabolitos primarios y secundarios provenientes de una planta medicinal, idealmente los marcadores químicos deberían ser componentes únicos que contribuyen al efecto terapéutico de la planta (Singh 2018). Entre las utilidades de los marcadores químicos está la evaluación de la calidad en las plantas medicinales, dicha calidad puede ser afectada por un número de factores como sería los cambios de temporada, tiempo de cosecha, sitio de cultivo, proceso de cosecha, procedimientos de extracción y preparación; de manera que la presencia de una cantidad conocida de un biomarcador previamente estandarizado servirá para monitorear la pureza de los compuestos durante la metodología para su obtención (Li et al. 2008).

El uso de marcadores a partir de compuestos químicos poco comunes en el reino de las plantas puede ser útil para la confirmación de identidad, de forma que la detección de estos marcadores en producto vegetal crudo sirve para confirmar la identidad de un material vegetal, aunque los marcadores por si solos no puedan identificar un material vegetal con seguridad absoluta, servirán para reducir el riesgo de confusiones al momento de cosechar y procesar la planta (Eisner 2001). Además, los marcadores químicos en una planta medicinal pueden ser útiles para factores de control de calidad, como sería identificar la presencia de adulterantes, la determinación del mejor tiempo de cosecha, confirmación del sitio de colecta, evaluación de los métodos de procesamiento, o la evaluación de los métodos de procesamiento (Li et al. 2008).

3.2.3 Efecto antimicobacteriano

El aumento de las enfermedades de origen bacteriano, fúngico y viral en años recientes proviene de la resistencia adquirida por las cepas frente a los medicamentos empleados comúnmente. Este panorama ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos, de manera que las plantas asisten al proveer una gran cantidad de principios activos que siguen sin ser estudiados (Vivot et al. 2012).

Hoy en día, el uso indiscriminado de los antibióticos tiene relación directa con el surgimiento de microorganismos que presentan resistencia a los tratamientos utilizados actualmente, por lo que se requiere buscar nuevos compuestos químicos capaces de ser efectivos frente a los microorganismos y sus mecanismos de resistencia.

Por esta razón las plantas medicinales representan una fuente alternativa para encontrar este tipo de compuestos, se conoce que cerca de 1340 especies de plantas presentan posible actividad frente a microorganismos de un número aproximado de 25000 especies a nivel mundial (Suárez et al. 2011).

Un caso importante son las micobacterias ya que su pared celular presenta un factor importante que favorece sus mecanismos de resistencia, su estructura está conformada por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos; esta conformación les brinda características hidrofóbicas, otorgando baja permeabilidad frente a los antibióticos (Mata et al. 2016). El uso de compuestos no polares obtenidos de las plantas medicinales presenta una mayor probabilidad para penetrar la membrana micobacteriana al ser altamente lipofílica (Quezada-Lázaro et al. 2016).

3.3 Familia Lamiaceae

En México se encuentra una abundante variedad de especies vegetales, con aproximaciones entre 22,800 y 22,350 especies, representando el 10% de la flora mundial (Vega-Avila et al. 2009). De acuerdo a estudios botánicos realizados en la región noreste del país se han reportado 234 especies de plantas medicinales empleadas para tratar enfermedades respiratorias, así como malestares estomacales; encontrándose la familia Lamiaceae entre los mayores números de diversidad al tener 12 especies con propiedades

medicinales (Macouzet et al. 2013). Dicha familia se encuentra en el sexto lugar por su riqueza de vegetación a nivel mundial, una de las familias con mayor abundancia de especies en México (Martínez-Gordillo et al. 2017).

El 80% de especies en la familia Lamiaceae han tenido uso en la medicina tradicional a lo largo de los años, la mayoría de especies pertenecientes a esta familia son fuentes ricas en terpenoides, flavonoides y ácidos fenólicos como sería el caso del ácido rosmarínico, clorogénico y ácido cafeico, entre otros compuestos fenólicos (Sytar et al. 2015).

3.3.1 *Hedeoma drummondii*

Sinónimos: *Hedeoma campora*, *Hedeoma ciliata*, *Hedeoma longiflora*, *Hedeoma ovata*.

Nombre común: Poleo.

Clasificación botánica:

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Hedeoma*

Especie: *Hedeoma drummondii* Benth

Es una hierba perenne que mide de 10 a 30 cm de altura, proviene de un cáudice leñoso y su tallo se encuentra ampliamente ramificado, además de ser pubescente con pelos recurvados. Las hojas son opuestas y sésiles, con forma lineal a estrechamente elíptica, miden de 1-2 cm de largo y 1-4 mm de ancho con márgenes enteros y la superficie presenta glándulas puntiformes y pelos recurvados. Las flores son de color morado claro, con 1-6 flores en la mayoría de las axilas de las hojas, cada flor se encuentra en su propio tallo que mide 2-3 mm que emerge directamente de la axila de la hoja. Su fruto son 4

nueces lisas y oblongas que miden 1-2 mm de largo, además de ser cerosas (figura 1) (Irving 1970). Su distribución es endémica de Norteamérica (Viveros-Valdez 2009).



Figura 1.- *Hedeoma drummondii*

Existen reportes de su uso comestible y medicinal para curar problemas digestivos, su consumo en forma de té es útil para tratar la tos, además, los nativos americanos la utilizan como condimento en sopas para el tratamiento de resfriados (Zamora-Hierro et al. 2013).

Viveros-Valdez y colaboradores (2011) realizaron ensayos de actividad antimicrobiana a partir del extracto hexánico de *H. drummondii* presentando resultados favorables para inhibir *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Asimismo, Viveros-Valdez (2009) analizó la fracción aromática de *H. drummondii* mediante la técnica de cromatografía de gases/espectrometría de masas, detectando monoterpenos como la pulegona que ha mostrado actividad antimicrobiana. Por otro lado, se reportó una fuerte actividad antirradical y antiproliferativa relacionada con su contenido de ácidos fenólicos como sería el ácido rosmarínico y ácido cafeico.

La importancia del estudio de ácido rosmarínico y ácido cafeico radica en que son parte de los compuestos mayoritarios presentes en las especies de la familia Lamiaceae, incluyendo a *H. drummondii* (Sik et al. 2019), mientras que la pulegona es de los monoterpenos mayoritarios en *H. drummondii* sin importar la estación del año y factores ambientales predominantes durante su colecta (Firmage 1981). Por lo que analizar el efecto antimicobacteriano de estos compuestos permitiría determinar su uso como

marcadores químicos de predictibilidad de actividad terapéutica y con ello la posibilidad de elaborar fitofármacos a partir de *H. drummondii*.

3.3.2 Compuestos Mayoritarios en *Hedeoma drummondii*

3.3.2.1 Pulegona

Es un monoterpene cetónico ($C_6H_{16}O$) insaturado presente en las hojas y florescencias de varios miembros de la familia Lamiaceae (figura 2). Es incoloro y presenta un olor agradable similar a la menta, además de ser insoluble en el agua y soluble en hexano (Hayes et al. 2007). Aunado a su producción natural, la pulegona también puede ser obtenida mediante síntesis química a través de una ciclación de citronelol en condiciones oxidativas: se realiza el tratamiento de citronelol con clorocromato de piridinio en cloruro de metileno seco produce isopulegona en un paso; el tratamiento básico de isopulegona con hidróxido de sodio etanólico obtiene pulegona con un rendimiento del 70% (Božović y Ragno 2017). Además, la hidrogenación de la pulegona obtiene mentona e isomentona, produciendo los siguientes alcoholes diastereoisómeros: neomentol, mentol, neoisomentol e isomentol (Vetere et al. 2002).

