

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Programa Institucional de Maestría en
Ciencias Biológicas



Área temática: Biotecnología Alimentaria
Facultad de Químico Farmacobiología

Determinación químico proximal, perfil fitoquímico, capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de nurite (*Clinopodium macrostemum*, Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze de Paracho de Verduzco, Michoacán, México.

TESIS

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

IBT. Carlos Alberto Zornoza Caro

Director de Tesis

Dr. Rafael Zamora Vega

Codirectora

Dra. Eréndira Valencia Avilés

Morelia, Michoacán. Febrero 2025.

**“Todo es veneno y nada es veneno,
pero únicamente la dosis hace al veneno”.**

Paracelso (XVI)

Dedicatorias

- Este trabajo va dedicado a mi papá (Federico Zornoza) hermano (Miguel Zornoza) y abuelita (Ma. Elena Gómez) que siempre estuvieron al pendiente de mis avances creyendo en mí más que cualquier otra persona que sin importar las adversidades ellos siguieron alentándome para no dejarme caer por mi enfermedad cardíaca tras el COVID. Uno no pide las enfermedades solo aparecen y hay que saberlas enfrentar.
- Este trabajo es principalmente dedicado a mi papá ya que fue el que me apoyo con todos los recursos necesarios para lograr dicha investigación y fue el que más creyó en mí sin dejarme desprovisto de su apoyo.
- También este trabajo de investigación lo dedico a mi familia materna oriunda de Paracho Michoacán que fungieron como inspiración por la cultura purépecha que nos inculcaron desde niños haciéndome participe de sus fiestas y tradiciones.
- Dedico también este trabajo a mi mamá finada que recuerdo con cariño.
- A mis amigos en general que me consideren como tal agradezco su compañía y sus palabras de motivación para nombrarlos serian demasiados, pero sé que con estas palabras tendrán sentido de pertinencia si así lo desean.

Agradecimientos

Principalmente agradecer a mi familia Mtro. Federico Zornoza. Dr. Miguel Zornoza y Dra. Ma. Elena Gómez quienes fungieron como fuente de inspiración para no claudicar durante este periodo de posgrado.

Quisiera agradecer a todos los involucrados en este trabajo de investigación que la verdad si fueron bastantes almas bondadosas donde en primera instancia agradezco a la Dra. Patricia Ríos Chávez que me acepto en su laboratorio de investigación dejándome trabajar y enseñándome lo necesario para defender mi trabajo de investigación. A mi amigo de maestría Fernando Gallegos que deposito su confianza en mí para lograr obtener el apoyo en dicho laboratorio, así como también, el agradecer a los estudiantes de ese laboratorio (Oliver, Oscar, Aram y Gerardo). A mi amiga de maestría Yuliza Morales y Agustín Moreno que siempre con su compañía hacían más fácil la estancia dentro del posgrado. A mi amigo Juan Altamirano que me toco compartir con el otro periodo académico. A los Doctores Rafael Salgado y Alejandra Hernández que permitieron que yo fuese parte de su laboratorio para poder realizar mis experimentos allí. Al Dr. Atahualpa Guzmán que me apoyo en todo momento durante mi estancia en Uruapan. A el Mtro. Eder Zavala, Dr. Eduardo Sharini y Dr. José Villareal que me apoyaron durante mi estancia en Uruapan mostrando su lado amable para un servidor. A mis asesores Dr. Rafael Zamora y Dra. Eréndira Valencia que decidieron seguir con dicha investigación a pesar de las adversidades.

En cuanto a las demás personas que no mencione les pido una disculpa, pero de igual manera si eres una de ellas agradezco plenamente tu apoyo el cual mucho o poco fue importante para mí desarrollo personal y para este trabajo de investigación.

Índice

1.	Introducción	1
2.	Marco teórico	4
2.1	Nurite (<i>Clinopodium macrostemum</i> , Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze	4
2.1.1	Características físicas	4
2.1.2	Taxonomía	5
2.1.3	Distribución	6
2.1.4	Propiedades y usos del Nurite	8
2.1.5	Economía entorno al Nurite	9
2.2	Extractos de plantas y sus compuestos activos	9
2.2.1	Métodos de extracción	10
2.3	Aceites esenciales	12
2.3.1	Composición del aceite esencial del Nurite	13
2.4	Polifenoles	15
2.5	Antioxidantes	17
2.5.1	Fundamentos de las técnicas para la determinación del perfil fitoquímico .	18
2.5.2	Fundamentos de las técnicas para la determinación de la capacidad antioxidante	19
2.5.3	Antecedentes de pruebas del nurite como antioxidante	22
2.6	Microorganismos oportunistas en la salud humana y en los alimentos	23
2.6.1	Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios contra los microorganismos	24
2.6.2	Capacidad antimicrobiana de los compuestos antioxidantes	27
2.6.3	Algunos extractos con actividad antimicrobiana	28
2.7	Actividad antimicrobiana del nurite	29

