



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* CONTRA *Escherichia coli* Y
Staphylococcus aureus DE FRACCIONES DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
UN CULTIVO DE RAÍZ EN SUSPENSIÓN DE *Tanacetum parthenium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:
ABIGAIL RAMIREZ CRUZ



ASESOR DE TESIS:
DR. AURELIO NIETO TRUJILLO

COASESORA DE TESIS:
DRA. MARÍA ELENA ESTRADA ZÚÑIGA

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2 ANTECEDENTES	5
2.1 Epidemiología de las infecciones bacterianas	5
2.1.1 Generalidades de <i>S. aureus</i>	8
2.1.2 Generalidades de <i>E. coli</i>	11
2.2 Metabolismo secundario de plantas medicinales antibacterianas	14
2.3 <i>Tanacetum parthenium</i>	18
2.3.1 Botánica y distribución	18
2.3.2 Usos en la Medicina Tradicional	19
2.3.3 Metabolitos secundarios de <i>T. parthenium</i> y su actividad antibacteriana	21
2.3.4 Cultivo <i>in vitro</i> de células, tejidos u órganos vegetales	22
2.4 Metodologías para evaluar <i>in vitro</i> la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.....	26
2.5 Medios de cultivo para crecimiento bacteriano	30
2.5.1 Soya tripticasa.....	31
2.5.2 Mueller-Hinton.....	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPOTESIS	34
5. OBJETIVOS.....	34
5.1 OBJETIVO GENERAL	34
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	34
6. METODOLOGIA.....	35
6.1 Preparación de las fracciones.....	35
6.2 Cepas bacterianas.....	36
6.3 Medios de cultivo	36
6.4 Bioensayos	36
.....	37
Figura 12: Representación esquemática del método utilizado y descrito en las secciones 6.1-6.4.	37
6.5 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS	38
8. DISCUSIÓN	44
9. CONCLUSIONES	46

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
--------------------------------------	----

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por bacterias patógenas siguen constituyendo uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo ya que constituyen una de las principales causas de morbilidad (Borbolla-Sala *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2018). Además, la resistencia de los microorganismos a los antibióticos representa hoy en día una de las mayores amenazas para la salud mundial y la seguridad alimentaria, por lo que este panorama impulsa al hombre a la búsqueda y descubrimiento de nuevos principios bioactivos (OMS, 2020).

Existe una amplia variedad de bacterias patógenas que pueden causar infecciones en el ser humano, tal es el caso de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Martínez, 2010; Liu *et al.*, 2018). *S. aureus* se encuentra en la piel y el principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos (Velazquez, 2005; Nakatsuji *et al.*, 2017). Causa infección en las partes blandas, neumonía, sepsis con o sin metástasis y enfermedades por toxinas (síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis) (Martínez, 2010; Nakatsuji *et al.*, 2017). *E. coli* sobrevive generalmente en los intestinos animales (incluido el humano) y en las aguas negras y puede causar infecciones intestinales y extraintestinales en su mayoría severas, tales como las del aparato excretor, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia, neumonía y disentería (Hernandez *et al.*, 2011; Poirel *et al.*, 2018).

Las plantas medicinales y aromáticas tienen particular importancia en el cuidado de la salud de los seres humanos, especialmente de aquellos que habitan los países en vía de desarrollo (Chávez *et al.*, 1994; van Wyk y Prinsloo, 2018). Un gran número de compuestos bioactivos obtenidos del reino vegetal son principalmente sustancias conocidas como metabolitos secundarios (MS), compuestos de bajo peso molecular (Sepúlveda *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2019). Entre las familias de especies vegetales con una vasta diversidad de MS se encuentran: Asteraceae, Lamiaceae, Fabaceae, Solanaceae, entre otras (Magaña *et al.*, 2010; Hussein y El-Anssary, 2019). Una especie perteneciente a la Familia Asteraceae, es *Tanacetum parthenium*, planta aromática muy compleja químicamente. Entre los MS reportados

de esta planta se encuentran las lactonas sesquiterpénicas, los flavonoides, los pinenos y otros compuestos (Pareek *et al.*, 2011). Entre dichos MS, los flavonoides y las lactonas sesquiterpénicas se han reportado como antimicrobianos (Arias, 2013; Ávalos, 2009). Dentro de estos últimos compuestos, el más abundante en *T. parthenium* es la partenólida, que está presente en flores, semillas, hojas y raíces. La producción de la partenólida depende del órgano empleado, de la constitución genética, de factores asociados al desarrollo y al lugar geográfico de la especie, entre otros (Hojati *et al.*, 2016; Majdi *et al.*, 2013), por lo que el cultivo de tejidos y órganos vegetales (también conocido como cultivo *in vitro*) se ha convertido en una técnica biotecnológica viable para producir compuestos bioactivos, ya que permite controlar las condiciones para producir MS (Akin-Idowu *et al.*, 2009). En *T. parthenium*, los reportes sobre cultivo *in vitro* demuestran que la producción de compuestos fenólicos y partenólida depende del tipo de cultivo, del tiempo de incubación y de los reguladores del crecimiento vegetal (Nieto-Trujillo *et al.*, 2017). En 2017, Nieto-Trujillo *et al.*, demostraron que el cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium* produce la lactona sesquiterpénica partenólida y compuestos fenólicos (flavonoides y fenilpropanoides) por lo que podrían ser una fuente de MS antibacterianos contra *E. coli* y *S. aureus*.

2 ANTECEDENTES

2.1 Epidemiología de las infecciones bacterianas

Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México (Figura 1) y en el mundo (Hernández *et al.*, 2011). Por ello, se las considera un problema de salud pública, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (Ramírez, 2002; Cameron *et al.*, 2017). Las infecciones entéricas son de las enfermedades más comunes del humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que alrededor de dos millones de niños mueren anualmente de enfermedades diarreicas en países

en vías de desarrollo y producen además la muerte de un menor cada 15 segundos alrededor del mundo (Alper, 2003; Cameron *et al.*, 2017).

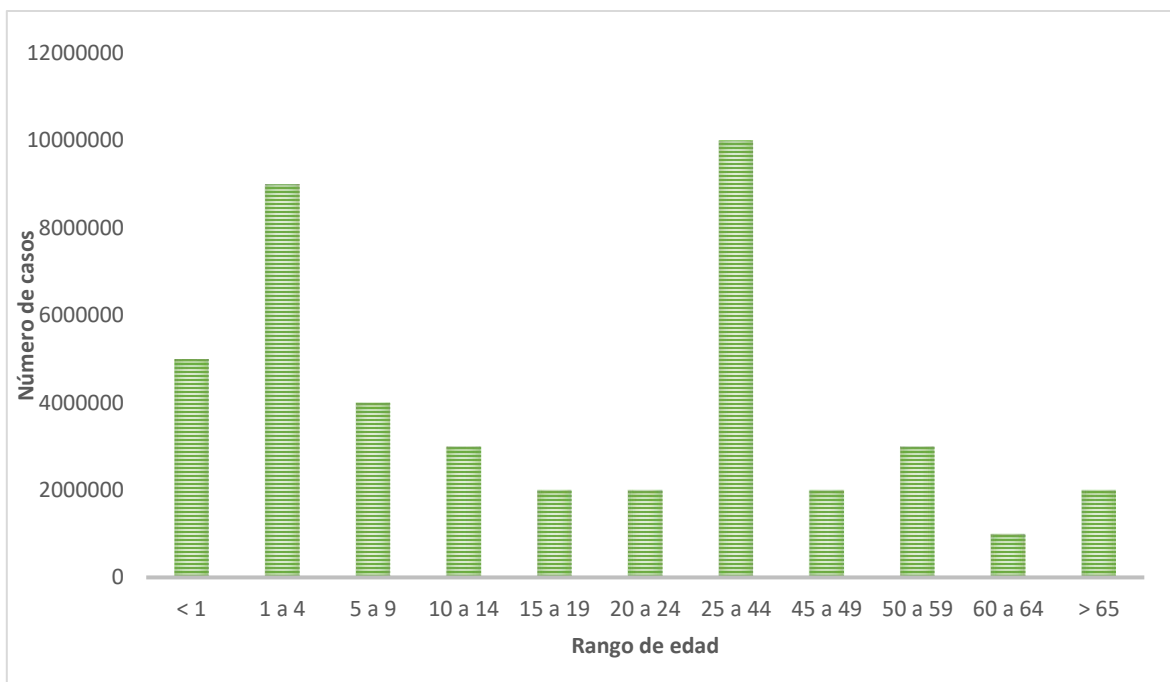


Figura 1: Número de casos de enfermedades del tracto gastrointestinal por grupo de edad. En la gráfica se muestran los datos recopilados desde 2000 hasta 2008. Se observa que los grupos de edad más afectados son los niños de 5 años y los adultos entre 25 y 44 años. Tomada de Hernández *et al.*, 2011.

Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por parásitos (*Giardia lamblia* y amibas), bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp.), y virus (*Rotavirus* y virus Norwalk) (Hernández, 2011). Del total de 154,687 casos nuevos de diarreas acumulados hasta la semana 53 del 2003, el 32.4% de dichos casos fue causado por amibiasis intestinal y giardiasis, y el 67.6% restante fue causado por virus y bacterias. Entre estas últimas, se encuentra *E. coli* que, por medio de alimentos contaminados, (principal forma de transmisión) causa infecciones intestinales severas (Sistema Nacional de Salud (SNS-DGE), 2003). Según el Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (SEED, 2019), las infecciones intestinales causadas por diversos microorganismos (entre los cuales se encuentra *E. coli*) se posicionaron en el segundo lugar de morbilidad en México

durante el año 2019, y ocuparon el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria (SEED, 2019). En México para el año 2015, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó a *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* como los agentes infecciosos asociados a enfermedades nosocomiales (RHOVE, 2015), y entre los agentes etiológicos clásicos que producen un cuadro diarreico importante en los niños se encuentra *E. coli* (Alper, 2003; Cameron *et al.*, 2017).

Típicamente *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos dentro de sus primeras horas y permanece ahí durante toda la vida en simbiosis con su huésped (Nataro *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2017). No obstante, se han podido identificar por lo menos seis categorías de *E. coli* que provocan diarreas en el humano, las cuales se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes (Hernández, 2011).

En 2017 la OMS publicó por primera vez en su historia la lista de “patógenos prioritarios”, resistentes a antibióticos; la lista se elaboró para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como una estrategia para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2017).

En la lista se enfatiza la amenaza que suponen las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes (OMS, 2017). La lista de la OMS se divide en tres categorías de acuerdo con la urgencia en la que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media.

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y varias enterobacterias, tales

como: *Klebsiella* sp., *E. coli*, *Serratia* sp. y *Proteus* sp. Estas bacterias pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías (OMS, 2017).

En el grupo de prioridad elevada se encuentran bacterias como: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (Marovac *et al.*, 2000), *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina, *Salmonellae* sp. resistente a las fluoroquinolonas y *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR) (Mulligan *et al.*, 1993; Aguayo-Reyes *et al.*, 2018), con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina (OMS, 2017).

Por otro lado, la RHOVE también reportó que las infecciones en la piel y tejidos blandos son causadas por diferentes agentes etiológicos como son las bacterias, con un 10.3% de los casos totales reportados en 2015, de los cuales el 80.9% fueron detectados en adultos (RHOVE, 2015).

Los nuevos antibióticos desarrollados contra los patógenos prioritarios contribuirán a reducir las muertes debidas a infecciones en todo el mundo (OMS, 2017). Por ello es importante el estudio de nuevas moléculas bioactivas que ayuden a inhibir el crecimiento bacteriano de cepas susceptibles o resistentes a los antibióticos.

2.1.1 Generalidades de *S. aureus*

El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies, y muchas de éstas habitan naturalmente piel y membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones (Kloss, *et al.*, 1997; Ondusko Y Nolt, 2018).

Los estafilococos crecen en medios químicamente definidos, los cuales contienen glucosa, sales, aminoácidos, tiamina y ácido nicotínico. *S. aureus*, es una bacteria coco Gram positiva (Figura 2a,b), aerobia facultativa y fermentadora de glucosa, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas (Cervantes, *et al.*, 2014) (Figura 2a-d). Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias

facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de hidrolizar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos (Kuroda *et al.*, 2001).

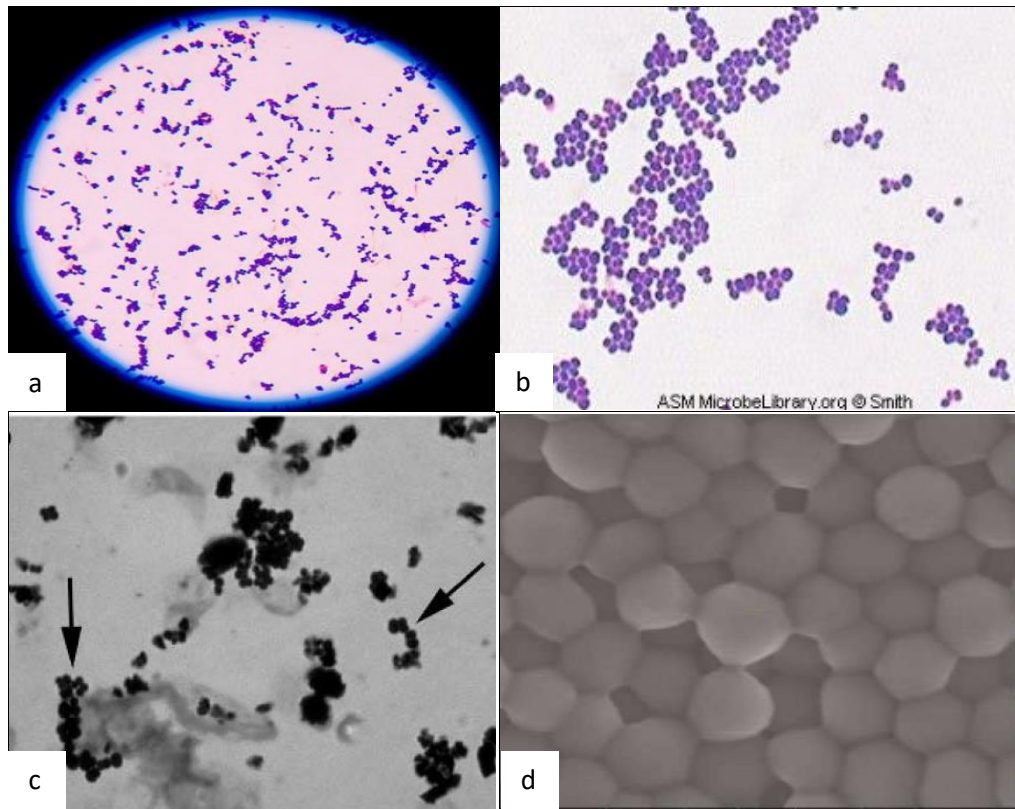


Figura 2: Imágenes de *S. aureus*, a y b) tinción de Gram, imágenes vistas en microscopio óptico 100x, se muestra en flechas las agrupaciones de las bacterias; c y d) microscopía electrónica de barrido (x1800 y x72571, respectivamente). Tomadas de Murdoch y Greenlees 2004 (a y b), Wu *et al.*, 2003 (c), Peng *et al.*, 2011 (d).