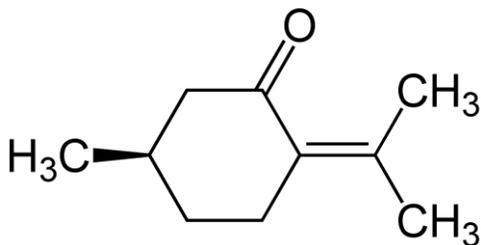


Figura 2.- Pulegona

3.3.2.2 Ácido rosmarínico

Pertenece a los ácidos fenólicos y es un éster del ácido cafeico y el ácido 3,4-dihidroxifeniláctico ($C_{18}H_{16}O_8$) (figura 3), soluble en metanol; el inicio de la ruta biosintética consiste en la desaminación de L-fenilalanina a ácido t-cinámico a través de

la enzima fenilalanina amoni-liasa, después, se añade un hidróxido en la posición 4 mediante la enzima citocromo P450 monohidroxigenasa cinamato 4-hidroxilasa para formar el ácido 4-cumárico, activado por la coenzima A ligasa, dando el ácido 4-cumarol-CoA. Además, se requiere la transaminación de la tirosina con 2-oxoglutarato para dar ácido 4-hidroxifenilpirúvico por la enzima tirosina aminotransferasa. Este último compuesto se reduce al ácido 4-hidroxifenil-lactato que puede formar, junto con el ácido 4-cumarol-CoA proveniente de la fenilalanina, el ácido rosmarínico gracias a la enzima ácido rosmarínico sintasa (Soliz 2014), presenta además un gran potencial terapéutico por sus propiedades biológicas como antioxidante, antiinflamatorio, cardioprotección, antidiabético, entre otros (Gonçalves et al. 2020). Abedini y colaboradores (2013) reportan el uso del ácido rosmarínico para inhibición de microorganismos presentando una CMI efectiva para *Mycobacterium smegmatis* con una concentración de 1200 µg/mL.

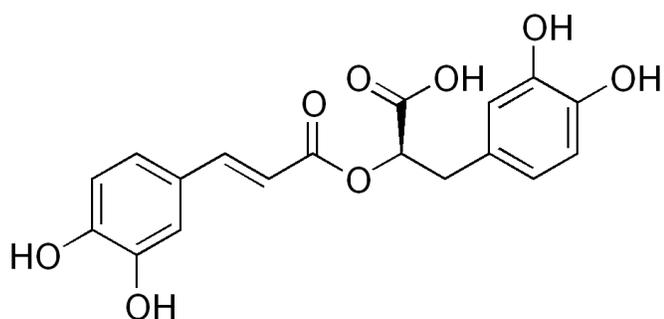


Figura 3.- Ácido rosmarínico

3.3.2.3 Ácido cafeico

Es un ácido hidroxicinámico perteneciente a la familia de los ácidos fenólicos ($C_9H_8O_4$) (figura 4). Para su biosíntesis se requiere la reacción de fenilalanina con la enzima fenilalanina-aminoliasa, obteniendo el ácido cinámico y al entrar en contacto con la enzima cinamato 4-hidroxilasa, forma el ácido p-cumárico, finalmente dicho ácido reacciona con la enzima 4-cumarato-3-hidroxilasa formando el ácido cafeico (Zapata 2015). Presenta actividad antibacterial y antiviral, además de ser un antioxidante natural

y un agente anticancerígeno (Sánchez-Luna et al. 2018), Dey et al. 2015 quienes han reportado la inhibición del crecimiento de diez aislados clínicos de *M. tuberculosis* con una CMI de 128-1024 $\mu\text{g/mL}$.

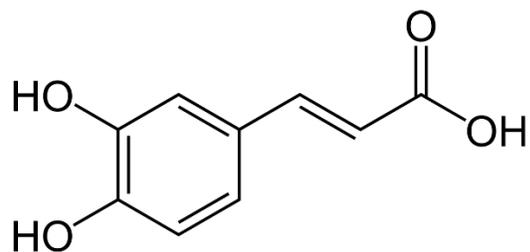


Figura 4.- Ácido cafeico

4. JUSTIFICACIÓN

Las micobacterias son un grupo de microorganismos que representan uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, esto en parte debido a la producción continua de cepas multirresistentes. Dentro de este grupo se encuentra *Mycobacterium tuberculosis* causante de al menos 10 millones de casos nuevos y 1.5 millones de decesos causados por TB anualmente. Además de esto, actualmente las micobacterias no tuberculosas han aumentado de forma significativa a nivel mundial, el tratamiento de este grupo de micobacterias se encuentra ralentizado a causa del constante reconocimiento de nuevas especies, las diferentes susceptibilidades frente a los antibióticos disponibles y su similitud en sintomatología con la especie tuberculosa. Dado lo anterior, la búsqueda de nuevas y/o novedosas terapias antituberculosas rentables y efectivas son una constante en las biociencias, destacando el rastreo de compuestos bioactivos en plantas medicinales, siendo en los últimos años el redescubrimiento y/o aprovechamiento de metabolitos ya conocidos una de las áreas de mayor interés, ya que en muchas de las ocasiones estos tienden a ser abundantes y accesibles, lo que representa un ahorro muy importante de recursos. Por lo anterior nos proponemos investigar el efecto antimicobacteriano de los extractos y compuestos mayoritarios del poleo mexicano (*Hedeoma drummondii*) sobre el crecimiento de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y de micobacterias no tuberculosas: *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*, esto con miras a establecer marcadores de la bioactividad de los extractos orgánicos, lo que conllevaría al desarrollo de un fitofármaco antimicobacteriano a base de *H. drummondii*.

5. HIPÓTESIS

Los extractos y compuestos mayoritarios de *Hedeoma drummondii* mostrarán efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diversas micobacterias.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicobacteriano *in vitro* de los extractos y compuestos mayoritarios de *Hedeoma drummondii* sobre *Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*.

6.1 Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de diferentes tipos de extractos obtenidos de la parte aérea de *H. drummondii* sobre el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. intracellulare* y *M. gordonae*.
2. Analizar el efecto de los compuestos mayoritarios (pulegona, ácido cafeico y ácido rosmarínico) de *H. drummondii* sobre el crecimiento *in vitro* de *Mycobacterium tuberculosis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare* y *M. gordonae*.
3. Comparar y correlacionar el grado de efectividad antimicobacteriana del extracto con el de los componentes mayoritarios.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Obtención de material vegetal

H. drummondii (Lamiaceae) fue colectado en Allende, Nuevo León México, mediante un muestreo aleatorio en un área de 100 x 100 m, entre los meses de enero-junio 2021 en la localidad del Fraile. La parte aérea de la planta se secó a temperatura ambiente y 150 g de la planta seca fue extraída mediante maceración estática con hexano primero y luego con metanol a temperatura ambiente. La relación planta-solvente es de 1:10, cambiándose el solvente cada 24 h durante 3 d consecutivos, posteriormente, el extracto se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 1. Del producto filtrado se eliminó el solvente mediante un rotavapor con temperatura y presión reducida. Los extractos orgánicos concentrados se almacenaron a 4°C hasta su uso. Mientras que los compuestos puros fueron adquiridos de manera comercial de la marca Sigma-Aldrich de grado analítico.

7.1.2 Preparación de soluciones stock

Para la elaboración del stock de las muestras se pesó 400 mg del extracto hexánico y metanólico, 40 mg de ácido cafeico y ácido rosmarínico y 4 mg de pulegona disueltos en 4, 2 y 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%, respectivamente. Las muestras fueron sonicadas hasta su completa disolución y se refrigeraron a 4°C para su uso posterior.

7.2 Cromatografía capa fina

Para confirmar la presencia de los compuestos mayoritarios de *H. drummondii* se utilizó la cromatografía capa fina utilizando silica gel 60F₂₅₄ con soporte de aluminio. Como estándar se emplearon los compuestos mayoritarios: pulegona, ácido cafeico y ácido rosmarínico. Para las muestras polares se utilizó como fase móvil acetato de etilo: cloroformo: ácido acético: agua, (100:11:11:27), usando como revelador yodo sublimado y DPPH (Viveros-Valdez 2009). Para las no polares, la fase móvil consistió de hexano: acetato de etilo (8:2) y como revelador se utilizó yodo sublimado y ácido sulfúrico 0.5% (Marianela 2010).