S. aureus se encuentra presente en la microbiota normal; sin embargo, puede ser el agente etiológico de diversas enfermedades. En el humano, se encuentra principalmente en la nariz y las superficies cutáneas y su transmisión generalmente es por contacto persona a persona (Rojas *et al.*, 2001; Ondusko Y Nolt, 2018). La mayor incidencia de sus infecciones se presenta en niños, principalmente neonatos y lactantes, así como en pacientes sometidos a

intervenciones quirúrgicas, incrementándose el número de infecciones nosocomiales (Cordero *et al.*, 2002; Taylor y Unakal, 2022).

S. aureus se puede transmitir a las personas a través del consumo de alimentos contaminados por falta de higiene y manipulación y por inadecuadas prácticas de cocinado y conservación. Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son los síntomas propios de una gastroenteritis: náuseas, vómitos, dolores estomacales y abdominales. Los síntomas aparecen rápidamente (1-6 h) tras la ingesta del alimento contaminado y pueden durar de 1 a 2 días (Seguridad Alimentaria, 2021).

El tratamiento para combatir este microorganismo depende del grado de la infección y la parte del cuerpo afectada, por ejemplo en aquellos pacientes adultos que presentaran lesiones de piel, particularmente forúnculos, abscesos y celulitis, sin evidencia de compromiso sistémico y que requirieran tratamiento antibiótico oral, las drogas de elección son trimetoprima-sulfametoxazol (TMP/SMX) 160/800 mg, 1 o 2 tabletas cada 12 h, minociclina o doxiciclina 100 mg cada 12 h y clindamicina 300 a 600 mg cada 8 h (Lautaro *et al.*, 2014).

En el caso de las infecciones invasivas, en pacientes con evidencia de compromiso del estado general (fiebre, hipotensión, leucocitosis) o con focos extracutáneos y que requieran tratamiento endovenoso, las sugerencias incluyen como droga de elección vancomicina, la cual continúa siendo la recomendación estándar en este tipo de pacientes (Liu *et al.*, 2011).

En las guías de la Infectious Diseases Society of America (IDSA) se recomienda el uso de la vancomicina para el tratamiento de bacteriemias, se sugiere con una dosis de carga de 25-30 mg/kg, a pasar en 2 horas, seguido de una dosis de mantenimiento de 15-20 mg/kg cada 12 horas.

Sin embargo, la vancomicina es un antibiótico que tiene algunas limitaciones como, por ejemplo, pobre penetración tisular e intracelular, falta de actividad contra microorganismos que crecen en el interior del biofilm, lento efecto bactericida, falta

de interferencia con la producción de toxinas y escasa actividad contra aislados heterorresistentes o con resistencia intermedia (Deresinski, 2007).

Existen diferentes alternativas que pueden ser consideradas para el tratamiento de infecciones invasivas por SAMR uno de ellos es daptomicina que es un lipopéptido cíclico, considerado como tratamiento alternativo para el manejo de bacteriemia por SAMR según las guías de IDSA (Liu *et al.*, 2011). En un estudio clínico aleatorizado, daptomicina demostró ser superior a vancomicina en el tratamiento de pacientes con bacteriemia complicada o endocarditis por *S. aureus*, se documentó un resultado exitoso para 53 de 120 pacientes que recibieron daptomicina en comparación con 48 de 115 pacientes que recibieron la terapia estándar (44.2% frente a 41.7% (Fowler *et al.*, 2006).

Otra de las alternativas es el linezolid, los resultados de un estudio clínico llevado a cabo en pacientes con neumonía intrahospitalaria, demostró superior eficacia de linezolid en comparación con vancomicina adecuadamente dosificada (dosis de carga seguida de dosis según peso corporal) llevaron a algunos autores a sugerir que el uso de linezolid podría ser preferible al de vancomicina en pacientes con neumonía necrotizante por SAMR-AC (Wunderink, 2013).

2.1.2 Generalidades de *E. coli*

E. coli es una bacteria Gram negativa de forma bacilar (Figura 3a,b) que pertenece a la familia Enterobacteriaceae (Bergey *et al.*, 1994; Jang *et al.*, 2017). Entre algunos de sus múltiples atributos se sabe que es el principal anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativo, reduce nitratos a nitritos, y produce vitamina B y K (Rodríguez, 2002; Pontrelli *et al.*, 2018). Forma parte de la flora normal microbiana del colon humano en donde participa de manera importante en el control fisiológico. Se transmite, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afecta principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes (Hernández, 2011).

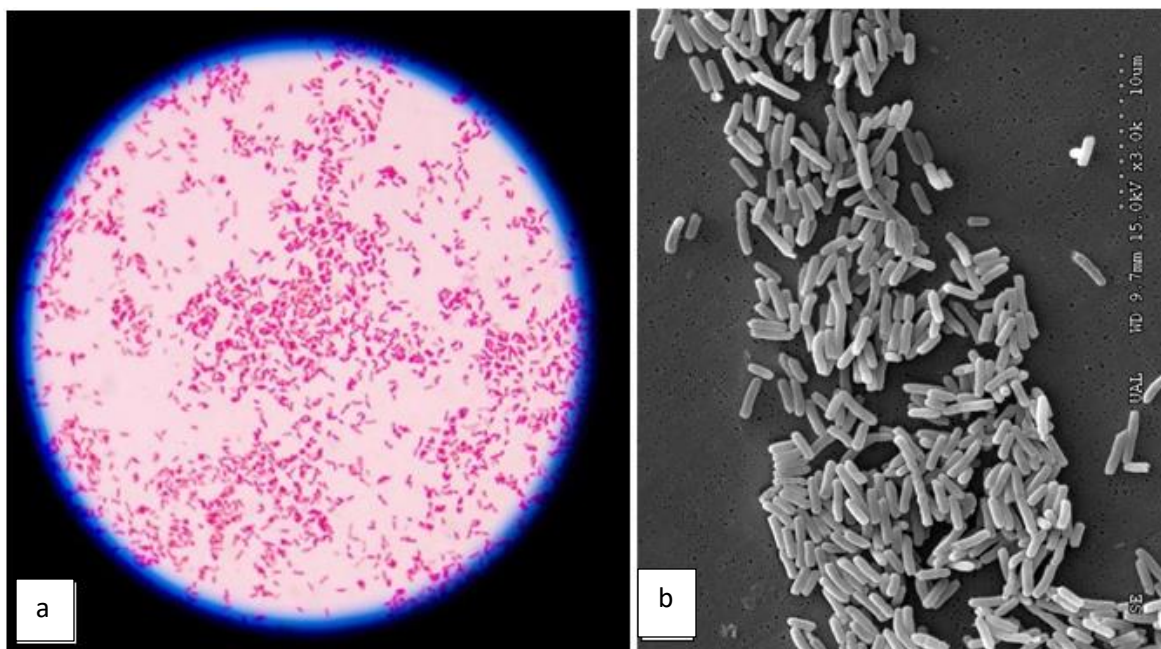


Figura 3: *E. coli*, bacteria Gram negativa de forma bacilar a) microscopía óptica 40x, b) microscopía electrónica de barrido 3x. Imágenes tomadas de <https://medicoplus.com/ciencia/tincion-gram> y de <https://www.biologiasur.org/index.php/92-microscopio-electronico-de-barrido>, respectivamente.

Hasta hoy, se han podido identificar por lo menos seis categorías de *E. coli* que provocan enfermedades en el humano: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherentefusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC) incluyendo septicemia, neumonía, meningitis, gastroenteritis, infecciones en vías urinarias y diarrea (Tabla 1) (Vidal *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2017).

En algunos estudios realizados por el Instituto de Referencia Epidemiológica (InDRE) se encontró que el grupo más frecuente es el de ETEC (48%), seguido del EIEC (9%), el EPEC (4%), y el EHEC (1%). También se determinó que la presencia de *E. coli* es mayor durante los meses húmedos y calurosos, y que afecta a menores de cinco años (Rodríguez, 2002; Jang *et al.*, 2017).

ETEC es el agente más frecuentemente asociado a diarrea infantil en el mundo y el que está asociado con mayor mortalidad y morbilidad en niños menores de 5 años, después de rotavirus (Qadri *et al.*, 2005; Fleckenstein y Kuhlmann, 2019). Además, se le reconoce como el agente más frecuentemente asociado a diarrea del viajero

(Hill, 2010). ETEC se define como aquellas cepas de *E. coli* que expresan la enterotoxina termolábil LT y/o la enterotoxina termoestable ST y que son capaces de colonizar el intestino humano mediante factores de colonización (Porter, 2011).

El primer patotipo de *E. coli* asociado a diarrea en lactantes se le denominó *E. coli* enteropatógena (EPEC) y fue descrita por primera vez en 1938 (Clarke, 2001). *E. coli* enteropatógena “clásica” induce diarrea prologada, preferencialmente en niños menores de un año y aunque se ha descrito mundialmente, su prevalencia más alta se reporta en Brasil (Araujo *et al.*, 2007).

ECEP “clásica” se define como aquella *E. coli* que posee una isla de patogenicidad de ~40 Kb cromosomal llamada locus de eliminación de microvellosidades intestinales. Con los datos epidemiológicos obtenidos dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de Salud en México, se advirtió que el EPEC puede causar de 17% a 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país. Esto indica que, en México, uno de cada cinco niños que enferma de diarrea puede estar infectado por este grupo de *E. coli* (Vidal *et al.*, 2007).

Tabla 1: Categorías de *E. coli*. Imagen tomada de Rodríguez-Ángeles, 2002

CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESCHERICHIA COLI CAUSANTES DE DIARREA				
Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes	Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9 O15:H11, O20:H-, O25:H-O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
EHEC	SUH, CH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7 O26:H11, O103:H2, O113:H21 O119, O128, O145	STX A/E Intimina pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disentérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H	Invasividad Plásmido de 140MDa
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H-O127	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70MDa

EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteínas Pet y Pic OMP Plásmido de 60 MDa Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP
LT= toxina termolábil		EAF= factor de adherencia de EPEC		
ST= toxina termo estable		OMP= proteína de membrana externa		
CFA= factor de colonización antigénico		STX= toxina shiga		
BFP= pili con forma rizada		EAST= toxina ST de cepas enteroagregativas		

La infección del torrente sanguíneo es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas en todo el mundo; *E. coli* es el patógeno más comúnmente asociado a dicha infección y en la población hospitalizada causa aproximadamente 30% de los casos de bacteriemia (Davies *et al.*, 2016). La bacteriemia por *E. coli* también se ha asociado a la prolongación de la estancia hospitalaria y a las dificultades del tratamiento con antibióticos debido a las cepas resistentes, esto incrementan los costos de atención médica y tienen un impacto clínico y económico sustancial (Laupland *et al.*, 2014).

2.2 Metabolismo secundario de plantas medicinales antibacterianas

Según la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO), se calcula que las dos terceras partes de la población mundial, es decir, 4,000 millones de personas recurren al uso de plantas medicinales (Falconi *et al.*, 2018). En América Latina existen alrededor de 250,000 especies de plantas y alrededor del 25% de los medicamentos en la farmacopea se derivan de ellas. Del total de las plantas medicinales sólo se han estudiado cerca del 10% (Falconi *et al.*, 2018). Lo que indica grandes oportunidades para realizar investigación y un gran potencial sobre el desarrollo de futuros medicamentos como los antibióticos.

Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevos tratamientos, sobre todo si su contenido de fitoquímicos es de poco o nulo efecto

tóxico. Ante esto, los estudios científicos promueven la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antibacteriana por lo que, el empleo de plantas medicinales constituye una alternativa viable (Mahato y Sharma, 2018).

Los principios bioactivos de plantas medicinales son generalmente metabolitos secundarios (MS), los cuales se clasifican de acuerdo con la ruta de su biosíntesis en: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos, 2009). Se han reportado MS que tienen actividad antibacteriana entre los que se encuentran a los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y cumarinas) (Majdi *et al.*, 2011; Pareek *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2006) y terpenos (lactonas sesquiterpénicas) (Pareek *et al.*, 2011; Jamal *et al.*, 2014) a través de mecanismos de acción como la degradación de la membrana plasmática o pared celular del microorganismo, así como inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos o del metabolismo energético, o por tener la capacidad de inactivar toxinas, entre otros (Sepúlveda, 2004; Al-Snafi, 2019).

En la actualidad, se conocen aproximadamente 100,000 estructuras de MS que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados (Ashraf *et al.*, 2018). Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda *et al.*, 2003; Ashraf *et al.*, 2018) (Figura 4 y 5).

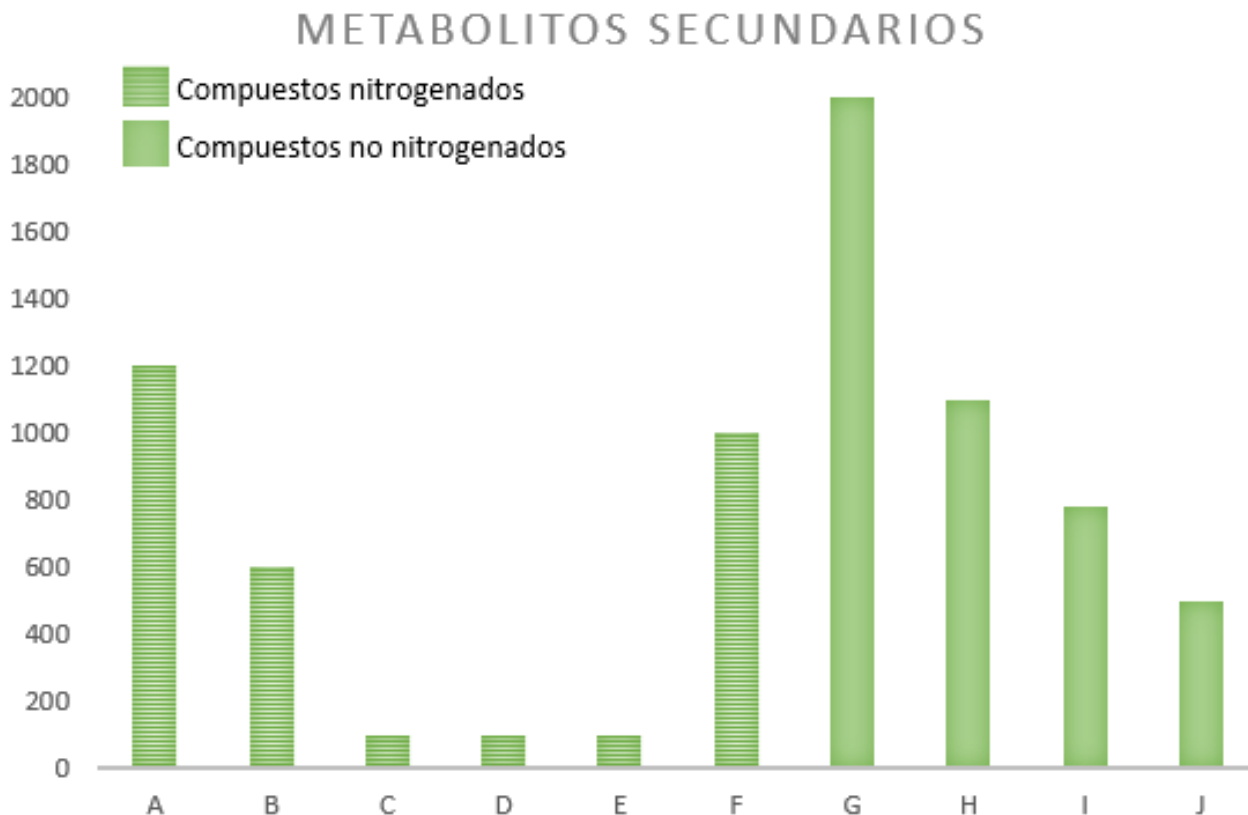


Figura 4: Clasificación y número de estructuras que se conocen de los metabolitos secundarios de plantas. Compuestos nitrogenados A. alcaloides; B, aminoácidos no proteicos; C, aminas; D, glucósidos; E, glucosinolatos. Compuestos no nitrogenados, G, terpenos; H, flavonoides; I, poliacetilenos; J, Policétidos. Tomado de: Sepúlveda *et al.*, 2003

En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plastidios; los esteroides, sesquiterpenos y dolícoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria. Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999; Gani *et al.*, 2021).

Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos (Eisenreich *et al.*, 2001; Zhou y Pichersky, 2020). Los monoterpenos tales como el mentol, que es un

antimicrobiano, el citronelal, que es un repelente de insectos y las piretrinas que funcionan como venenos del sistema nervioso de los insectos, son componentes químicos con actividad biológica potencial durante la respuesta de defensa de las plantas que los producen (Sepúlveda *et al.*, 2003; Cappellari *et al.*, 2020).

Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides, se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinolólicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (Facchini, 2001; Lichman, 2021). Sus efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink y Schimmer, 1999; Schramm *et al.*, 2019).

Los fenilpropanoides son compuestos que se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilos y se sintetizan a partir de un precursor común, el ácido cinámico, derivado de la fenilalanina por la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (Sepúlveda *et al.*, 2003). Se pueden dividir en derivados de hidroxicinamoilo, lignanos, estilbenos, cumarinas, antocianinas y flavonoides (Vogt, 2010; Kim *et al.*, 2019).

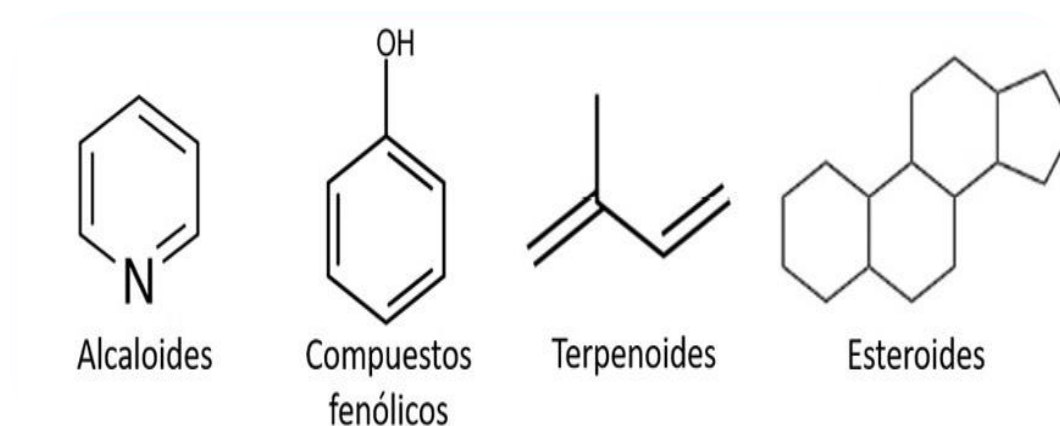


Figura 5: Principales grupos de metabolitos secundarios y sus estructuras generales.

2.3 *Tanacetum parthenium*

2.3.1 Botánica y distribución

T. parthenium (Asteraceae), es una planta parecida a una margarita que crece por encima de los 1300 m de altitud, que se encuentra en los jardines y en los bordes de los caminos, el nombre deriva de la palabra latina febrifugia, "reductor de fiebre" (Pareek *et al.*, 2010). Es una especie perenne aromática, tupida y corta que crece entre 0.3 y 1 m de altura. Sus hojas de color amarillo verdoso suelen tener menos de 8 cm de largo y pinnado-bipinnado (parecido a un crisantemo) (Figura 6a-d), es una planta aromática de un olor fuerte (Pareek, *et al.*, 2010). Florece de julio a octubre, son amarillas, con aproximadamente de 2 cm de diámetro parecidos a los de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*), por lo que a veces se confunden, y tienen una sola capa de floretes blancos (Jain *et al.*, 1999). Originaria de la península de los Balcanes, ahora se encuentra en Australia, Europa, China, Japón, África del Norte y América Latina. A mediados del siglo XIX, *T. parthenium* se introdujo en los Estados Unidos (Pareek *et al.*, 2010). La planta crece a lo largo de los bordes de las carreteras, campos, áreas de desechos y a lo largo de los límites de los bosques del este de Canadá hasta Maryland y hacia el oeste hasta Missouri. Se le conoce también con otros nombres: *Chrysanthemum parthenium*, matricaria, altamisa, *Leucanthemum parthenium*, *Matricaria capensis*, *Matricaria eximia* hort, *Matricaria parthenium* L., Santa María, entre otros (Pareek *et al.*, 2010).

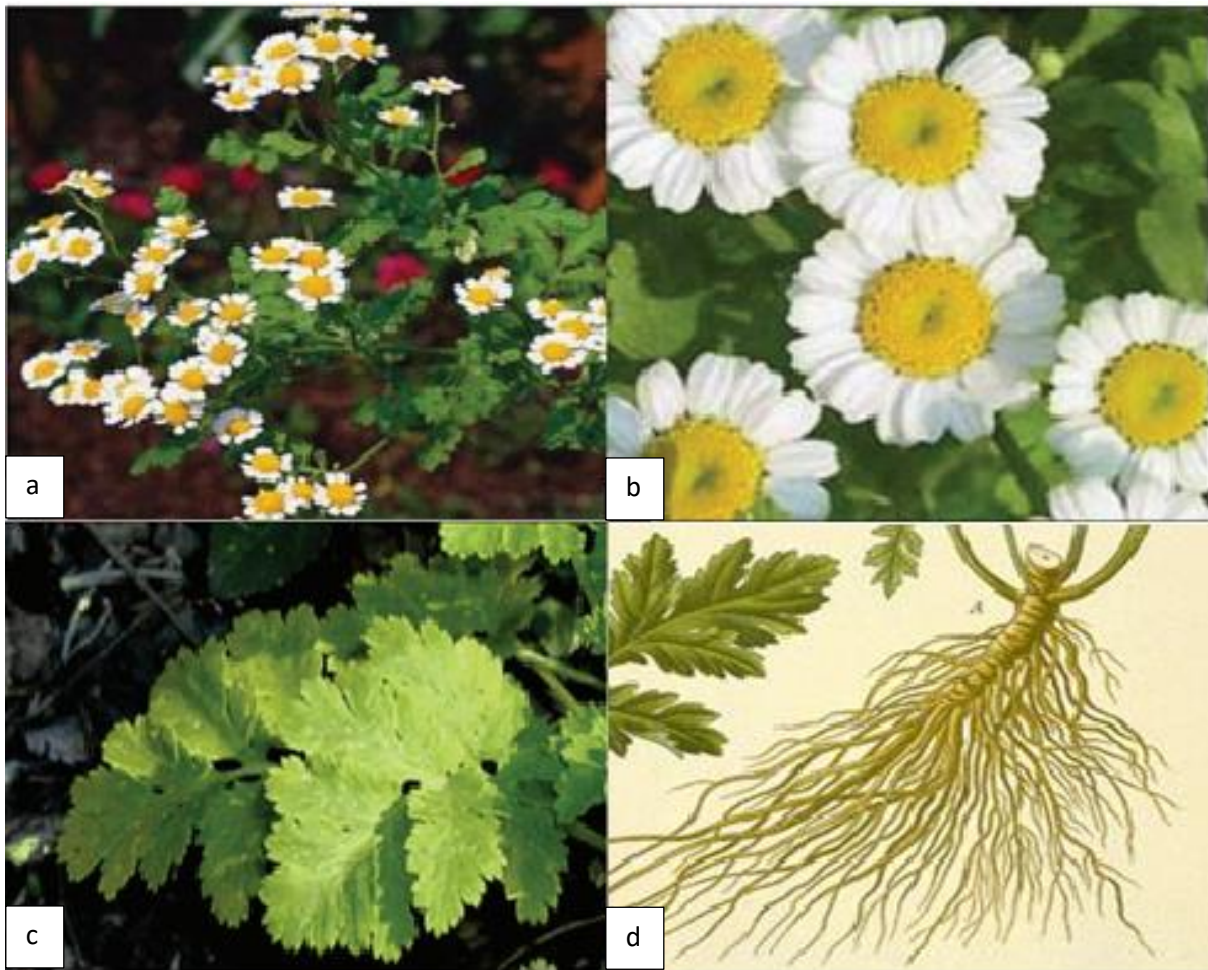


Figura 6: Morfología de *T. parthenium*. a) planta completa, b) flor, c) hojas y d) raíces. Tomado de Pareek *et al.*, 2010

2.3.2 Usos en la Medicina Tradicional

Históricamente esta planta ha sido de mucha importancia ya que el médico griego Dioscórides en el siglo I la usaba como antipirético, y en el siglo XVIII se le conocía como aspirina (Pareek *et al.*, 2010).

Tradicionalmente, la hierba se ha utilizado como antipirético, de lo que deriva su nombre común. Los preparados de esta planta también se han usado para tratar la artritis, el asma, estreñimiento, dermatitis, dolor de oídos, fiebre, dolor de cabeza también en el tratamiento de migraña, dolores de estómago, dolores de muelas, picaduras de insectos, infertilidad y en el trabajo de parto (Pareek *et al.*, 2010; Di Giocamo *et al.*, 2019).

Los indios Kallaway de la Cordillera de los Andes valoran su uso para tratar los cólicos, el dolor de riñones, las náuseas matutinas y el dolor de estómago (Pareek *et al.*, 2010). Los costarricenses usan una decocción de la hierba para ayudar a la digestión, como cardiotónico, y como enema para gusanos. En Venezuela, se utiliza para tratar los dolores de oído (Pareek *et al.*, 2010).

Los usos de *T. parthenium* en la Medicina Tradicional Mexicana son diversos y que llegan a ser diferentes en función de los Estados de la República Mexicana donde se distribuye la especie (Figura 7). Uno de los usos medicinales más frecuentes que se registra es para diversos malestares propios de la mujer. En los Estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Morelos, México, Tlaxcala y Veracruz se toma el cocimiento de las ramas o de las flores para aliviar trastornos de la menstruación facilitándola o regularizándola; como antiespasmódico contra la dismenorrea y cólicos menstruales. Durante el embarazo, previo al parto, se emplea para acelerarlo y posterior a éste, para prevenir trastornos, espasmos y para tener una buena recuperación del parto, se dan baños de temazcal con su cocimiento (BDMTM, 2009).



Figura 7: Estados de la República Mexicana donde se usa *T. parthenium*.

En Puebla se recomienda tomarla en infusión y hacerse lavados locales confortables con un cocimiento combinado con árnica (*Heterotheca inuloides*), epazote de zorrillo (*Teloxys graveolens*), mejorana (*Origanum majorana*), oreja de burro, lirio blanco y lirio negro para los "michicahues de mujer", enfermedad que se presenta por tener relaciones sexuales durante la menstruación (BDMTM, 2009).

Asimismo, es común su uso en el centro del país para tratar el "aire o mal aire", enfermedad caracterizada por los siguientes síntomas, o un conjunto de éstos: enfriamiento del cuerpo, lagrimeo, punzadas o vómito (BDMTM, 2009)

T. parthenium también se ha plantado alrededor de las casas para purificar el aire debido a su olor fuerte y duradero (Pareek *et al.*, 2010).

2.3.3 Metabolitos secundarios de *T. parthenium* y su actividad antibacteriana

T. parthenium produce MS tipo fenólico y terpeno los cuales tienen propiedades farmacológicas (Wu *et al.*, 2006; Pareek *et al.*, 2011). Según estudios recientes, los aceites esenciales (terpenos) de *T. parthenium* exhiben actividad antiinflamatoria (Brown *et al.*, 1996; Ghantous *et al.*, 2013), anticancerígena (Ghantous *et al.*, 2013) y antibacteriana (Akpulat *et al.*, 2005; Salamci *et al.*, 2007).

Respecto a la actividad antibacteriana, un estudio del aceite esencial de *T. parthenium* (conteniendo alcanfor, acetato de bornilo, canfeno, isovalerato de bornilo, borneol, y β -eudesmol, mayoritariamente), mostró tenerla sobre cuatro bacterias Gram positivas y cuatro Gram negativas, entre las cuales está *S. aureus*, con un diámetro de la zona de inhibición de 24 mm y una concentración mínima inhibitoria de 8 μ L/mL (Mohsenzadeh *et al.*, 2011). El hallazgo mostró que el aceite esencial estudiado tiene un efecto antibacteriano relativamente bueno, sin actividad toxica significativa, por lo que tienen gran potencial para ser utilizados como producto natural para la salud (Mohsenzadeh *et al.*, 2011).

El grupo más importante de MS de *T. parthenium*, son las lactonas sesquiterpénicas a quienes se les debe sus propiedades farmacológicas, la principal de ellas, la partenólida (Figura 8), un MS que ha demostrado actividad antibacteriana contra *S.*

aureus con un diámetro de la zona de inhibición de 24 mm y una concentración mínima inhibitoria de 8 $\mu\text{L/mL}$ (Mohsenzadeh *et al.*, 2011).

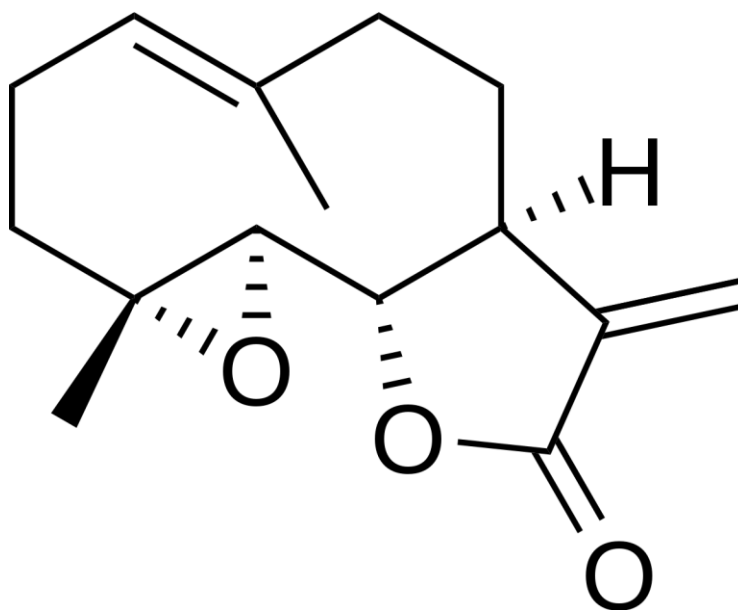


Figura 8: Estructura química de la lactona sesquiterpénica partenólida

2.3.4 Cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos vegetales

El cultivo *in vitro* es una técnica que se utiliza en diversos campos de la biología para mantener organismos vivos, o partes de estos, bajo condiciones controladas dentro de un laboratorio. Si bien, las áreas más desarrolladas de esta técnica son la microbiología y la biología celular de líneas celulares animales, el cultivo de tejidos vegetales también ha mantenido un desarrollo constante en las últimas décadas (UIT, 2019).

Debido al incremento de la población mundial, que se estima en 8 mil y 9 mil 300 millones para los años 2025 y 2050 respectivamente (PRB 2005), y específicamente en México, por ejemplo, a una tasa anual de crecimiento poblacional de 1.9%, se proyecta una población de 140 millones de habitantes para el 2050, lo que representa un incremento del 30% en la demanda de alimentos con respecto a las necesidades actuales (PRB 2005). Por lo que en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, mejorar cultivos, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y

obtener MS de interés farmacológico (Pérez, 1998; Chandran *et al.*, 2020). El cultivo *in vitro* de plantas, también llamado cultivo de tejidos vegetales, se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul 2000; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales ha merecido especial atención debido a que comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos o células en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Roca, 1991; Pérez, 1998; Chandran *et al.*, 2020). A partir de un explante se pueden establecer cultivos de células para producir compuestos de interés, o para obtener embriones somáticos y semillas artificiales, entre otras aplicaciones (Figura 9).

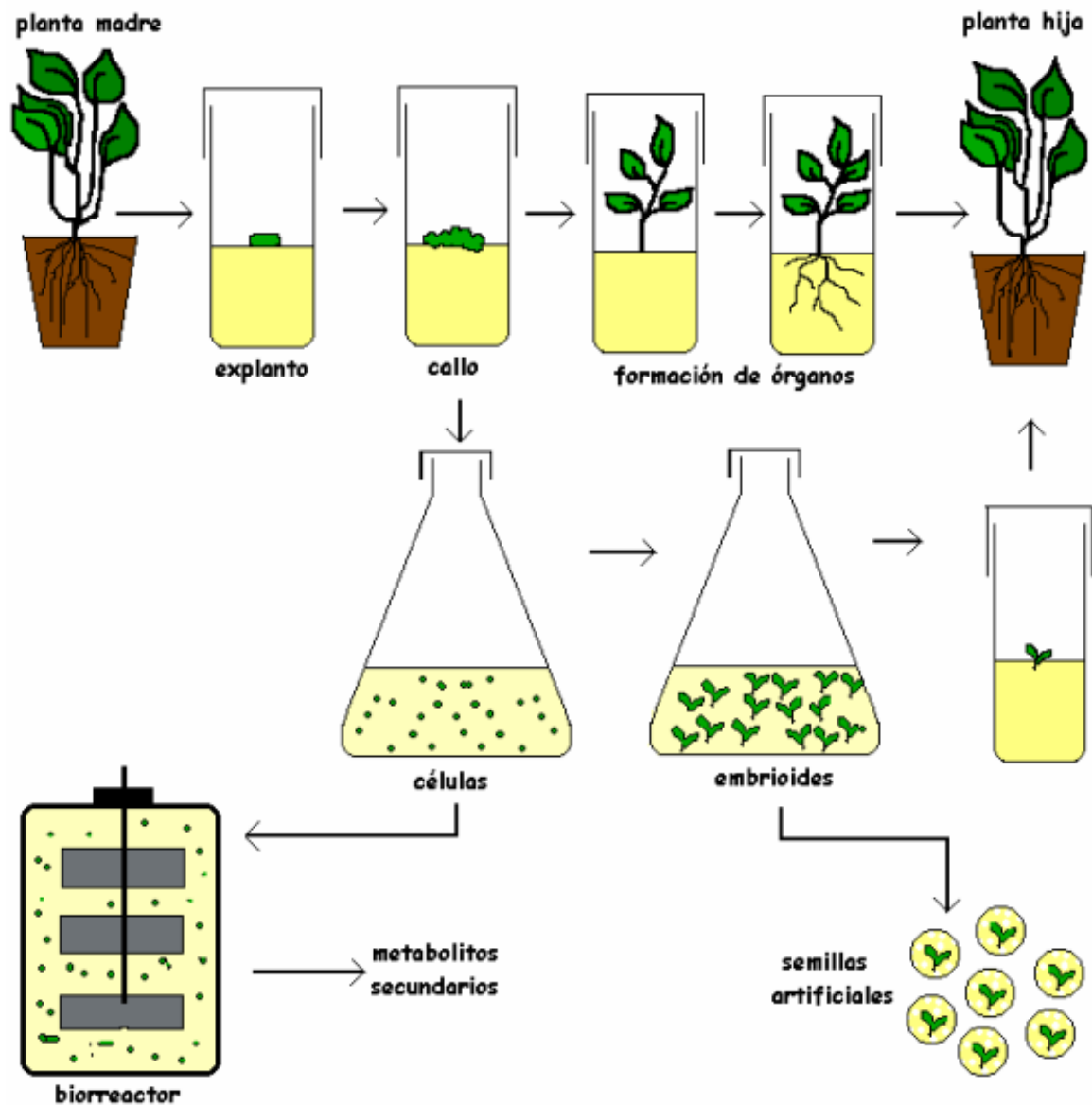


Figura 9: Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales. Imagen modificada de "Biotecnología", UNQ 2006.

Cada grupo de plantas, requiere de una variedad y concentración específica de nutrientes, lo cual aumenta los costos para realizar esta técnica. En 1962, Toshio Murashige y Folke Skoog desarrollaron un medio de cultivo que contiene nutrientes básicos para el crecimiento de la mayoría de las plantas (UIT, 2019).

Hoy esta técnica tiene numerosas aplicaciones (Sergretín, 2006; Espinosa-Leal *et al.*, 2018):

- Propagación masiva de plantas, especialmente para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción.
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año.
- Obtención de plantas libres de virus.
- Producción de semillas sintéticas.
- Conservación de germoplasma (conjunto de individuos que representan la variabilidad genética de una población vegetal).
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Producción de nuevos híbridos.
- Mejora genética de plantas (incluyendo obtención de plantas transgénicas).
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para establecer un cultivo y dicha elección es determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Mroginski *et al.*, 1991; Chandana *et al.*, 2018).

El cultivo de raíces *in vitro* puede mostrar buen crecimiento y producción de MS en cantidades equivalentes o mayores a las producidas por plantas cultivadas en condiciones naturales (Pérez *et al.*, 2011). Las raíces vegetales también pueden ser cultivadas en biorreactores las cuales producen un aumento abrupto en el tamaño y ramificación de la raíz, aumentando así la biomasa, y por ende la cantidad del producto deseado. Un ejemplo de compuesto farmacológico producido por cultivo de raíces es el paclitaxel, comercializado como taxol, que es utilizado como anticancerígeno (Sergretín, 2006; Sahai y Sinha, 2022).

Particularmente en un estudio realizado a partir de cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium* se obtuvieron 8.1 g/L de biomasa en peso seco, y se obtuvo partenólida a 0.0231 ± 0.011 mg/g y ácidos fenólicos como ácido clorogénico a 2.223 ± 0.111 mg/g , ácido cafeico a 0.851 ± 0.099 mg/g y ácido salicílico a 0.190 ± 0.028 mg/g (Nieto-Trujillo *et al.*, 2017), demostrando que éste tiene la capacidad de producir partenólida y compuestos fenólicos, por lo que los extractos de dicho cultivo podrían mostrar un efecto antibacteriano contra *E. coli* y *S. aureus*.

A partir de la misma línea de raíces en suspensión, se reportó la obtención de 3 fracciones (4TP, 5TP y 8TP) obtenidas de un extracto metanólico, las cuales fueron caracterizadas fitoquímicamente por su contenido total de fenoles (CFT), de flavonoides (FvT), de glucósidos fenilpropanoides (GFPT) y de lactonas sesquiterpénicas (LST) (Nieto-Trujillo, 2020). La fracción 4TP contenía 194.15 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de fracción (mg EAG/g), 6.43 mg equivalentes de quercetina por gramo de fracción (mg EQ/g), 143.56 mg equivalentes de verbascósido por gramo de fracción (mg EV/g) y 6.09 mg equivalentes de partenólida por gramo de fracción (mg EP/g), para CFT, FvT, GFPT y LST, respectivamente. La fracción 5TP contenía 127.15 mg EAG/g, 5.6 mg EQ/g, 58.87 mg EV/g y 10.33 mg EP/g, para CFT, FvT, GFPT y LST, respectivamente. Por último, la fracción 8TP contenía 107.69 mg EAG/g, 11.93 mg EQ/g, 22.17 mg EV/g y 14.72 mg EP/g, para CFT, FvT, GFPT y LST, respectivamente.

2.4 Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.

Existe una amplia variedad de métodos de laboratorio usados para determinar la susceptibilidad de las bacterias ante diferentes agentes microbianos (Ramirez *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2021). El estudio de la sensibilidad *in vitro* de los microorganismos a los antimicrobianos se puede realizar mediante métodos fenotípicos (técnicas de dilución y de difusión), bioquímicos o genéticos. Debido a su simplicidad, los métodos fenotípicos son los primeros que se utilizan cuando se quiere evaluar la sensibilidad de los microorganismos frente a un nuevo compuesto antimicrobiano (Pérez *et al.*, 2021), pero no todos estos métodos tienen la misma

sensibilidad o no están basados en los mismos principios, lo cual provoca que los resultados se vean influenciados dependiendo del método seleccionado, de los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado (Ramirez *et al.*, 2009).

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía. Existe un cuarto método que es el análisis conductimétrico (Ramirez *et al.*, 2009).

Las técnicas más usadas se resumen en la tabla 2 y en estas técnicas siempre se considera la estandarización de la concentración bacteriana a un patrón de 0.5 en la escala de McFarland. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares (Ramirez *et al.*, 2009). Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Ramirez *et al.*, 2009).

Tabla 2: Métodos para el estudio de susceptibilidad microbiana. Tomado de Ramirez *et al.*, 2009.

MÉTODO	CATEGORÍAS	MIC µg/ml
Difusión en agar (discos)	S,I,R	No
Dilución en agar	S,I,R	Sí
Dilución en caldo	S,I,R	Sí
Métodos automatizados	S,I,R	Sí
E-Test	S,I,R	Sí

Abreviaciones: S susceptible, I intermedio, R resistente, MIC concentración mínima inhibitoria

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (EUCAST, 2000).

2.4.1 Método de dilución

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) (Ramírez

et al., 2009) y la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Isada *et al.*, 2001; Eloff, 2019), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (MBCs) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Ramírez *et al.*, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (Wilkinson, 2007).

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Ramírez *et al.*, 2009).

2.4.2 Métodos de difusión

El método de difusión en agar está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Barry *et al.*, 1979; Saviano y Lourenço, 2018). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, 1966 (método de Kirby-Bauer).

Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos (Ramírez *et al.*, 2009).

El objetivo es cuantificar el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; Saviano y Lourenço, 2018).

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de diámetro conocido, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Hacek *et al.*, 1999; Saviano y Lourenço, 2018).

2.4.3 Bioautografía

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bioguiado (Ncube *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2020) realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada TLC (Beghe, 1972; Zang *et al.*, 2020)

El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una caja de Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium (Silva MTG, 2005; Zang *et al.*, 2020).

Entendiendo este contexto de técnicas podemos concluir que al utilizar la técnica de dilución a un utilizando sólo dos concentraciones, esta técnica exige mucho trabajo técnico y es lenta para la interpretación de los resultados Al igual que la técnica de difusión, en las de dilución, hay que controlar el medio de cultivo, el

inóculo bacteriano, el antibiótico y/o extractos vegetales (Herrera, 1999; Zang *et al.*, 2020)

La técnica de difusión en agar presenta varias ventajas como:

- a. es fácil de efectuar y de gran reproducibilidad
- b. bajo precio
- c. no requiere equipo especial
- d. sus resultados son fácilmente interpretados por los clínicos
- e. es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar
- f. fue diseñada para bacterias con crecimiento rápido tal es el caso de *Staphylococcus* sp. O los integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* (Herrera, 1999)

2.5 Medios de cultivo para crecimiento bacteriano

Los microorganismos necesitan condiciones bioquímicas y biofísicas óptimas para su desarrollo. El objetivo principal de los medios de cultivo es crear un ambiente adecuado para el crecimiento de bacterias simulando circunstancias similares a las de sus ambientes naturales, asegurando de manera apropiada el funcionamiento enzimático de los microorganismos lo que asegura un adecuado balance de los componentes (Gómez *et al.*, 2006; Bonnet *et al.*, 2020). Para el desarrollo de un medio de cultivo es necesario seleccionar adecuadamente los componentes a usar, esto incluye la selección del tipo y la concentración de los diferentes nutrientes, como: fuente de carbono, energía, nitrógeno, fósforo, factores de crecimiento entre otros y tales condiciones como concentración de oxígeno, temperatura y pH (Núñez, 2003; Bonnet *et al.*, 2020)

2.5.1 Soya tripticasa

Medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos (Tabla 3) (Nikseresht *et al.*, 2020). Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de soya aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soya además es fuente de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de diversos microorganismos. El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril (Britasheep) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

Tabla 3: Microorganismos que crecen de manera satisfactoria en el medio de cultivo agar Soya tripticasa. Tomado de: britanialan.com

CONTROL DE CALIDAD	
MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Satisfactorio
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Satisfactorio
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Satisfactorio
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Satisfactorio

2.5.2 Mueller-Hinton

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos (Bilinskaya *et al.*, 2020).

Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano (Tabla 4). Por su composición, ha sido recomendado por el Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Tabla 4: Cultivo *in vitro* de algunos grupos microbianos y recomendaciones de incubación. Tomado de: britanialan.com Mueller-Hinton

MICROORGANISMO	INÓCULO MICROBIANO	INCUBACIÓN
<i>Enterobacterias</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis, a 35 ± 2 °C durante 16 a 18 h
<i>Enterococcus</i> spp.	Crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland.	En aerobiosis, a 35 ± 2 °C durante 16 a 18 h. Si se ensaya el disco de vancomicina 30 µg incubar 24 h
<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Burkholderia cepacia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland	En aerobiosis, a 35 ± 2 °C durante 20 a 24 h
<i>Staphylococcus</i> spp.	Suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland	En aerobiosis, a 35 ± 2 °C durante 16 a 18 h. En el caso que se ensayen los discos de cefotaxima, con <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa y en todos los casos al ensayar oxacilina y vancomicina, incubar las placas durante 24 h.
<i>Vibrio cholerae</i>	Suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland	En aerobiosis a 35 ± 2 °C durante 16 a 18 h
<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus viridans</i>. <i>Streptococcus</i> spp. beta hemolítico.	Suspensión directa de la colonia equivalente al estándar 0,5 de Mc Farland	En atmósfera con 5 % de CO ₂ , a 35 ± 2 °C durante 20 a 24 h.