Finalmente se comparó el valor R_f de los extractos con los compuestos mayoritarios para confirmar la presencia de estos últimos en las muestras.

7.3 Cepas micobacterianas y condiciones de cultivo

Se obtuvieron diez aislamientos clínicos de MNT, que incluyen tres cepas de *M. abscessus* (139-10, LMMP, MNT2), dos de *M. fortuitum* (430R, MLIID1), tres de *M. intracellulare* (989-3, 142-09, 1105-1) y dos de *M. goodnae* (621R, A702); así como doce cepas de *M. tuberculosis* (D-159, 386-98, 41-99, 90-99, C-131, 428-98, F-353, 434-98, 168-99, 142-99, 376-98, H37Rv); las cepas fueron proporcionadas por el Laboratorio Interdisciplinario y de Investigación Dermatológica (LIID), perteneciente al Hospital Universitario José E. González (Monterrey, Nuevo León, México), cabe mencionar que varias cepas utilizadas de *M. tuberculosis* son resistentes a uno a más fármacos de primera línea de tratamiento.

Todas las cepas se identificaron a nivel de especie mediante pruebas bioquímicas y mediante análisis de restricción por PCR de una secuencia de 441 pb (fragmento de Teleniti) del gen *hsp65*. El aislado de referencia *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC). Las cepas se activaron a partir de las reservas congeladas en Lowenstein-Jensen Medium mediante incubación a 37°C, CO₂ 5% durante 7 a 14 d.

7.3.1 Ajuste de la suspensión bacteriana

Una vez que las cepas llegaron a su fase logarítmica, se preparó una suspensión bacteriana disuelta en solución salina [0.9%] hasta llegar a una suspensión de 1.0 McFarland equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL para *M. tuberculosis*, mientras que las cepas de MNT se utilizó un valor de 0.5 McFarland equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL.

7.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se evaluó la CMI de *M. tuberculosis* y MNT mediante la técnica de microdilución en placa de 96 pozos de acuerdo al CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute 2018). Para la evaluación de CMI en *M. tuberculosis* se prepararon soluciones a partir de los stocks de cada muestra con concentraciones de 2500 µg/mL para los extractos y 500 µg/mL para los compuestos mayoritarios, ambos casos utilizando como medio Middlebrook 7H9 suplementado con albúmina- ácido oleico- dextrosa- catalasa (OADC). Partiendo de dichas concentraciones se realizaron diluciones seriadas, de forma que las

concentraciones utilizadas para los extractos fueron de 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.063 y 19.531 $\mu\text{g/mL}$, y para los compuestos mayoritarios fueron de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.813 y 3.906 $\mu\text{g/mL}$. Mientras que el antibiótico rifampicina fue utilizado como control a concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$.

Por cada muestra se agregó 50 μL de cada concentración de manera horizontal en la microplaca junto con 50 μL de la cepa a evaluar previamente ajustada a 1 en la escala de McFarland, así como un pozo control sin tratamiento (cepa de *M. tuberculosis* en medio de cultivo) este procedimiento se realizó por duplicado y se repite por cada cepa del estudio.

Se incubaron las microplacas a 37°C por 5 d, después se preparó el reactivo Azul Alamar mediante una relación 1:1 con Tween al 10%, añadiendo 50 μL de dicho reactivo a los pozos y se reincubaron las microplacas a 37°C por 24 h (Martin et al. 2007). Para determinar la CMI de *M. tuberculosis* se utiliza Azul Alamar, que es un indicador de óxido-reducción presentando un cambio de color cuando es reducido por organismos vivos permitiendo una lectura visual directa de los resultados (Collins y Franzblau 1997). Un color azul indica no crecimiento y el color rosa se registra como crecimiento, de forma que el CMI se definió como la más baja concentración que previene el cambio de color de azul a rosa.

Para la evaluación CMI de los aislamientos de MNT se siguió la misma técnica de microdilución en placa utilizada para *M. tuberculosis*, los medios empleados son Mueller-Hinton ajustado a cationes (CA-MHB) para *M. abscessus* y *M. fortuitum* y el medio Middlebrook 7H9 suplementado con albúmina- ácido oleico- dextrosa- catalasa (OADC) para *M. intracellulare* y *M. gordonae*. Mientras que el control se realizó con los antibióticos linezolid e imipenem a concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$.

El ajuste en la escala de McFarland fue de 0.5 y para determinar el CMI se mide la turbidez en los pozos después de incubar la microplaca a 37°C por 72 h en las cepas de *M. abscessus* y *M. fortuitum*, y después de 7 a 10 d para las cepas de *M. intracellulare* y *M. gordonae* (Shen et al. 2018).

Los valores CMI obtenidos se analizaron mediante una correlación Pearson para determinar si existe asociación de la actividad antimicrobiana entre el uso de extractos y sus respectivos compuestos.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis cromatográfico

Este análisis cualitativo mediante cromatografía en capa fina nos permitió confirmar la presencia de los compuestos mayoritarios en los extractos metanólicos y hexánicos de *H. drummondii*, como se aprecia en la figura 6 y 7. Al comparar los factores de retención (R_f) entre el extracto hexánico y el compuesto mayoritario pulegona, se observa la similitud en la posición de las bandas.

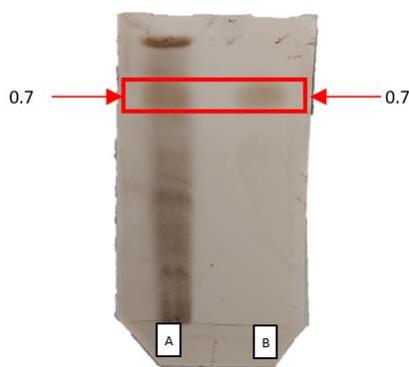


Figura 6.- Cromatografía en capa fina de extracto hexánico de *H. drummondii*.
A: Extracto hexánico; B: Pulegona
Revelador: Ácido sulfúrico 0.5%.

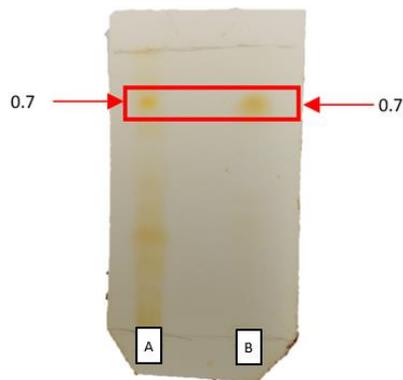


Figura 7.- Cromatografía en capa fina de extracto hexánico de *H. drummondii*.
A: Extracto hexánico; B: Pulegona
Revelador: Yodo sublimado

De igual manera, en las figuras 8 y 9, se aprecian las cromatografías realizadas al extracto metanólico de *H. drummondii*, observando un valor similar de Rf entre el extracto y los compuestos mayoritarios que son el ácido rosmarínico y ácido cafeico.

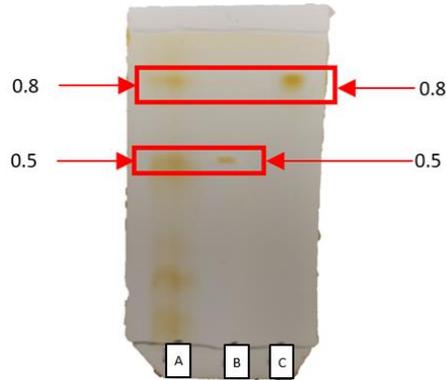


Figura 8.- Cromatografía en capa fina de extracto metanólico de *H. drummondii*.
A: Extracto metanólico; B: Ácido rosmarínico; C: Ácido cafeico
Revelador: Yodo sublimado.