3. JUSTIFICACIÓN

Diversas enfermedades infecciosas importantes en humanos y animales son causadas por bacterias, tal es caso de *S. aureus* que produce una enterotoxina estable al calor durante su crecimiento en los alimentos. Estas enterotoxinas (> 106 ufc/gramo) causan náuseas, dolor abdominal y vómitos usualmente entre 1 y 6 horas posteriores a la ingestión de alimentos contaminados. También se presenta diarrea, pero con menor frecuencia (Massoc, 2008). *S. aureus* puede producir lesiones en la piel (Lautanro *et al.*, 2014). Caso similar al de *E. coli* que produce enfermedades como la gastroenteritis caracterizada por: diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y fiebre; así como bacteriemia (Massoc, 2008), ambas son las bacterias patógenas que se aíslan con más frecuencia en las infecciones hospitalarias y comunitarias y tienen mayor incidencia en la población infantil (Cervantes, 2014; Portillo y Pozo, 2018).

Aunado a lo anterior, la resistencia a los antibióticos compromete la prevención y el tratamiento eficaz y constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial (RHOVE, 2015), amenazando el progreso y causando un retroceso de la medicina moderna a la era pre-antibiótica, permitiendo la transmisión de microorganismos infecciosos de un individuo a otro, aumentando los costos en la atención de salud y amenazando la seguridad sanitaria, perjudicando el comercio y la economía (Calderón, 2016). Se ha observado que *S. aureus* se ha hecho resistente a penicilina, desde su introducción en los años 40 (Velazquez, 2005). Los primeros aislamientos clínicos de *S. aureus* multirresistentes fueron recabados en 1957, y a principios de 1960 presentaban resistencia a la gran mayoría de los antibióticos (Panlilo *et al.*, 1992). Otro ejemplo de resistencia es la meticilina, que es un derivado semisintético de la penicilina (Velazquez, 2005). En este sentido la resistencia a antibióticos también ha afectado a *E. coli* siendo resistente a algunos de los siguientes antibióticos: ampicilina, trimetoprima-sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol y ácido nalidíxico, lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico (Mosquito *et al.*, 2011).

Se estima que en los próximos años y hasta 2050 ocurrirán 10 millones de muertes al año a nivel mundial por infecciones bacterianas, además, su impacto en la economía mundial será de hasta 100 trillones de dólares (PUIS *et al.*, 2018). Se lee descontextualizada esta información

Por esta razón es importante continuar en la búsqueda de nuevos principios bioactivos de origen vegetal para el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos, tales como los producidos por *T. parthenium* que, a partir de cultivos de raíces en suspensión se espera que los compuestos de tipo fenólico y/o lactona sesquiterpénica, tipos de metabolitos secundarios que se han reportado como agentes antibacterianos, representen una fuente potencial de antibacterianos contra *E. coli* y *S. aureus* y así ofrecer posibles alternativas para combatir la creciente incidencia de enfermedades infecciosas bacterianas que ponen en riesgo la salud pública nacional y mundial, debido a su resistencia a antibióticos y a la disminución de opciones de tratamiento efectivo.

4. HIPOTESIS

Las fracciones de un extracto metanólico obtenido de un cultivo de raíz en suspensión de *T. parthenium*, al contener metabolitos secundarios tipo fenólico y lactona sesquiterpénica, tendrán actividad antibacteriana sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

-Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de fracciones de un extracto metanólico obtenido de un cultivo de raíz en suspensión de *T. parthenium*, sobre *E. coli* y *S. aureus*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

-Identificar el potencial antibacteriano contra *E. coli* y *S. aureus* de las diferentes fracciones de un extracto metanólico obtenido de un cultivo de raíz en suspensión de *T. parthenium*.

-Correlacionar el contenido total de los diferentes grupos de metabolitos secundarios y la actividad antibacteriana en las tres fracciones

6. METODOLOGIA

6.1 Preparación de las fracciones

Las fracciones secas de *T. parthenium* proporcionados por el laboratorio de Cultivos *in vitro* y fitoquímica fueron identificados como fracciones 4TP, 5TP y 8TP, cada una de estas fueron solubilizadas en agua y DMSO (3%) para obtener la concentración de 800, 600, 400, 200 y 100 $\mu\text{L}/\text{ml}$, que se usaron para cargar los discos de papel filtro con 10 $\mu\text{L}/\text{disco}$, obtenido así concentraciones de 8, 6, 4, 2 y 1 $\mu\text{g}/\text{disco}$ respectivamente (Figura 10). Se empleó vancomicina (1 $\mu\text{g}/\text{disco}$) como control positivo de inhibición para *S. aureus* y cloranfenicol (1 $\mu\text{g}/\text{disco}$) como control positivo de inhibición para *E. coli*; el disolvente agua y DMSO (3%) empleado para disolver las fracciones fue empleado como control negativo, y agua estéril como control de crecimiento. Los discos se dejaron secar y se guardaron etiquetados dentro de microtubos de 2 ml esterilizados previamente (figura 10).

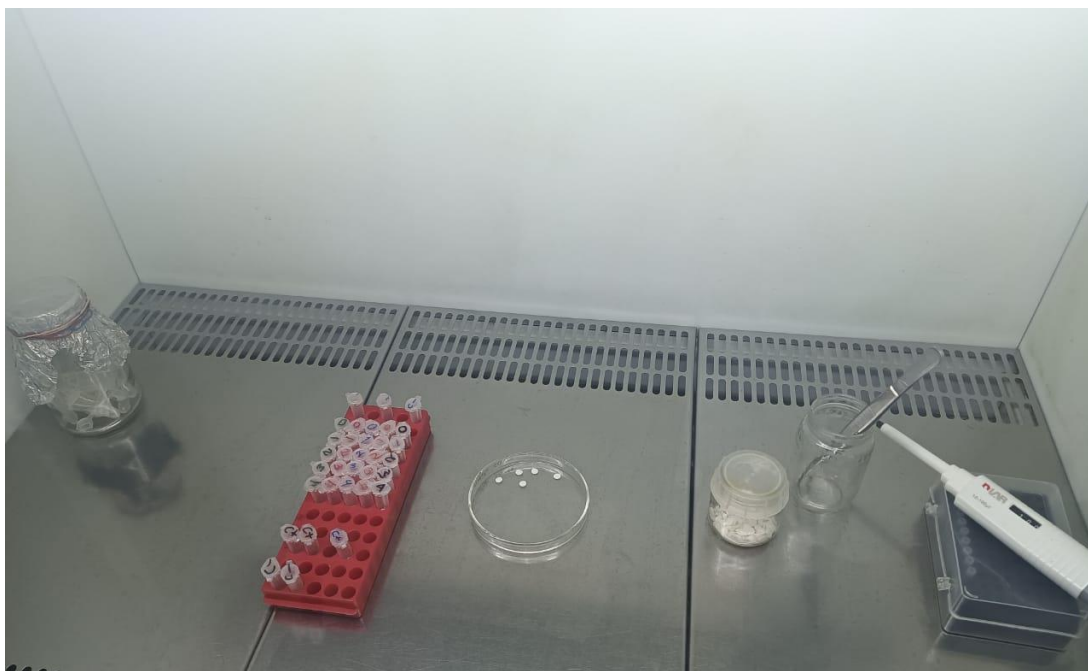


Figura 10: Carga de fracciones, controles positivos y de disolvente en discos de papel filtro bajo condiciones de esterilidad.

6.2 Cepas bacterianas

- *S. aureus* (ATCC 25923)
- *E. coli* (ATCC 25922)

6.3 Medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo Soya Tripticasa (30 g/L) para el crecimiento de las cepas bacterianas y Müller Hinton (21 g/L) para los ensayos antibacterianos (Figura 11). Se empleó agar bacteriológico (8g/L) para solidificar los medios de cultivo y fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 min.

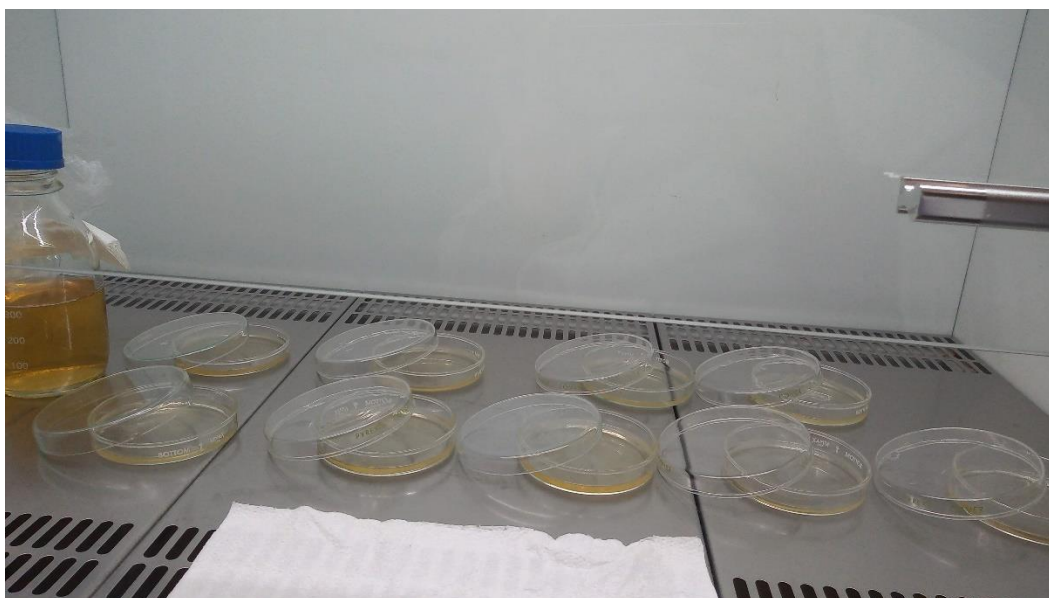


Figura 11: Vertido de medios de cultivo Soya Tripticasa y Müller Hinton en cajas Petri.

6.4 Bioensayos

La metodología del bioensayo *in vitro* se basó en el método Kirby-Bauer (Echeverría-Medina *et al.*, 2017). El inóculo del microorganismo se preparó en caldo soya tripticasa ajustando a 0.5 en escala McFarland (1×10^6 UFC). Posteriormente, mediante estría masiva, se inocularon placas de agar Mueller Hinton y se colocaron discos impregnados con las muestras (Figura 12). Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas, tiempo en el que se determinó el halo de inhibición. Se realizó tinción

de Gram para cotejar pureza de las cepas. Los resultados sobre las dimensiones del halo de inhibición fueron analizados estadísticamente. Los resultados fueron reportados como porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(\text{ZHI de la fracción} - \text{ZHI del control negativo})}{(\text{ZHI del control positivo} - \text{ZHI del control negativo})} * 100$$

donde ZHI corresponde a la zona del halo de inhibición en mm

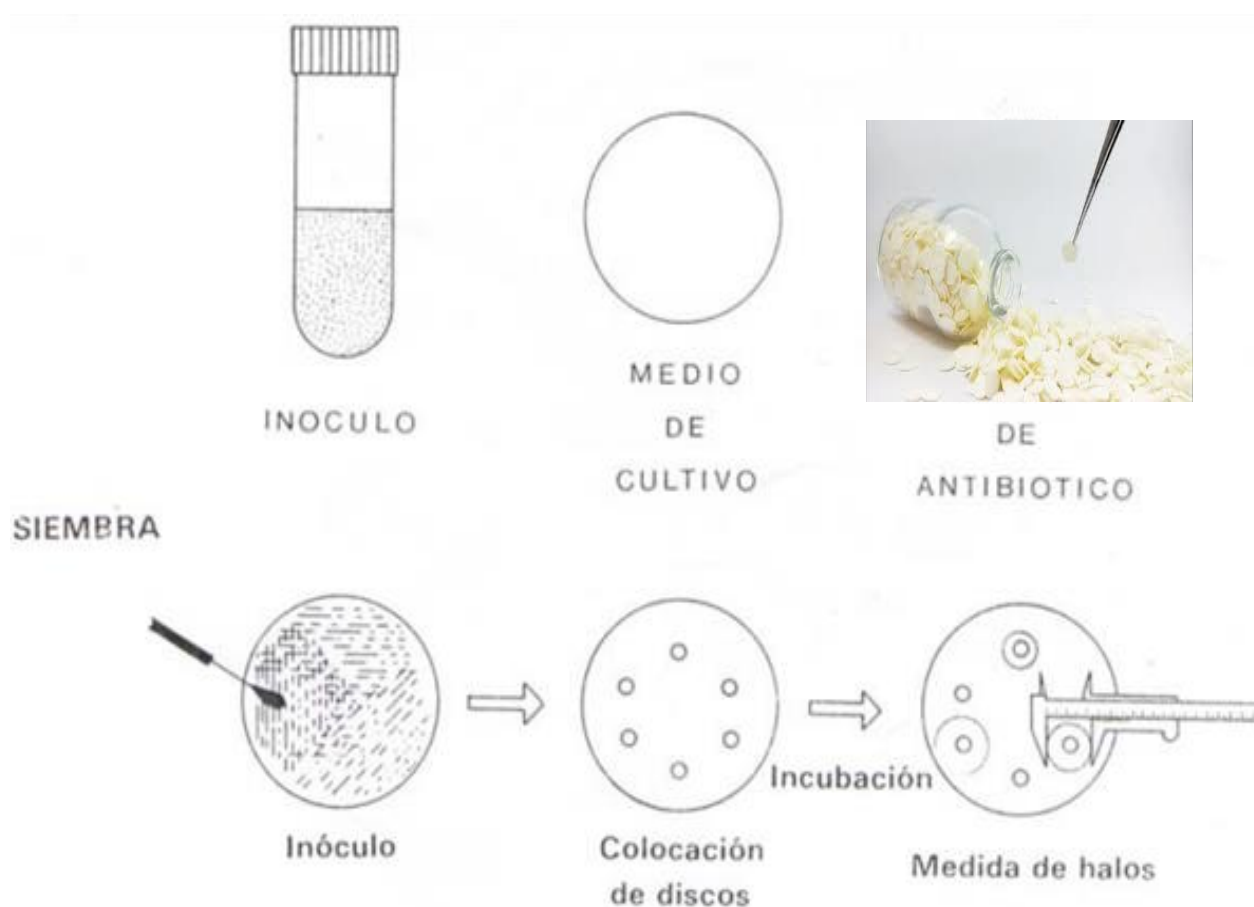


Figura 12: Representación esquemática del método utilizado y descrito en las secciones 6.1-6.4.

6.5 Análisis estadístico

Se realizaron seis repeticiones por triplicado ($n=30$) para cada tratamiento, los resultados fueron sujetos a un análisis estadístico que consistió en un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Tukey-Kramer, valores de $p<0.05$ fueron considerados significativos. Posteriormente se realizó una Correlación de Pearson entre el contenido de metabolitos secundarios totales (fenoles, flavonoides, glucósidos fenilpropanoides y lactonas sesquiterpénicas; empleando los datos de Nieto-Trujillo, 2020 quien previamente caracterizó fitoquímicamente a las fracciones) y la actividad antibacteriana realizada en el presente trabajo. Se usó el software estadístico NCSS (versión 2007).

7. RESULTADOS

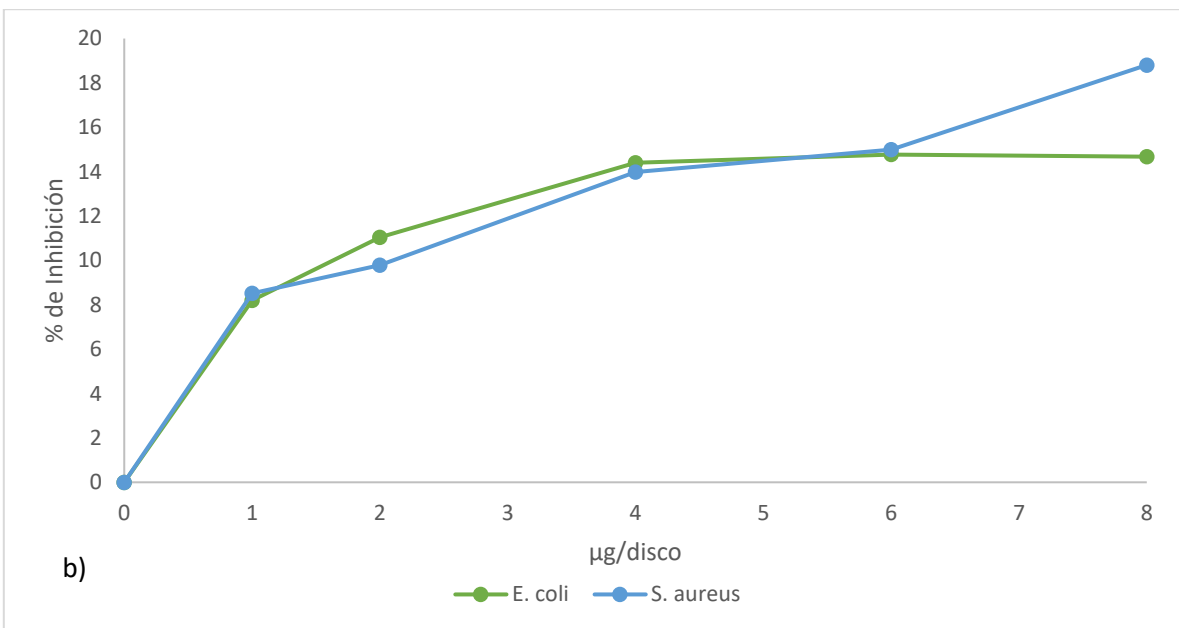
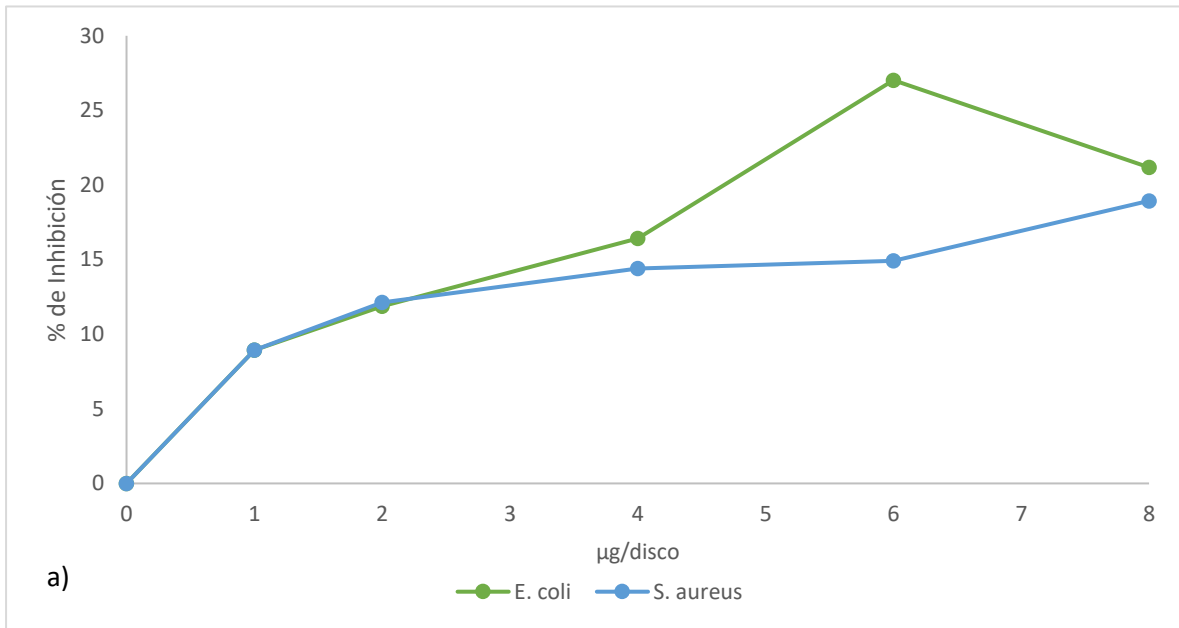
7.1 Bioensayos de fracciones del extracto metanólico de *Tanacetum parthenium*

Todas las fracciones (4TP, 5TP y 8TP) en las diferentes concentraciones probadas (1-8 $\mu\text{g}/\text{disco}$) inhibieron a *E. coli* y *S. aureus* (Figura 14); dicha inhibición fue influenciada en gran medida por la concentración (Figura 13a-c).

La fracción 4TP en *E. coli* a la concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{disco}$ obtuvo el mayor porcentaje de inhibición (27.02%) y fue estadísticamente diferente de los demás tratamientos (Figura 13a). Contra *S. aureus*, el mayor porcentaje de inhibición se alcanzó con la concentración 8 $\mu\text{g}/\text{disco}$ con un 18.93% (Figura 13a).

La fracción 5TP contra *E. coli* a las concentraciones de 4, 6, y 8 $\mu\text{g}/\text{disco}$ consiguió un porcentaje de inhibición de entre 14.40 a 14.76% sin diferencias significativas entre ellas (Figura 13b). La concentración 8 $\mu\text{g}/\text{disco}$ obtuvo mayor porcentaje de inhibición con 18.80% contra *S. aureus* respecto a las demás concentraciones (Figura 13b).

La fracción 8TP se mostró más efectiva contra *E. coli* con una actividad mayor en la concentración de 6 $\mu\text{g}/\text{disco}$ con un 20.39% de inhibición (Figura 13c). Referente al tratamiento contra de *S. aureus* el mayor porcentaje de inhibición se mostró en la concentración 8 $\mu\text{g}/\text{disco}$ con un 18.18% (Figura 13c).



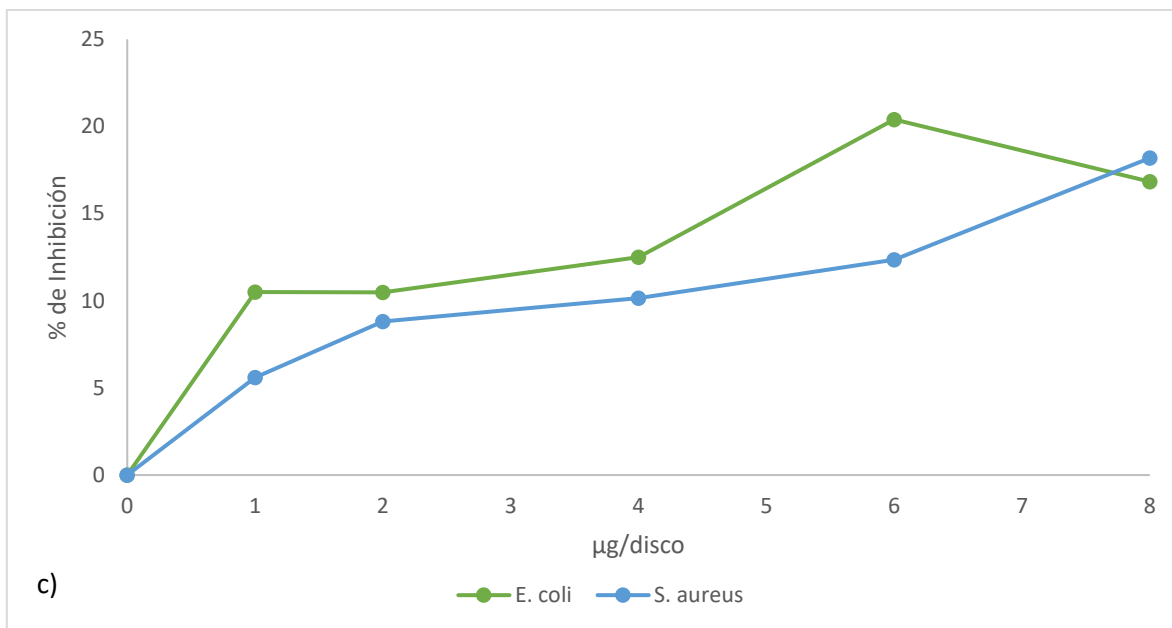
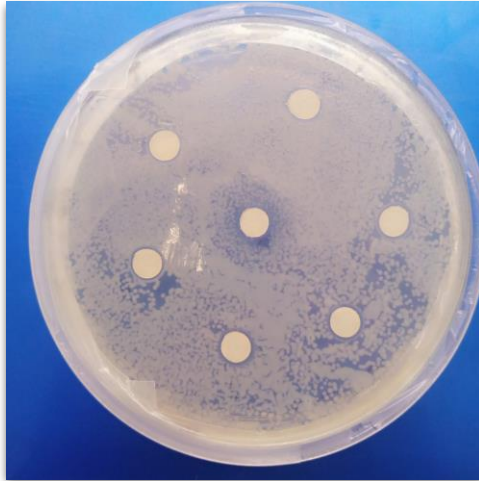
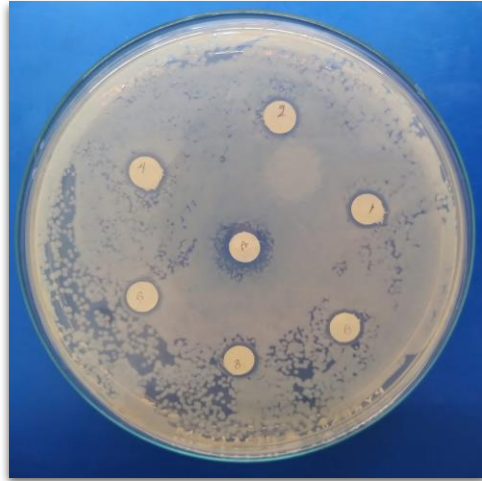


Figura 13: Efecto antibacteriano de fracciones del extracto metanólico de un cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium*: a) 4TP, b) 5TP y c) 8TP contra *S. aureus* (●) y *E. coli* (●)

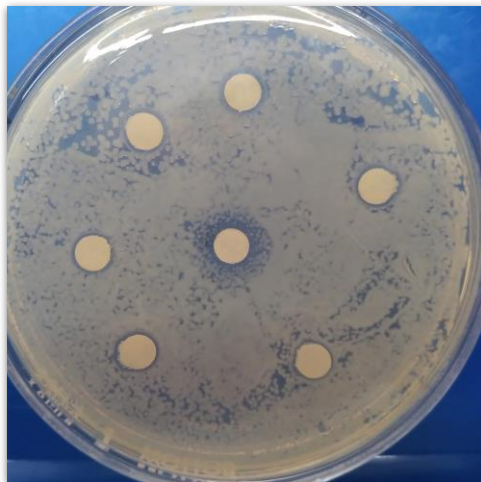
4TP vs *E. coli*



5TP vs *E. coli*



8TP vs *E. Coli*



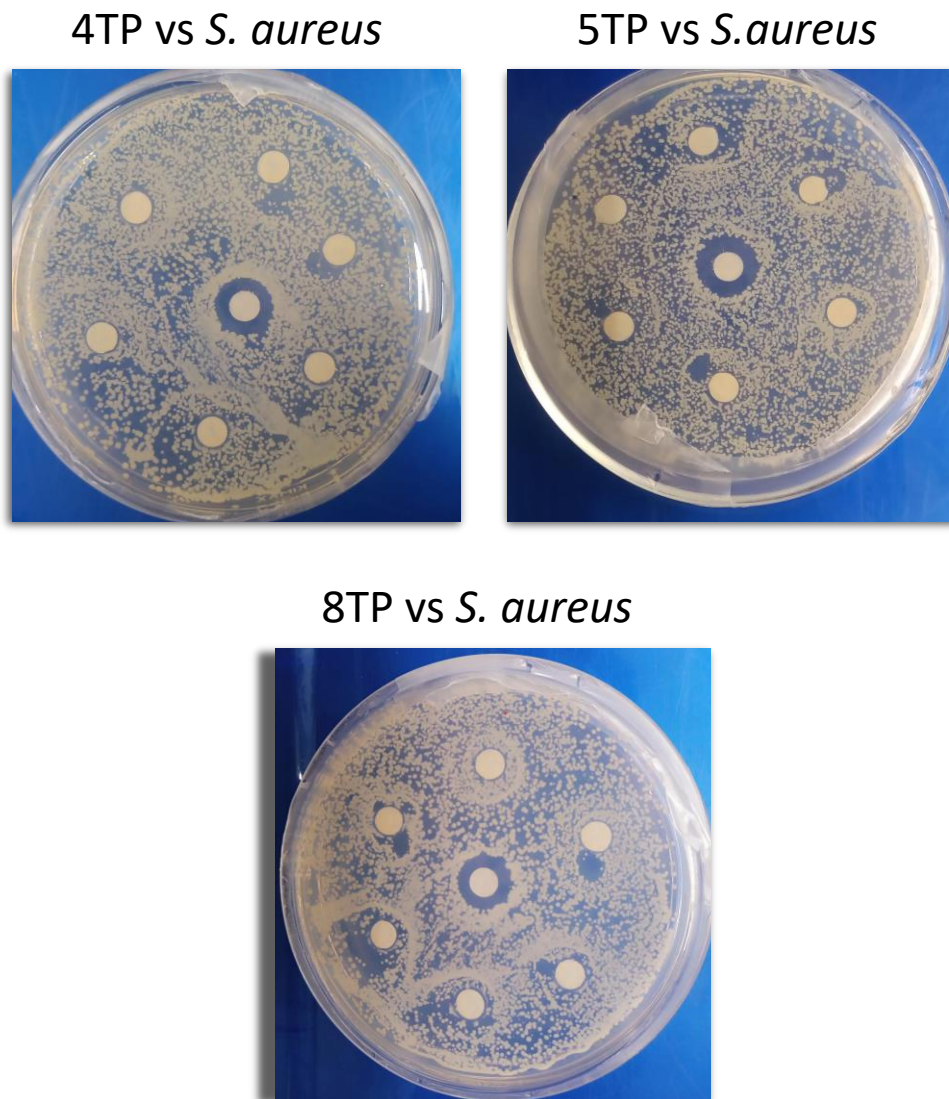


Figura 14: Imágenes representativas de las cajas Petri al finalizar el ensayo antibacteriano.