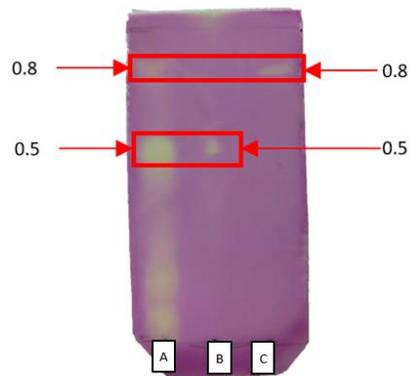


Figura 9.- Cromatografía en capa fina de extracto metanólico de *H. drummondii*.
A: Extracto metanólico; B: Ácido rosmarínico; C: Ácido cafeico
Revelador: DPPH.

8.2 Determinación de la CMI en *M. tuberculosis*

En la Tabla 1 se muestra el efecto antimicobacteriano de los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* contra cada una de las doce cepas de *M. tuberculosis* dentro de un ensayo en microplaca (figuras 10 y 11) donde se realizaron diluciones seriadas a una concentración máxima de 2500 µg/mL para los extractos y 500 µg/mL para compuestos mayoritarios. Dentro de las muestras estudiadas en el presente trabajo, destaca el CMI del extracto hexánico frente a la cepa D-159 con 312.5 µg/mL y del extracto metanólico con 19.53 µg/mL para las cepas 168-99 y 142-99 y 39.06 µg/mL para la cepa 376-98; en cuanto a los compuestos mayoritarios resalta el CMI de la pulegona con una actividad de 125 µg/mL en la cepa 90-99 y 428-98, mientras que el ácido rosmarínico y cafeico presentaron actividades de 125 µg/mL para las cepas 434-98, 168-99, 142-99 y 376-98.

Tabla 1.- Actividad antimicobacteriana en los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* frente a *M. tuberculosis*.

Cepas <i>M. tuberculosis</i>	Concentración en µg/mL					
	Extracto hexánico	Extracto metanólico	Pulegona	Ácido rosmarínico	Ácido cafeico	Rifampicina
D-159	312.5	625	500	500	500	16
386-98	625	1250	>500	>500	>500	32
41-99	>2500	>2500	500	>500	>500	16
90-99	2500	156.25	125	250	125	8
C-131	>2500	625	500	500	500	16
428-98	1250	>2500	125	>500	>500	32
F-353	1250	312.5	250	250	250	16
434-98	2500	1250	500	125	125	8
168-99	1250	19.53	250	125	125	8
142-99	1250	19.53	500	125	125	8
376-98	1250	39.06	500	125	250	4
H37Rv	156.25	625	500	500	250	2



Figura 10.- CMI 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de pulegona frente a la cepa 428-98 de *M. tuberculosis* en microplaca con Azul Alamar.



Figura 11.- CMI $>500 \mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido rosmarínico frente a la cepa 41-99 de *M. tuberculosis* en microplaca con Azul Alamar.

8.3 Determinación de la CMI en MNT

En la Tabla 2 se muestra el efecto antimicobacteriano de los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* contra cada una de las diez cepas de MNT, de forma similar a la Tabla 1 se realizaron diluciones seriadas (figuras 12 y 13) a una concentración máxima de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los extractos y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para compuestos mayoritarios. Al observar la actividad inhibitoria de las muestras frente a las MNT, el extracto hexánico obtuvo las mejores concentraciones de CMI presentando valores de 39.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *M. abscessus* LMMP y 78.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *M. intracellulare* 989-3 y *M. intracellulare* 1105-1. Por otro lado, el extracto metanólico presentó su mejor actividad frente a *M. abscessus* 139-10 con un CMI de 78.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguido por 312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para las cepas *M. abscessus* LMMP, *M. fortuitum* 430R, *M. fortuitum* MLIID1, *M. gordonae* A702; mientras que en los compuestos mayoritarios la pulegona fue la que obtuvo mejor actividad con valores de CMI de 15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *M. abscessus* 139-10 y *M. abscessus* LMMP así como 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *M. gordonae* A702, en el caso del ácido rosmarínico su actividad fue de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la mayoría de las cepas y el ácido cafeico destacó por su actividad de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *M. abscessus* LMMP y *M. intracellulare* 142-09.

Tabla 2.- Actividad antimicrobacteriana en los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* frente a MNT.

Cepas MNT	Concentración en µg/mL						
	Extracto hexánico	Extracto metanólico	Pulegona	Ácido rosmarínico	Ácido cafeico	Linezolid	Imipenem
<i>M. abscessus</i> 139-10	312.5	78.125	15.625	250	250	4	4
<i>M. abscessus</i> LMMP	39.06	312.5	15.625	250	125	4	4
<i>M. abscessus</i> MNT2	625	>2500	62.5	250	>500	2	16
<i>M. fortuitum</i> 430R	>2500	312.5	500	>500	>500	32	4
<i>M. fortuitum</i> MLIID1	>2500	312.5	>500	>500	>500	32	8
<i>M. intracellulare</i> 989-3	78.125	625	250	250	250	8	8
<i>M. intracellulare</i> 142-09	156.25	>2500	250	250	125	16	32
<i>M. intracellulare</i> 1105-1	78.125	>2500	>500	>500	500	32	16
<i>M. gordonae</i> 621R	312.5	>2500	250	>500	250	8	16
<i>M. gordonae</i> A702	156.25	312.5	31.25	250	250	8	32



Figura 12.- CMI 312.5 µg/mL del extracto metanólico frente a la cepa MLIID1 de *M. fortuitum* en microplaca.



Figura 13.- CMI 39.06 µg/mL del extracto hexánico frente a la cepa LMMP de *M. abscessus* en microplaca.

8.4 Correlación Pearson

Mediante el coeficiente de correlación r de Pearson se logró medir la asociación de la actividad antimicrobacteriana entre los extractos de *H. drummondii* y sus respectivos

compuestos, como se observa en la Tabla 3, se muestra que frente a cepas de *M. tuberculosis* el extracto metanólico presenta una correlación débil con el ácido cafeico y una correlación moderada con el ácido rosmarínico, mientras que el extracto hexánico presentó una correlación negativa con la pulegona.

Tabla 3.- Correlación de Pearson entre la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* frente a *M. tuberculosis*.

Cepas <i>M. tuberculosis</i>		
Extracto	Compuesto	Coefficiente de Pearson (r)
Metanólico	Ácido cafeico	0.142985508
Metanólico	Ácido rosmarínico	0.232180777

Por otra parte, en la Tabla 4, al comparar los extractos y compuestos de *H. drummondii* frente a cepas de MNT se observa que el extracto hexánico presenta una correlación fuerte con la pulegona. Mientras que el extracto metanólico presentó correlaciones negativas con el ácido rosmarínico y ácido cafeico.

Tabla 4.- Correlación de Pearson entre la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* frente a MNT.

Cepas MNT		
Extracto	Compuesto	Coefficiente de Pearson (r)
Hexánico	Pulegona	0.53839785

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró la actividad antimicobacteriana de los extractos y compuestos mayoritarios de *H. drummondii* frente a aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas. Se observó que los dos extractos estudiados mostraron efecto contra diez de las doce cepas de *M. tuberculosis* analizadas, el mejor efecto lo mostró el extracto metanólico con CMI de 19.53 $\mu\text{g/mL}$ contra las cepas 168-99 y 142-99. Cabe mencionar que las cepas de *M. tuberculosis* utilizadas mostraron resistencia a rifampicina que es un fármaco de primera línea al presentar un CMI mayor a 1 $\mu\text{g/mL}$ como menciona Getahun y colaboradores (2022).

Estrada-Soto et al. (2009) y Askun et al. (2012) demostraron el efecto antituberculoso de algunas Lamiáceas, destacando el observado por extractos de mediana a baja polaridad, siendo el obtenido por la flor de *Lepechinia caulescens* y el de la parte aérea de *Salvia boissieri* los más activos mostrando una CMI de 100 y 800 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Así mismo, se ha demostrado el efecto contra *M. tuberculosis* de extractos polares obtenidos por algunas Lamiáceas, Yao Hoekou et al. (2021) reportaron que el extracto etanólico obtenido de *Vitex doniana* mostró un CMI de 312.5 $\mu\text{g/mL}$, y Askun et al. (2013) reportó un CMI de 800 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto metanólico de *Thymus sibthorpii*, este mismo grupo de investigación sugiere que el efecto podría estar relacionado con el contenido de ácido rosmarínico, lo cual también es abordado en este proyecto.

La eficacia del extracto metanólico de *H. drummondii* contra diversas cepas de *M. tuberculosis* puede deberse en parte a la abundancia de compuestos fenólicos presentes en él, ya que previamente se ha sugerido que dichos compuestos, como las flavonas (cycloartocarpin, artocarpina, chaplashina, morusin, cudraflavona B, cudraflavona C) juegan un papel importante al inhibir la producción de ácido micólico, implicado en la formación de la pared celular micobacteriana; además de la inhibición de ácidos nucleicos y proteasa, lo que afecta el crecimiento y viabilidad de *M. tuberculosis* (Rabaan et al. 2022) y (Mazlun et al. 2019).

En esta investigación se encontró que el ácido rosmarínico y cafeico mostraron actividad antituberculosa contra 9 de las 12 cepas analizadas (Tabla 1), el mejor resultado se observó contra las cepas 434-98, 168-99 y 142-99, previamente ya se ha demostrado el

efecto antimicobacteriano del ácido cafeico contra una diversidad de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, mostrando una CMI en el rango de 128 a 1024 $\mu\text{g/mL}$ (Dey et al. 2015). Por otro lado, se han estudiado derivados estructurales sobre amidas de ácido rosmarínico para la inhibición de la enzima UDP-galactopiranos mutasa (UGM), esencial para la integridad de la pared celular y su viabilidad, su inhibición se ha presentado como una estrategia rentable para el descubrimiento de compuestos antituberculosos (Fu et al. 2022). Así mismo, se ha reportado que el grupo catecol se encuentra en ambos compuestos (cafeico y rosmarínico) y es responsable de la actividad antimicrobiana mostrado por moléculas que poseen este grupo funcional (Razaviamri et al. 2021).

Por otra parte, uno de los compuestos volátiles mayoritarios de *Hedeoma drummondii* es la pulegona, con reportes previos de su efecto contra bacterias como *S. aureus* (Farhanghi et al. 2022) y *E. coli* (Gong et al. 2021), además de hongos como *B. cinerea* y *M. fructicola*, (Montenegro et al. 2020). En este trabajo se demuestra su efecto contra *M. tuberculosis*, siendo las cepas más sensibles las 90-99 y 428 -98 con una CMI de 125 $\mu\text{g/mL}$. Se ha demostrado el efecto antituberculoso de otros monoterpenos como el carvacrol frente a una diversidad de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, mostrando una CMI en el rango 19 a 152 $\mu\text{g/mL}$ (Nakamura et al. 2018), eugenol y timol con CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$ (Boussamba-Digombou et al. 2022) así como α -pineno, sabineno, bisabolol, β -elemeno, mirceno y limoneno presentaron una CMI entre 16 y 512 $\mu\text{g/mL}$ frente a cinco aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (Sieniawska et al. 2018).

En cuanto al efecto contra las micobacterias no tuberculosas (MNT), se observó que el extracto hexánico fue el más activo al inhibir ocho de las diez cepas estudiadas, siendo la más sensible *M. abscessus* LMMP con un CMI de 39.06 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 2). Previamente se ha demostrado el efecto de aceites esenciales obtenidos de una diversidad de Lamiáceas contra cepas de micobacterias no tuberculosas, destacando la *Lavandula hybrida* que mostró efecto contra *M. intracellulare* y *M. gordonae* con CMIs de 3200 $\mu\text{g/mL}$ y 6400 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, así como *Salvia officinalis* con CMI de 6400 $\mu\text{g/mL}$ para *M. gordonae* (Peruč et al. 2018). En ese mismo sentido, ya se ha demostrado la actividad antimicrobiana contra este grupo de micobacterias a partir de extractos orgánicos obtenidos con solventes de baja y mediana polaridad: el extracto clorofórmico de la

semilla de *Persea americana* mostró CMI de 12.5, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ para *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, respectivamente (Jiménez-Arellanes et al. 2013), mientras que el extracto hexánico obtenido de *Juniperus communis* mostró una CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$ frente a *M. aurum* (Gordien et al. 2009).

La actividad antimicrobiana mostrada por el extracto no polar de *H. drummondii* (hexánico) contra las cepas no tuberculosas podría estar relacionado a que este grupo de micobacterias contiene glicopeptidolípidos (GLP) que se encuentran en la envoltura celular y contribuyen a la formación de biopelícula, la cual está relacionada con su propagación, virulencia y resistencia (Tran et al. 2019; Schorey y Sweet 2008), estos GLPs pueden ser inhibidos por compuestos de naturaleza terpénica lipofílica como los monoterpenos (Polyudova et al. 2021).

Con relación a lo anterior, la pulegona, uno de los monoterpenos mayoritarios de *H. drummondii*, mostró actividad antimicobacteriana contra 8 de las 10 cepas analizadas de MNT, las cepas más sensibles fueron *M. abscessus* 139-10 y LMMP y *M. gordonae* A702, con CMI de 15.63 $\mu\text{g/mL}$ y 31.25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabla 2). Se ha reportado el efecto de monoterpenos contra cepas no tuberculosas; Marini et al. (2019) demostraron el efecto del carvacrol contra *M. abscessus* y *M. fortuitum*, con un CMI de 64 $\mu\text{g/mL}$ y el eugenol contra *M. kansasii*, *M. massiliense*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. smegmatis* y *M. fortuitum* con CMI entre 3.9 y 250 $\mu\text{g/mL}$ (Almeida et al. 2019); además de α -pineno, timol, p-cimeno, limoneno, mirceno, geraniol, con CMI entre 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ para *M. chelonae* (Bueno-Sánchez et al. 2009).

En nuestro estudio, el extracto polar de *H. drummondii* (metanólico) inhibió seis de las diez cepas no tuberculosas analizadas, siendo la cepa más sensible *M. abscessus* 139-10 con una CMI de 78.125 $\mu\text{g/mL}$, las cepas más resistentes fueron las cepas de *M. intracellulare* (Tabla 2). Existen reportes previos sobre el uso de extractos y compuestos polares contra cepas no tuberculosas, como lo reportado por García-Davis y colaboradores (2020) con el extracto etanólico de *Laurencia johnstonii*, y sus sesquiterpenos laurinterol y aplyisina mostraron efectos contra *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. intracellulare*, además del trabajo de Jiménez-Arellanes et al. (2013) utilizando un extracto etanólico de *P. americana* con CMI de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. chelonae*,

M. avium, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, así como el uso del extracto metanólico y etanólico *Tithonia diversifolia* y *T. rotundifolia* con CMI entre 150 y 1250 µg/mL para *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. aurum* y *M. bovis* (Omokhua et al. 2018).

Por otra parte, los ácidos rosmarínico y cafeico de *H. drummondii* mostraron efecto antimicobacteriano contra las cepas no tuberculosas, destacando los valores de 125 µg/mL en *M. abscessus* LMMP y *M. intracellulare* 142-09 a 250 µg/mL (Tabla 2), previamente se ha demostrado el efecto antimicobacteriano de compuestos fenólicos contra especies de MNT, como lo son una diversidad de flavonoides (baicaleína, daidzeína, formononetina, genisteína, miricetina) y fenoles (resveratrol) con CMI de 32 a 256 µg/mL para *M. smegmatis* (Lechner et al. 2008).