7.2 Correlación de Pearson de la bioactividad de las fracciones con respecto a su contenido de metabolitos secundarios totales

La Correlación de Pearson es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente cuyos valores absolutos oscilan entre 0 y 1. Cuanto más cerca de 1 mayor es la correlación y menor, cuanto más cerca de cero (Hernández *et al.*, 2018). Se determinó que los contenidos totales de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides, glucósidos fenilpropanoides y

lactonas sesquiterpénicas en las fracciones presentan correlación con la actividad antibacteriana contra *E. coli* y/o *S. aureus* (Tabla 5).

El contenido de fenoles totales presenta una correlación fuerte y positiva con *S. aureus*, mientras que el contenido de glucósidos fenilpropanoides totales presenta una correlación fuerte y positiva tanto con *E. coli* como con *S. aureus* (Tabla 5).

El contenido de flavonoides totales presenta una correlación fuerte y negativa con *E. coli*, mientras que el contenido de lactonas sesquiterpénicas presenta una correlación fuerte y negativa tanto con *E. coli* como con *S. aureus* (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis de la Correlación de Pearson entre el contenido de metabolitos secundarios totales de las fracciones y la actividad antibacteriana en ambas cepas.

Variables Respuesta			Valores de <i>p</i> y R	
			<i>p</i>	R
Contenido de fenoles totales	vs	<i>S. aureus</i>	0.0003	0.9262
Contenido de flavonoides totales	vs	<i>E. coli</i>	0.0006	-0.9143
Contenido de glucósidos fenilpropanoides totales	vs	<i>E. coli</i>	0.0428	0.6825
	vs	<i>S. aureus</i>	0.0005	0.9147
Contenido de lactonas	vs	<i>E. coli</i>	0.0206	-0.7474
sesquiterpénicas totales	vs	<i>S. aureus</i>	0.0110	-0.7916

El contenido de fenoles totales fue de 194.1, 127.4 y 107.6 mg equivalentes de ácido gálico/g, el contenido de flavonoides totales fue de 6.4, 5.6 y 11.9 mg equivalentes de quercetina/g, el contenido de fenilpropanoides totales fue de 143.5, 58.8 y 22.1 mg equivalentes de verbascósido/g, y el contenido de lactonas sesquiterpénicas totales fue de 6.0, 10.3 y 14.7 mg equivalentes de partenólida/g para las fracciones 4TP, 5TP y 8TP, respectivamente. Se tomaron diferencias significativas menores a 0.5. (Solo se muestran aquellas variables en dónde el valor de *p* fue menor a 0.05)

8. DISCUSIÓN

El uso de metabolitos secundarios de plantas en el tratamiento de enfermedades de etiología infecciosa constituye en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa a los fármacos empleados actualmente en su tratamiento (Domingo & López-Brea, 2003). Existe un gran número de metabolitos secundarios que poseen actividad antibacteriana, pero solo un pequeño porcentaje muestra actividad suficiente para ser utilizados en clínica, dicha actividad permite un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con base científica (Domingo y López-Brea, 2003; Ramírez y Díaz, 2007). En este sentido, se ha determinado que los aceites esenciales de *T. parthenium* presentan actividad antibacteriana en pruebas *in vitro*, tal es el caso del trabajo de Izadi *et al.* (2013), en donde encontraron una inhibición del 68.48 y 74.46% para las cepas de *E. coli* 25923 y 157, respectivamente, y del 64.91% en *S. aureus* a 2.5 µL de aceite esencial por disco; que ellos atribuyeron a compuestos como el acetato de crisantenilo y *p*-simeno, que están presentes en dicho aceite esencial y que ya se han reportado como agentes antibacterianos. En otro trabajo empleando también el aceite esencial de *T. parthenium* encontraron un 68.10% de Inhibición para *E. coli* y del 89.44% para *S. aureus* con 30 µL por disco, la actividad fue atribuida principalmente a la presencia de timol, carvacrol, alcanfor, crisantenona, borneol y acetato de bornilo (Shafaghat *et al.*, 2017).

Por otro lado, en otros trabajos reportados, se halló que los aceites esenciales solo inhibieron a *S. aureus* y no a *E. coli*. Izadi *et al.* (2010), encontraron una inhibición de entre el 10 al 60% en *S. aureus* con 20 µL por disco a partir de partes aéreas, hojas y tallos, inflorescencias, semillas inmaduras y semillas inmaduras de muestras vegetales de dos regiones diferentes de Irán, la actividad fue atribuida a la presencia de alcanfor, acetato de crisantenilo y canfeno. Así mismo, Ghavam, 2021, reportó una inhibición del 10.50% en *S. aureus* con 10 µL por pozo, la actividad antibacteriana podría deberse a la presencia de alcanfor, β -pineno y espatulenol en el aceite esencial. Finalmente, se encontró una MIC de 500 µg/mL para *E. coli* y de 250 µg/mL para *S. aureus* empleando aceite esencial de *T. parthenium* (Polatoğlu

et al., 2010). Por tanto, *T. parthenium* es una especie que produce metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas.

En el presente trabajo empleando fracciones del extracto metanólico del cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium*, se consiguieron inhibiciones bajas en comparación con las inhibiciones reportadas antes mencionadas con los aceites esenciales; la inhibición máxima de 27.02% se logró con la fracción 4TP en *E. coli* y de alrededor del 18% en *S. aureus* para las 3 fracciones (4TP, 5TP y 8TP); por lo que los aceites esenciales de la planta completa de *T. parthenium* podrían contener una mayor cantidad o concentración de MS con propiedades antibacterianas en comparación con los MS presentes en el extracto metanólico aquí utilizado. Sin embargo, en las fracciones se contienen MS que podrían tener una composición distinta de los aceites esenciales, que también presentan actividad antibacteriana, aunque en menor medida, pero que pueden mejorar al ser aislados y que podrían presentar mecanismos de acción antibacterianos importantes (Bajpai *et al.*, 2016). Por lo que será necesario continuar con la purificación e identificación de compuestos antibacterianos producidos por el cultivo de raíces en suspensión.

De acuerdo a la Correlación de Pearson, los metabolitos secundarios con las propiedades antibacterianas fueron los compuestos fenólicos totales y más específicamente su subgrupo de glucósidos fenilpropanoides totales, lo cual ocurrió en forma fuerte y positiva, es decir, que a mayor concentración de glucósidos fenilpropanoides presentes en las fracciones, mayor sería la actividad antibacteriana; por el contrario, los flavonoides totales (subgrupo de los compuestos fenólicos totales) y las lactonas sesquiterpénicas totales actúan de forma fuerte y negativa, es decir, que a menor concentración de ambos grupos en las fracciones, mayor sería la actividad antibacteriana, por lo que se tendría que hacer énfasis en el aislamiento de dichos compuestos para continuar con los ensayos antibacterianos.

Los problemas derivados del uso indiscriminado de las plantas por sus potenciales propiedades medicinales han acelerado la pérdida de biodiversidad (Vivot *et al.*, 2012). Por lo que hacer uso de la biotecnología vegetal ayuda a la conservación de

los recursos naturales, que en el presente trabajo fue aplicada por medio del uso de un cultivo de raíces en suspensión de *T. parthenium* productor de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, de forma estandarizada y controlada.

9. CONCLUSIONES

Las 3 fracciones en las 5 concentraciones estudiadas presentaron una potencial actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*, siendo las mayores concentraciones las que dieron mayores porcentajes de inhibición.

La fracción 4TP presentó mejor porcentaje de inhibición (27.02%) siendo *E. coli* más sensible.

La correlación con *S. aureus* del contenido de compuesto fenólicos fue de forma fuerte y positiva, por lo que su presencia en las fracciones es importante para su actividad antibacteriana; y de las lactonas sesquiterpénicas totales de forma fuerte y negativa, por lo que su ausencia en las fracciones es importante para su actividad antibacteriana.

La correlación con *E. coli* de los glucósidos fenilpropanoides totales fue de forma fuerte y positiva, por lo que su presencia en las fracciones es importante para su actividad antibacteriana; y de los flavonoides fue de forma fuerte y negativa, por lo que su ausencia en las fracciones es importante para su actividad antibacteriana.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aguayo-Reyes A, Quezada-Aguiluz M, Mella S, Riedel G, Opazo-Capurro A, Bello-Toledo H, Domínguez M y González-Rocha G. (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobianos* 35(1): 7-14.

Akin-Idowu PE, Ibitoye DO, Ademoyegun OT. (2009). Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops. *Afr. J. Biotechnol.* 8(16): 3782-3788.

Akputat AH, Tepe B, Sokmen A, Daferera D, Polissiou M. (2005). Composition of the essential oils of *Tanacetum argyrophyllum* (C. Koch) Tvetz. var. *argyrophyllum* and *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae) from Turkey. *Biochem. System. Ecol.* 33: 511-516.

Alper, J. (2003). Data gaps need bridging to assess infectious gastrointestinal diseases. *ASM News.*; 69:65-68.

Al-Snafi AE. (2019). Iraqi medicinal plants with antibacterial effect-a review. *J. Pharm.* 9(8): 22-103

Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KRS, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, *et al.* (2007). Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea associated pathotypes among Brazilian children. *J. Clin. Microbiol.* 45 (10): 3396-9.

Arias ZM. (2013). Optimización de parámetros de cultivo en suspensión de células de la especie vegetal *Thevetia peruviana* y su efecto en la producción de Metabolitos Secundarios, Universidad de Colombia, Medellín.

Ashraf M, Iqbal M, Rasheed R, Hussain I, Riaz M, Arif MS. (2018). Chapter 8: Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress*, Academic Press pp 153-167

Ávalos GA, Pérez-Urria CE. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145.

Bajpai VK, Majumder R, Park JG. (2026). Isolation and purification of plant secondary metabolites using column-chromatographic technique. *Bangladesh J. Pharmacol.* 11: 844-848.

Baker S, Thomson N, Weill FX, Holt KE. (2018). Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science* 360(6390): 733-738

Barry AL, Amsterdam D, Coyle MB, Gerlach EH, Thornsberry CWHR. (1979). Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *J. Clin. Microbiology*. Vol. 10.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1996). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493.

Beghe WJ, Kline RM. (1972). The use of tetrazolium salts in bioautography procedures, *Chromatogr*, Vol. 64, pp. 182.

Bergey DH, Holt JG. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore Williams & Wilkins.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (BDMTM) (2009). Tomado de: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=tanacetum-parthenium>

Bilinskaya A, Buckheit DJ, Gnoinski M, Asempa TE, Nicolau DP. (2020). Variability in zinc concentration among Mueller-Hinton broth brands: impact on antimicrobial susceptibility testing of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 58(12): e02019-20.

Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, Khelaifia S. (2020). Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 34: 100622.

Borbolla-Sala ME, Vidal-Pérez MR, Piña-Gutiérrez OE, Ramírez-Messner I, Vidal-Vidal JJ. (2004). Contaminación de los alimentos por *Vibrio cholerae*, coliformes fecales, *salmonella*, hongos, levaduras y *Staphylococcus aureus* en Tabasco durante 2003. *Salud en Tabasco* 10(2): 221-232.

Brown AM, Lowe KC, Davey MR, Power J, Knight DW, Heptinstall S. (1996). Comparison of extraction procedures for parthenolide in *Tanacetum parthenium*. *Phytochemical Analysis* 7: 86- 91.

Calderón RG. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev. méd. Costa Rica Centroam* 621: 757-763.

Cameron D, Hock QS, Kadim M, Mohan N, Ryoo E, Sandhu B, Yamashiro Y, Jie C, Hoekstra H, Guarino A. Probiotics for gastrointestinal disorders: proposed recommendations for children of the Asia-Pacific region. *World J. Gastroenterol.* 23(45): 7952-7964.

Cappellari L del R, Santoro MV, Schmidt A, Gershenzon J, Banchio E. (2020). Improving phenolic total content and monoterpene in *Mentha x piperita* by using salicylic acid or methyl jasmonate combined with rhizobacteria inoculation. *Int. J. Mol. Sci.* 21(50): 1-22.

Chandana BC, Nagaveni HC, Kumari, Lakshmana D, Shashikala SK, Heena MS. (2018). Role of plant tissue culture in micropropagation, secondary metabolites production and conservation of some endangered medicinal crops. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2018: 246-251.

Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.* 26: 1-10.

Clarke SC. (2001). Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41 (3): 93-8.

Cordero DM, García AL, Barreal RT, Jiménez J, Rojas N. (2002). Comportamiento de la infección nosocomial en las unidades de terapia en un periodo de 5 años. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 40(2): 79-88.

Cunningham MW, Fujinami RS. (2000). Effects of microbes on the immune system. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins.

Davies J, Guy R, Johnson AP, Sheridan EA, Hope RJ. (2016). Descriptive epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England, April 2012 to March 2014. *Euro. Surveill.* 21(35): 30329.

Deresinski S. (2007). Vancomycin: ¿does it still have a role as an antistaphylococcal agent? *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 5(3):393–401.

Di Giocamo V, Ferrante C, Ronci M, Cataldi A, Di Valerio V, Rapino M, Recinella L, *et al.* (2019). Multiple pharmacological and toxicological investigations on *Tanacetum parthenium* and *Salix alba* extracts: focus on potential applications as antimigraine agents. *Food Chem. Toxicol.* 133: 110783

Domingo D, López-Brea M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap 16(4): 385-393.

Echeverría MF, Adeniyi P, Estrada-Zuñiga ME, Velázquez-Ordoñez V, Barbabosa-Pliego A, Salem MZM, Alonso-Fresán MU, Camacho-Díaz LM, Salem AZM. (2017). Anti-staphylococcal properties of four plant extracts against sensitive and multi-resistant bacterial strains isolated from cattle and rabbits. Microb. Pathog 113: 286-294.

Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A. (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. Trends in Plant Science 6: 78-84.

Eloff JN. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. Complement. Altern. Med. 19: 106.

Espinosa-Leal CA, Puente-Garza CA, García-Lara S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta 248: 1-18.

Estrella CG, Rafael GG, Paz MSS. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev. Latinoam. Patol Clin Med Lab. 61: 28-40.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2000) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. Clin. Microbiol. Infect. 6(9): 509-515.

Facchini PJ. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 29-66.

Falconí OF, Cushquicushma CPJ. (2018). Tesis de laboratorio clínico e histopatológico: actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Tanacetum* spp frente a cepas atcc. Universidad Nacional de Chimborazo, Ecuador.

Ferl R, Paul AL. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: (ASPB) pp. 312-357.

Fleckenstein JM, Kuhlmann FM. (2019). Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. Curr. Infect. Dis. Rep. 21: 1-9.

Fowler V, Boucher H, Corey R, Abrutyn E, Karchmer AW, Rupp ME, *et al.* (2006). Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. N. Engl. J. Med. 355(7): 653-65.

Gani U, Vishwakarma RA, Misra P. (2021). Membrane transporters: the key drivers of transport of secondary metabolites in plants. Plant Cell Rep. 40: 1-18.