En nuestra investigación se encontró que el extracto hexánico presenta una correlación fuerte con la pulegona ($r=0.53$) con las cepas de MNT (Wang et al. 2015), esto significa que la pulegona posiblemente podría servir como marcador de predictibilidad. Trabajos previos han realizado la búsqueda de marcadores químicos de predictibilidad como el caso de Muflihah et al. (2021) quienes correlacionan la actividad antioxidante de doce especies de la familia Zingiberaceae con compuestos fenólicos y el trabajo de Skrypnik et al. 2022 quienes correlacionan la actividad inhibitoria de la α -glucosidasa de 8 especies de la familia Lamiaceae con ácidos fenólicos y flavonoides.

Por otro lado, la presencia de correlaciones débiles entre la bioactividad de compuestos mayoritarios y extractos puros no necesariamente significa un resultado desalentador para la formulación de fitofármacos, previamente se ha mencionado que la sinergia entre los compuestos minoritarios presentes en los extractos podría traer beneficios al disminuir la posibilidad de desarrollar resistencia frente a un compuesto en particular (Willcox et al. 2011), siendo de utilidad en el extracto polar de *H. drummondii* en donde posiblemente exista otro(s) compuesto(s) además de los analizados con efecto contra las diferentes micobacterias analizadas.

10. CONCLUSIONES

- Los extractos orgánicos de *H. drummondii* poseen actividad antimicobacteriana, destacando el mostrado por el hexánico al inhibir 8 de las 10 cepas analizadas de MNT con CMI entre 39.0625 y 625 $\mu\text{g/mL}$ y el metanólico al inhibir 10 de las 12 cepas de *M. tuberculosis* con CMI entre 19.53 y 1250 $\mu\text{g/mL}$.
- Los compuestos mayoritarios de *H. drummondii* poseen efecto antimicobacteriano, destacando la pulegona al inhibir 11 de las 12 cepas de *M. tuberculosis* con CMI de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$, así como 8 de las 10 cepas analizadas de MNT con CMI entre 15.625 y 500 $\mu\text{g/mL}$.
- Se observó una correlación fuerte entre el extracto hexánico y el compuesto pulegona con su efecto contra micobacterias no tuberculosas ($r=0.53$).

11. PERSPECTIVAS

- Comprobar el efecto antimicobacteriano de *H. drummondii* y sus compuestos en modelos fisiológicamente más complejos.
- Confirmar y/o descartar el sinergismo en los extractos orgánicos.
- Confirmar si la pulegona puede ser útil para la estandarización de un fitofármaco.
- Analizar el posible efecto sinérgico aditivo de *H. drummondii* con los fármacos utilizados de primera línea para el tratamiento de enfermedades producidas por cepas de *Mycobacterium*.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas HS, Baker DHA. 2020. Recent Challenges in Tuberculosis Treatments : a Review. *Plant Archives* 20: 3539–3547.
- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. 2013. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013: 1–11.
- Almeida AL, Caleffi-Ferracioli KR, de L Scodro RB, Baldin VP, Montaholi DC, Spricigo LF, Nakamura-Vasconcelos SS, Hegeto LA, Sampiron EG, Costacurta GF, dos S Yamazaki DA, F Gauze G de, Siqueira VL, Cardoso RF. 2019. Eugenol and derivatives activity against *Mycobacterium tuberculosis* , nontuberculous mycobacteria and other bacteria. *Future Microbiology* 14: 331–344.
- Álvarez-Monjarás M. 2014. Medicina tradicional china: la clínica oriental y su relación con el paradigma psicológico occidental. *Psicología Iberoamericana* 22: 72–8.
- Askun T, Tekwu EM, Satil F, Modanlioglu S, Aydeniz H. 2013. Preliminary antimycobacterial study on selected Turkish plants (Lamiaceae) against *Mycobacterium tuberculosis* and search for some phenolic constituents. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 1–11.
- Askun T, Tumen G, Satil F, Modanlioglu S, Yalci O. 2012. Antimycobacterial Activity Some Different Lamiaceae Plant Extracts Containing Flavonoids and Other Phenolic Compounds. *Understanding Tuberculosis - New Approaches to Fighting Against Drug Resistance* .
- Avello M, Cisternas I. 2010. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista médica de Chile* 138: 1288–1293.
- Baptista R, Bhowmick S, Shen J, Mur LAJ. 2021. Molecular Docking Suggests the Targets of Anti-Mycobacterial Natural Products. *Molecules* 26: 475.
- Bento CM, Gomes MS, Silva T. 2020. Looking beyond Typical Treatments for Atypical Mycobacteria. *Antibiotics* 9: 18.

- Bermejo MC, Clavera I, Michel de la Rosa FJ, Marín B. 2007. Epidemiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 30: 07–19.
- Boussamba-Digombou KJ, Sandasi M, Kamatou GP, van Vuuren S, Sawicki R, Fakhar Z, Viljoen AM. 2022. Investigating the Antituberculosis Activity of Selected Commercial Essential Oils and Identification of Active Constituents Using a Biochemometrics Approach and In Silico Modeling. *Antibiotics* 11: 948.
- Božović M, Ragno R. 2017. *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its Main Essential Oil Constituent Pulegone: Biological Activities and Chemistry. *Molecules* 22: 290.
- Bueno-Sánchez JG, Martínez-Morales JR, Stashenko E. 2009. Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud* 41: 231–235.
- Bussman R, Sharon D. 2015. PLANTAS MEDICINALES DE LOS ANDES Y LA AMAZONIA-La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú Medicinal plants and their ecology in Northern Peru and Southern Ecuador View project Ethnobotany and livelihoods in Madagascar and Eastern Africa View project. Centro William L. Brown – Jardín Botánico de Missouri. pp. 7.
- Chang H-Y, Tsai W-C, Lee T-F, Sheng W-H. 2021. *Mycobacterium gordonae* infection in immunocompromised and immunocompetent hosts: A series of seven cases and literature review. *Journal of the Formosan Medical Association* 120: 524–532.
- Chateauneuf R, Benavides M. 2015. Plantas Medicinales y Medicina Natural. Plantas medicinales y medicina natural Chile: Ocho Libros. pp. 41–54.
- Clinical & Laboratory Standards Institute. 2018. Susceptibility Testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* spp., and Other Aerobic Actinomycetes. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collins L, Franzblau SG. 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 1004–1009.
- Corti M, Soto I, Villafane F, Esquivel P, Di Lonardo M. 1999. Infección diseminada por

- Mycobacterium fortuitum* en un paciente con sida. *Medicina Buenos Aires* 59: 274–276.
- Dey D, Ray R, Hazra B. 2015. Antimicrobial activity of pomegranate fruit constituents against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmaceutical Biology* 53: 1474–1480.
- Eisner S. 2001. Use of Marker compounds In manufacturing and labeling Botanically derived dietary Supplements. 1: .
- Estrada-Soto S, Arteaga-González V, Castillo-España P, Molina-Salinas GM, Said-Fernández S, Navarrete-Vázquez G. 2009. Anti-mycobacterial activity of extracts from plants used in Mexico for the treatment of infectious diseases. *Pharmacognosy Magazine* 4: 106–110.
- Farhanghi A, Aliakbarlu J, Tajik H, Mortazavi N, Manafi L, Jalilzadeh-Amin G. 2022. Antibacterial interactions of pulegone and 1,8-cineole with monolaurin ornisin against *Staphylococcus aureus*. *Food Science & Nutrition* 10: 2659–2666.
- Firmage DH. 1981. Environmental influences on the monoterpene variation in *Hedeoma drummondii*. *Biochemical Systematics and Ecology* 9: 53–58.
- Fu J, He Z, Fu H, Xia Y, N’Go I, Lou H, Wu J, Pan W, Vincent SP. 2022. Synthesis and evaluation of inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* UGM using bioisosteric replacement. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 69: 116896.
- Gallegos M. 2016. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina Facultad de Medicina San Fernando de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. pp. 327–332.
- García-Davis S, Leal-López K, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L, Díaz-Marrero AR, Fernández JJ, Carranza-Rosales P, Viveros-Valdez E. 2020. Antimycobacterial Activity of Laurinterol and Aplysin from *Laurencia johnstonii*. *Marine Drugs* 18: 287.
- García García JM, Palacios Gutiérrez JJ, Sánchez Antuña AA. 2005. Infecciones respiratorias por micobacterias ambientales. *Archivos de Bronconeumología* 41:

206–219.

- Garza-Velasco R, Ávila-de Jesús J, Perea-Mejía LM, Garza-Velasco R, Ávila-de Jesús J, Perea-Mejía LM. 2017. Tuberculosis pulmonar: la epidemia mundial continúa y la enseñanza de este tema resulta crucial y compleja. *Educación Química* 28: 38–43.
- Getahun M, Blumberg HM, Ameni G, Beyene D, Kempker RR. 2022. Minimum inhibitory concentrations of rifampin and isoniazid among multidrug and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia. *PLOS ONE* 17: e0274426.
- Gonçalves S, Mansinhos I, Romano A. 2020. Aromatic plants: A source of compounds with antioxidant and neuroprotective effects. *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases Elsevier*. pp. 155–173.
- Gong H, He L, Zhao Z, Mao X, Zhang C. 2021. The specific effect of (R)-(+)-pulegone on growth and biofilm formation in multi-drug resistant *Escherichia coli* and molecular mechanisms underlying the expression of pgaABCD genes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 134: 111149.
- Gordien AY, Gray AI, Franzblau SG, Seidel V. 2009. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 126: 500–505.
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademaro MF, Iseman M, Olivier K, Ruoss S, von Reyn CF, Wallace RJ, Winthrop K. 2007. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175: 367–416.
- Guzmán C, Rivera M. 2014. Conocimientos , Actitudes Y Prácticas Del Uso De Fitofármacos Por Usuarios Del Instituto De Estudios Superiores De Medicina Oriental Managua. Nicaragua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. pp. 7.
- Hayes JR, Stavanja MS, Lawrence BM. 2007. Biological and Toxicological Properties of Mint Oils and Their Major Isolates: Safety Assessment. *Mint: The Genus Mentha*

- CRC Press. pp. 462–477.
- Hernández A, Marrero E, Fernández O, Orta S, Rodeiro I, Menéndez R, Acosta L, Ramírez D, Martínez L, Alfonso I, Jiménez G, García M, Soler D, Martín N, Puente E. 2017. Guía metodológica para la investigación del desarrollo de un fitomedicamento. Cuba: Ciencias Médicas. pp. 5–6.
- Irving RS. 1970. Novelties in *Hedeoma* (Labiatae). *Brittonia* 22: 338–345.
- Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, Kim B-J, Kook Y-H, Lee S-H, Park YK, Kim CK, Koh W-J. 2009. Antibiotic Treatment of *Mycobacterium abscessus* Lung Disease: a retrospective analysis of 65 patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180: 896–902.
- Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Cornejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13: 109.
- Lechner D, Gibbons S, Bucar F. 2008. Plant phenolic compounds as ethidium bromide efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62: 345–348.
- León-Landa CA, Aguillón-García EA. 2017. Micobacteriosis pulmonar por *Mycobacterium abscessus*. *Medicina Interna de Mexico* 33: 835–840.
- Li S, Han Q, Qiao C, Song J, Lung Cheng C, Xu H. 2008. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chinese Medicine* 3: 7.
- Loddenkemper R, Lipman M, Zumla A. 2016. Clinical Aspects of Adult Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6: 17848.
- Macouzet M V., Estrada E, Jiménez J, José Angel V, Herrera MC. 2013. Plantas medicinales de Miquihuana, Tamaulipas. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp. 11–13.
- Marianela R. 2010. Extracción, aislamiento e identificación de carbohidratos presentes en el hongo comestible *Hericium erinaceum*. Chile: Universidad Austral de Chile. pp. 67.

- Marini E, Di Giulio M, Ginestra G, Magi G, Di Lodovico S, Marino A, Facinelli B, Cellini L, Nostro A. 2019. Efficacy of carvacrol against resistant rapidly growing mycobacteria in the planktonic and biofilm growth mode. *PLoS ONE* 14: 1–12.
- Martin A, Portaels F, Palomino JC. 2007. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 175–183.
- Martínez-Gordillo MJ, Bedolla-García B, Cornejo-Tenorio G, Fragoso-Martínez I, Fragoso-Martínez I, García-Peña M del R, González-Gallegos JG, Lara-Cabrera SI, Zamudio S, Bedolla-García B, Cornejo-Tenorio G, Fragoso-Martínez I, García-Peña M del R, González-Gallegos JG, Lara-Cabrera SI, Zamudio S. 2017. Lamiaceae de México. *Botanical Sciences* 95: 780.
- Mata OJ, Fernández S, Rodríguez M, De Waard JH. 2016. Mecanismos de resistencia en micobacterias de crecimiento rápido. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 47: 95–124.
- Mazlun MH, Sabran SF, Mohamed M, Abu Bakar MF, Abdullah Z. 2019. Phenolic Compounds as Promising Drug Candidates in Tuberculosis Therapy. *Molecules* 24: 2449.
- Montenegro I, Said B, Godoy P, Besoain X, Parra C, Díaz K, Madrid A. 2020. Antifungal Activity of Essential Oil and Main Components from *Mentha pulegium* Growing Wild on the Chilean Central Coast. *Agronomy* 10: 254.
- Morán López E, Lazo Amador Y. 2001. Tuberculosis. *Revista Cubana de Estomatología Editorial Ciencias Médicas*. pp. 33–51.
- Muflihah YM, Gollavelli G, Ling Y-C. 2021. Correlation Study of Antioxidant Activity with Phenolic and Flavonoid Compounds in 12 Indonesian Indigenous Herbs. *Antioxidants* 10: 1530.
- Nakamura De Vasconcelos SS, Caleffi-Ferracioli KR, Hegeto LA, Baldin VP, Nakamura C V., Stefanello TF, Freitas Gauze G De, Yamazaki DA, Scodro RB, Siqueira VL, Cardoso RF. 2018. Carvacrol activity & morphological changes in

- Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiology* 13: 877–888.
- Omokhua AG, Abdalla MA, Van Staden J, McGaw LJ. 2018. A comprehensive study of the potential phytomedicinal use and toxicity of invasive *Tithonia* species in South Africa. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18: 272.
- OMS. 2020. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Pastor E, Luz Andreu A, Llombart M, Chiner E. 2006. *Mycobacterium fortuitum*: una rara causa de infección de marcapasos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 24: 136–137.
- Pérez I. 2008. El uso de las plantas medicinales. Universidad Veracruzana Intercultural Mexico: pp. 23.
- Peruč D, Gobin I, Abram M, Broznić D, Svalina T, Štifter S, Staver MM, Tićac B. 2018. Antimycobacterial potential of the juniper berry essential oil in tap water. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju* 69: 46–54.
- Pfyffer GE. 2011. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. *Manual of Clinical Microbiology* Washington, DC, USA: ASM Press. pp. 536–569.
- Polyudova T V, Eroshenko D V, Pimenova E V. 2021. The biofilm formation of nontuberculous mycobacteria and its inhibition by essential oils. *International journal of mycobacteriology* 10: 43–50.
- Quezada-Lázaro R, Fernández-zuñiga EA, García A, Garza-gonzález E, Alvarez L, Camacho-corona MR, Universitaria C, Garza SNDL, León N, Centro M, León N, Autónoma U, Químicas CDI. 2016. Antimycobacterial compounds from *Nasturtium officinale*. 13: 31–34.
- Rabaan AA, Alhumaid S, Albayat H, Alsaeed M, Alofi FS, Al-Howaidi MH, Turkistani SA, Alhajri SM, Alahmed HE, Alzahrani AB, Mashraqi MM, Alwarthan S, Alhajri M, Alshahrani FS, Almuthree SA, Alsubki RA, Abuzaid AA, Alfaresi M, Al Fares MA, Mutair A Al. 2022. Promising Antimycobacterial Activities of Flavonoids against *Mycobacterium* sp. *Drug Targets: A Comprehensive Review*. *Molecules*

27: 5335.