Ghantous A, Sinjab A, Zdenko H, Darwiche N. (2013). Parthenolide: from plant shoots to cancer roots. Drug Discovery Today 18(17-18): 894-905.

Ghavam M. (2021). *Tripleurospermum disciforme* (C.A.Mey.) Sch.Bip., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch.Bip, and *Achillea biebersteinii* Afan.: efficiency, chemical profile, and biological properties of essential oil. Chem Biol Technol Agric 8(45): 1-17.

Gómez-Duarte OG. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. Rev. Chil. Infectol. 31(5): 577-586.

Gómez Gretel, Batista C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. CT, 27(3),17-24

Hacek M, Dressel DC, Peterson LR. (1999). Highly reproducible bactericidal activity test results by using a modified national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution technique. J. Clin. Microbiol. 37(6): 1881-4.

Hernández CC, Aguilera AMG, Castro EG. (2011). Gastrointestinal diseases, situation in Mexico. Enf. Inf. Microbiol. 31(4): 137-151.

Hernández LJD, Espinoza CF, Rodríguez JE, Chacón RJG, Toloza SCA, Arenas TMK, Carrillo SSM, Bermúdez PVJ. (2018). Sobre el uso adecuado del coeficiente de correlación de Pearson: definición, propiedades y suposiciones. Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica 37(5): 587-601.

Herrera ML. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 34;33-41. Retrieved March 28, 2022, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101785461999000100010&lng=en&tlng=es

- Hethelyi E, Tetenyi P, Danos B, Koczka I. (1991). Phytochemical and antimicrobial studies on the essential oils of the *Tanacetum vulgare* clones by gas chromatography/mass spectrometry. *Herba Hungarica*. 30: 82-90.
- Hill DR, Beeching NJ. (2010). Travelers' diarrhea. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23(5): 481-7.
- Holopainen M, Kauppinen V. (1989). Antimicrobial activity of different chemotypes of finnish tansy. *Planta Med.* 55: 103-108.
- Hojati M, Modarres-Sanavy SAM, Enferadi ST, Majdi M, Ghanati F, Farzadfar S. (2016). Differential deployment of parthenolide and phenylpropanoids in feverfew plants subjected to divalent heavy metals and trans-cinnamic acid. *Plant and Soil* 399: 41-59.
- Hussein RA, El-Anssary AA. (2019). Chapter 2: Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal Medicine*, IntechOpen, United Kingdom, pp 11-30
- Isada CM, Bernard LK, Goldman MP, Gray LD, Aberg JA. (2001). Infectious diseases handbook including antimicrobial therapy & diagnostic test/procedures.
- Izadi Z, Aghaalkhani M, Esna-Ashri M, Davoodi P. (2013). Determining chemical composition and antimicrobial activity of feverfew (*Tanacetum parthenium* L.) essential oil on some microbial strains. *Zahedan J Res Med Sci* 15(6): 8-13.
- Izadi Z, Esna-Ashri M, Piri K, Davoodi P. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of feverfew (*Tanacetum parthenium*) essential oil. *Int J Agric Biol* 12(5): 759-763.
- Jain NK, Kulkarni SK. (1999). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Tanacetum parthenium* L. extract in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 68: 251-259.
- Jain C, Khatana S, Vijayvergia R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *Int J. Pharm. Sci. Res.* 10(2): 494-504.
- Jamal W, Bari A, Mothana RA, Basudan O, Mohammed MS, Ng SW. (2014). Antimicrobial evaluation and crystal structure of parthenolide from *Tarconanthus camphorates* collected in Saudi Arabia. *Asian J. Chem.* 26: 5183-5185.
- Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli MN, Yan T, Ishii S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J. Appl. Microbiol.* 123: 570-581.

- Kim JI, Zhang X, Pascuzzi PE, Liu CJ, Chapple C. (2019). Glucosinolate and phenylpropanoid biosynthesis are linked by proteasome-dependent degradation of PAL. *New Phyt.* 225(1): 154-168.
- Kloss W, Bamberman TL. (1995). *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington DC: ASM Press M.
- Kloss W. (1997). Taxonomy and systematics of *Staphylococci indigenous* to humans. En: Crossley KB, Archer GL, eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone. 113-215.
- Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* 357: 1225-1240.
- Lautaro V, María JLF, Pablo S, Gustavo L, Liliana C, Nicolás L. (2014). Tratamiento de las infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* metilino resistente adquirido en la comunidad. *Actualizaciones en sida e infectología* 22(85): 53-63.
- Laupland KB, Church DL. (2014). Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 27(4): 647-664.
- Le Bouguénec C, Servin AL. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 256(2):185-94.
- León-Ramírez S. (2002). Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco* 8(1): 22-25.
- Lichman BR. (2021). The scaffold-forming steps of plant alkaloid biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 38: 103-129.
- Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ *et al.* (2011). Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. *Clin. Infect. Dis.* 52(3):18-55.
- Liu H, Zhang X, Zhang H, Yao X, Zhou M, Wang J, He Z, Zhang H, Lou L, Mao W, Zheng P, Hu B. (2018). Effect of air pollution on the total bacteria and pathogenic bacteria in different sizes of particulate matter. *Environ. Pollut.* 233: 483-493.

Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N. (2018). Chapter 1: An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana Press, New York, 1815: 1-13

Magaña AMA, Gama CLM. Mariaca MR. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades maya-chontales de Nacajuca, Tabasco, México. Polibotánica 29: 213-262.

Mahato TK, Sharma K. (2018). Study of medicinal herbs and its antibacterial activity: a review. J. Drug Deliv. Ther. 8: 47-54.

Majdi M, Charnikhova T, Bouwmeester H. (2013). Genetical, developmental and spatial factors influencing parthenolide and its precursor costunolide in feverfew (*Tanacetum parthenium*). Industrial Crops and Products. 47: 270-276.

Marovac J, Campos MI. (2000). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Rev. Méd. Chile 128(6): 685-686.

Martinez THS. (2010). Tesis: estudio *in vitro* de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos. Universidad Mayor de San Andres, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, La paz, Bolivia.

Mendoza GV. (2015). Tesis: Caracterización del crecimiento y la producción de metabolitos secundarios con potencial actividad contra el cáncer en cultivos *in vitro* de *Tanacetum parthenium*. Licenciatura en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de México.

Mohsenzadeh F, Chehregani A, Amiri H. (2011). Chemical composition, antibacterial activity and cytotoxicity of essential oils of *Tanacetum parthenium* in different developmental stages. Pharm. Biol. 49(9): 920-926.

Mosquito S, Ruiz J, Bauer J. L, Ochoa T. J. MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *Escherichia coli*- ASSOCIATED DIARRHEA (2011) Rev. Peru Med Exp Salud Publica. 28(4):648-56.

Mroginski LA, Roca WM. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones: Capítulo 2 Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. Facultad de ciencias agrarias, Instituto de Botanica del Nordeste, (UIB), Calí, Colombia.

Mulligan ME, Murray-leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, *et al.* (1993). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. *Am. J. Med.* 94(3): 313-28.

Murdoch DR, Greenlees RL. (2004). Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. *J. Clin. Pathol.* 57: 199-201.

Nakatsuji T, Chen TH, Narala S, Chun KA, Two AM, *et al.* (2017). Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Sci. Transl. Med.* 9: 1-11

Nataro JP, Kaper JB. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., Vol. 17(1)

Neszmélyi A, Milne GWA, Podányi B, Koczka I, Héthelyi E. (1992). Composition of the essential oil of clone 409 of *Tanacetum vulgare* and 2d NRM Investigation of trans-chrysanthenyl acetate. *J. Essent. Oil Res.* 4: 243–250.

Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr. J. Biotechnol.* 7(12): 1797.

Nieto-Trujillo, A. Evaluación de la actividad citotóxica de cultivos in vitro de especies productoras de lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos en una línea celular de linfoma. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología, UAM-I, 2020.

Nieto-Trujillo A, Buendía-González L, García-Morales C, Román-Guerrero A, Cruz-Sosa F, Estrada-Zúñiga ME. (2017). Phenolic compounds and parthenolide production from *in vitro* cultures of *Tanacetum parthenium*. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 16(2): 371-383.

Nikseresht F, Landi A, Sayyad G, Ghezelbash G, Schulin R. (2020). Sugarcane molasse and vinasse added as microbial growth substrates increase calcium carbonate content.

Surface stability and resistance against wind erosion of desert soils. J. Environ. Manage. 268: 110639.

Nori-Shargh D, Norouzi-Arasi H, Mirza M, Jaimand K, Mohammadi S. (1999). Chemical composition of the essential oil of *Tanacetum polycephalum* (schultz bip. ssp. heterophyllum). Flav. Frag. J. 14: 105–106.

Norma Oficial Mexicana NOM-027-SSA-1993, Bienes y servicios. productos de la pesca. pescados frescos refrigerados y congelados.

Núñez R (2003). Obtención, caracterización aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Universidad de la Habana, La Habana. 65 p.

Ondusko DS, Dawn N. (2018). *Staphylococcus aureus*. Pediatr. Rev. 39(6): 287-298.

Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antibióticos, Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Organización Mundial de la Salud. (2017). Comunicado de prensa: La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesita urgentemente nuevos antibióticos, Recuperado de: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

O’Ryan M, Prado V, Pickering LKA. (2005). Millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 16(2): 125-36.

Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP. (1992) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. Infect Control Hosp Epidemiol; 13:582-586.

Pareek A, Suthar M, Rathore GS, Bansal V. (2011). Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. Pharmacogn. Rev. 5(9): 103-110.

Peng SNB, Zhou H, Wu H, Wang R, Liu F, Zhu W, Lopez JL, Zhang J, Fang J. (2011). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in water by a cold, He/O₂ atmospheric pressure plasma microjet. Plasma Process. Polym. 8: 424-431.

Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Microbiol. Spectr. 6(4): 1-27.

Polatoğlu K, Demirci F, Demirci B, Gören N, Başer KHC. (2010). Antibacterial activity and the variation of *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. essential oils from Turkey. J Oleo Sci 59(4): 177-184.

Pontrelli S, Chiu TY, Lan EI, Chen FYH, Chang P, Liao JC. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. Metab. Eng. 50: 16-46.

Porter CKA. (2011). Systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. Vaccine 29(37): 6167-78.

Portillo ME, Pozo JL. (2018). Infecciones por estafilococo. Medicine 12(49): 2890-4.

PRB Population Reference Bureau. (2005). Tomado de: <http://www.prb.org/datafind/datafinder6.htm>

Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) (2018)

Qadri F, Svennerholm AM, Faruque ASG, Sack RB. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Rev. 18(3):.465-483.

Ramírez ALS, Díaz BHE. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruinbarbo (*Rumex conglomeratus*). Scientia Et Technica XIII(33): 397-400.

Ramirez LS, Marin CD. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Sci. Tech, XV(42): 263-268

Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), 2015

Rodríguez-Angeles G. (2002) "Principales características y diagnósticos de los grupos patógenos de *Escherichia coli*". Sal. Pub. Mex. 44(5): 464-475.

Rojas N, Fernández N, Espino M, Fernández M. (2001). Patrones de drogorresistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano. Rev. Cubana Med. Trop. 53(1): 53-8.

Rossi E, Cimdins A, Lüthje P, Brauner A, Sjöling Å, Landini P, Römling U. (2017). It's a gut feeling-*Escherichia coli* biofilm formation with a focus on the gastrointestinal tract. Crit. Rev. Microbiol. 44(1): 1-30.

Sahai P, Sinha VB. (2022). Development of hairy root culture in *Taxus baccata* sub sp wallichiana as an alternative for increased Taxol production. Material Today: Proceedings 49(8): 3443-3448.

Sanchez AE, Harmanci M, Laffleur F. (2021). Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. Microbiol. Res. 252: 126867.

Saviano AM, Lourenço FR. (2018). Measurement uncertainty estimation based on multiple regression analysis (MRA) and Monte Carlo (MC) simulations-Application to agar diffusion method. Measurement 115: 269-278.

Schramm S, Köhler N, Rozhon W. (2019). Pyrrolizidine alkaloids: biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. Molecules 24(498): 1-44.

Seguridad Alimentaria, ELIKA (2021). *Staphylococcus aureus*. Tomado de: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/staphylococcus-aureus/>

Sepúlveda JG, Porta DH, Rocha SM. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Rev. Mex. Fitopat. 21(3): 355-363.

Sergretín ME. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales), Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA. ArgenBio

Shafaghat A, Ghorban-Dadras O, Mohammadhosseini M, Akhavan M, Shafaghatlonbar M, Panahi A. (2017). A comparative study on chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz. Bip. and *Tanacetum punctatum* (Desr.) Grierson. leaves from Iran. J Essent Oil-Bear Plants 20(4): 1143-1150.

Sistema Nacional de Salud, Secretaría de Salud, Dirección general de Epidemiología, casos nuevos de enfermedad acumulados hasta la semana 53 del 2003.

Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones, Anuario de Morbilidad Nacional 1984 – 2019, https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html.

Taylor DN, Echeverría P, Sethabutr O, Pitarangsi C, Leksomboon U, Blacklow N R, et al. (1988). Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA hybridization. J. Clin. Microbiol. 26(7): 1362-6.

Taylor TA, Unakal CG. (2022). *Staphylococcus aureus*. In: StatPearls Publishing LLC, Treasure Island.

- Thapar N, Sanderson IR. (2004). Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet*; 363(9409): 641-53.
- Universidad de Ingeniería y Tecnología, UIT. (2019). Cultivo “*in vitro*” de tejidos vegetales. Lima, Perú.
- Van Wyk AS, Prinsloo G. (2018). Medicinal plant harvesting, sustainability and cultivation in South Africa. *Biol. Conserv.* 227: 335-342.
- Velazquez MME. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Publica Mex.* 47:381-387
- Vila J, Álvarez-Martínez MJ, Buesa J, Castillo J. (2009). Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 27: 406-411.
- Vidal-Graniel JE. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco* 9(1): 188-193.
- Vidal JE, Canizález RA, Gutiérrez JJ, Navarro GF. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Sal. Pub. Mex.* 49: 376-386.
- Vivot EP, Sánchez C, Cacik F, Sequin C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología* XXIII(45): 165-185.
- Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3(1): 2-20.
- Wink M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Annual Plant Reviews.* Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. 374 p.
- Wink M, Schimmer O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. pp. 17-134. In: M. Wink M. (ed.). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology.* Sheffield Academic Press. Sheffield, England. 304
- Wu C, Chen F, Wang X, Kim HJ, He Gq, Haley-Zitlin V, *et al.* (2006). Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. *Food Chemistry* 96: 220-227.

Wu JA, Kusuma C, Mond JJ, Kokain-Kun JF. (2003). Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. Antimicrob Agents Chemother. 47(11): 3407-3414.

Wunderink RG. (2013). How Important is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of community-acquired pneumonia and what is best antimicrobial therapy? Infect. Dis. Clin. North Am. 27(1):177-88.

Zang Y, Cheng Z, Wu T. (2020). TLC bioautography on screening of bioactive natural products: an update review. Curr. Anal. Chem. 16: 545-556.

Zhou F, Pichersky E. (2020). More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. Curr Opin, Plant Biol. 55: 1-10