- Ramírez-Hernández BC, Robles Arellano G, García de Alba García JE, Zañudo Hernández J, Salcedo Rocha AL, García de Alba Verduzco J. 2013. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. Desacatos. Revista de Ciencias Sociales 29–44.
- Razaviamri S, Wang K, Liu B, Lee BP. 2021. Catechol-Based Antimicrobial Polymers. Molecules 26: 559.
- Rodríguez-Sauceda EN. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai 7: 153–170.
- Rodríguez G. 2006. Mycobacterias. Temas de Bacteriología y Virología Médica Uruguay: FEFMUR. pp. 390–391.
- Romero O, Tortoriello J. 2007. Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social 45: 453–458.
- Ryan KJ. 2017. Capítulo 27: Micobacterias. En G. Ray (Ed.), Sherris. Microbiología médica. Mexico: McGraw-Hill. pp. 374–385.
- Saldías F, Tirapegui F, Díaz O. 2013. Infección pulmonar por *Mycobacterium avium* complex en el huésped inmunocompetente *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease in immunocompetent adult patients. Revista chilena de enfermedades respiratorias 29: 162–167.
- Sánchez-Luna V, Villalobos-Porras V, Arguedas E, Monge-Fallas A. 2018. Estudio De Las Propiedades Antioxidantes Del Ácido Cafeico Como Agente Reductor Del Riesgo De Aterosclerosis a Partir De La β -Oxidación De Las Ldlc. Farmacia 1: .
- Schorey JS, Sweet L. 2008. The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. Glycobiology 18: 832–841.
- Shen Y, Wang X, Jin J, Wu J, Zhang X, Chen J, Zhang W. 2018. In Vitro Susceptibility of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium fortuitum* Isolates to 30 Antibiotics. BioMed Research International 2018: 1–10.

- Sieniawska E, Sawicki R, Swatko-Ossor M, Napiorkowska A, Przekora A, Ginalska G, Swatko-Ossor M, Augustynowicz-Kopec E. 2018. The Effect of Combining Natural Terpenes and Antituberculous Agents against Reference and Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Molecules* 23: 176.
- Sik B, Kapcsándi V, Székelyhidi R, Hanczné EL, Ajtony Z. 2019. Recent Advances in the Analysis of Rosmarinic Acid From Herbs in the Lamiaceae Family. *Natural Product Communications* 14: 1–10.
- Singh N. 2018. Role of Markers in Standardization of Herbal Medicines. 1–7.
- Skrypnik L, Golovin A, Savina T. 2022. Effect of salicylic acid on phenolic compounds, antioxidant and antihyperglycemic activity of Lamiaceae plants grown in a temperate climate. *Frontiers in Bioscience-Elite* 14: 3.
- Soliz J. 2014. Efectos de los compuestos activos y funcionales del romero (*Rosmarinus officinalis*) en el control del peso corporal y del metabolismo energético. España: Universitat de les Illes Balears. pp. 18.
- Suárez LEC, Barrera CAC, Barrera EDC, Moreno JML. 2011. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia* 45: 275–282.
- Sytar O, Bruckova K, Hunkova E, Zivcak M, Konate K, Brestic M. 2015. The application of multiplex fluorimetric sensor for the analysis of flavonoids content in the medicinal herbs family Asteraceae, Lamiaceae, Rosaceae. *Biological Research* 48: 5.
- To K, Cao R, Yegiazaryan A, Owens J, Venketaraman V. 2020. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Clinical Medicine* 9: 2541.
- Torres-Chatí J, León-Quispe J, Tomas-Chota G. 2017. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray arrayán frente a patógenos de origen clínico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología Sociedad Venezolana de Microbiología*. pp. 10–16.
- Tovar JC. 2007. COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y

TÓXICA DE ACEITES ESENCIALES DE SEIS ESPECIES MEDICINALES DE LAMIACEAE EN EL ESTADO DE HIDALGO. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo 34.

- Tran T, Bonham AJ, Chan ED, Honda JR. 2019. A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids compared to the tubercle bacillus. *Tuberculosis* 115: 96–107.
- Trejo-Márquez H, Gorocica P, Porras F, Chávez R, Lascurain R, Zenteno E. 2003. Bases moleculares de la interacción de *Mycobacterium tuberculosis* con los macrófagos. *Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 16: 41–48.
- Valdés F, Cid A. 2004. Micobacterias atípicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 95: 331–357.
- Vega-Avila E, Espejo-Serna A, Alarcón-Aguilar F, Velasco-Lezama R. 2009. Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 52: 78–82.
- Vetere V, Santori GF, Moglioni A, Moltrasio Iglesias GY, Casella ML, Ferretti OA. 2002. Hydrogenation of (–)-Menthone, (+)-Isomenthone, and (+)-Pulegone with Platinum/Tin Catalysts. *Catalysis Letters* 84: 251–257.
- Viveros-Valdez E. 2009. Aislamiento dirigido a la identificación de compuestos antirradicales y/o quimiopreventivos de *Hedeoma drummondii* y *Spirulina maxima*. 111.
- Viveros-Valdez E, Rivas-Morales C, Carranza-Rosales P, Mendoza S, Schmeda-Hirschmann G. 2008. Free Radical Scavengers from the Mexican Herbal Tea “Poleo” (*Hedeoma drummondii*). *Zeitschrift für Naturforschung C* 63: 341–346.
- Viveros-Valdez E, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Castro-Garza J, Carranza-Rosales P. 2010. Antiproliferative Effect from the Mexican Poleo (*Hedeoma drummondii*). *Journal of Medicinal Food* 13: 740–742.
- Viveros-Valdez E, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Verde-Star MJ, Carranza-Rosales P. 2011. Antimicrobial Activity of *Hedeoma drummondii* against Opportunistic Pathogens. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 14: 305–307.

- Vivot E, Sánchez C, Cacik F, Sequin C. 2012. Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, docencia y tecnología* 23: 165–185.
- Wang D, Le XH, Luque AE. 2015. Identifying Effective Approaches for Dissemination of Clinical Evidence--Correlation Analyses on Promotional Activities and Usage of a Guideline-Driven Interactive Case Simulation Tool in a Statewide HIV-HCV-STD Clinical Education Program. *Studies in health technology and informatics* 216: 515–9.
- Willcox ML, Graz B, Falquet J, Diakite C, Giani S, Diallo D. 2011. A “reverse pharmacology” approach for developing an anti-malarial phytomedicine. *Malaria Journal* 10: S8.
- Yao Hoekou KEP, Iwaba Kpabi PP, Anoumou Y, Dagnra KMN, Komlan Batawila TT. 2021. In vitro Antimycobacterial Activity of Selected Medicinal Plants against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 10: 3201–3208.
- Zambrano-Intriago LF, Buenaño-Allauca MP, Mancera-Rodríguez NJ, Jiménez-Romero E. 2015. Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud* 17: 97–111.
- Zamora-Hierro SL, López-escamilla AL, Lin S, Ana Z. 2013. Micropropagación de *Hedeoma drummondii* Benth. *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas* 13: 96–103.
- Zapata J. 2015. Caracterización de residuos generados en los procesos productivos de la agroindustria del café. Colombia: Universidad ICESI. pp. 20.