3.	Justificación	31
4.	Hipótesis	32
5.	Objetivo general.....	32
5.1	Objetivos específicos	32
6.	Estrategia experimental	33
7.	Materiales y métodos.....	34
7.1	Materia prima.	34
7.1.1	Análisis botánico	34
7.1.2	Secado de la planta y separación de tejidos	35
7.2	Análisis bromatológico de la planta seca.....	35
7.2.1	Determinación de humedad.....	35
7.2.2	Determinación del porcentaje de materia seca	35
7.2.3	Determinación de extracto etéreo	36
7.2.4	Determinación de proteínas.....	37
7.2.5	Determinación de fibra.....	38
7.2.6	Cálculo de carbohidratos.....	38
7.3	Obtención de los extractos y cálculo del rendimiento.....	39
7.4	Cuantificación de fitoquímicos y de la capacidad antioxidante.....	40
7.4.1	Preparación de soluciones vegetales.....	40
7.4.2	Determinación del contenido de compuestos fenólicos.....	40
7.4.3	Determinación del contenido de flavonoides	40
7.4.4	Determinación del contenido de terpenos	41
7.4.5	Capacidad antioxidante DPPH	41
7.4.6	Capacidad antioxidante ABTS	41
7.4.7	Capacidad antioxidante FRAP	42

7.5	Evaluación de las propiedades inhibitorias de los extractos de Nurite contra <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	43
7.5.1	Adecuaciones de las cepas y extractos para los ensayos microbiológicos ..	43
7.5.2	Determinación de la sensibilidad bacteriana por el método Kirby-Bauer ...	43
7.5.3	Técnica de macrodilución en caldo para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	45
7.6	Análisis Estadístico	47
8.	Resultados y Discusión.....	48
8.1	Pruebas y adecuación de la materia prima	48
8.1.1	Análisis botánico	48
8.1.2	Secado de la planta y separación de tejidos	50
8.1.3	Análisis bromatológico de la planta seca	51
8.2	Obtención de los extractos y cálculo del rendimiento	62
8.3	Cuantificación de fitoquímicos y capacidad antioxidante	63
8.3.1	Determinación del contenido de compuestos fenólicos.....	64
8.3.2	Determinación del contenido de flavonoides	66
8.3.3	Determinación del contenido de terpenos	67
8.3.4	Capacidad antioxidante DPPH	69
8.3.5	Capacidad antioxidante ABTS	71
8.3.6	Capacidad antioxidante FRAP	72
8.3.7	Discusión general de antioxidantes presentes en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	73
8.3.8	Correlación lineal (R^2) entre los fitoquímicos (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos) y las técnicas antioxidantes.....	76
8.4	Evaluación de las propiedades inhibitorias de los extractos de Nurite contra: <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	77

8.4.1	Inhibición de <i>S. aureus</i> por el método de <i>Kirby-Bauer</i>	77
8.4.2	Inhibición de <i>E. coli</i> por el método de <i>Kirby-Bauer</i>	84
8.4.3	Concentración Mínima Bactericida (CMB)	92
9.	Conclusiones.....	97
10.	Referencias.....	98
11.	Anexos	113

Índice de Tablas

Tabla 1.	Clasificación Botánica del Nurite (García, 2013).	6
Tabla 2.	Constituyentes volátiles de hojas de <i>Clinopodium macrostemum</i> variedad levigata recolectada en verano.....	14
Tabla 3.	Extractos naturales con actividad antimicrobiana (Ramírez-Rojo, 2018).	29
Tabla 4.	Porcentaje de humedad de los tejidos frescos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	49
Tabla 5.	Porcentaje de materia seca de los tejidos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	50
Tabla 6.	Porcentaje de humedad de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	52
Tabla 7.	Porcentaje de materia seca de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i> . .	53
Tabla 8.	Porcentaje de cenizas de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	55
Tabla 9.	Porcentaje de grasa de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	56
Tabla 10.	Porcentaje de proteínas de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	58
Tabla 11.	Porcentaje de fibra de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	59
Tabla 12.	Caracterización fisicoquímica (% en base seca) de los tejidos de <i>Clinopodium macrostemum</i> provenientes de Paracho de Verduzco, Michoacán, México.	61
Tabla 13.	Rendimiento del extracto etanólico de <i>Clinopodium macrostemum</i> en base seca.	63
Tabla 14.	Contenido de fenoles en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	65
Tabla 15.	Contenido de flavonoides en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	67
Tabla 16.	Contenido de Terpenos en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	68
Tabla 17.	IC ₅₀ de DPPH con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	70

Tabla 18. IC ₅₀ de ABTS con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	71
Tabla 19. IC ₅₀ de FRAP con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	73
Tabla 20. Comparación de la IC ₅₀ DPPH, ABTS y FRAP de los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	74
Tabla 21. Capacidad antioxidante de los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i> expresada en µM Eq Trolox/mL y el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos.	75
Tabla 22. Correlación de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP.....	76
Tabla 23. Correlación de flavonoides con capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP.	76
Tabla 24. Correlación de terpenos con capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP	77
Tabla 25. Interpretación de los halos de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i>	80
Tabla 26. Selección del control + para <i>Staphylococcus aureus</i> acorde a susceptibilidad...	80
Tabla 27. Comparación de los mm del halo de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	81
Tabla 28. Comparación del porcentaje de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> con respecto a Gentamicina (Control +) de los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	83
Tabla 29. Interpretación de los halos de inhibición para Enterobacterias (<i>Escherichia coli</i>).	86
Tabla 30. Selección del control + para <i>Escherichia coli</i>	86
Tabla 31. Comparación de los halos de Inhibición de <i>Escherichia coli</i> con extracto de hoja, hoja/tallo y tallo de <i>Clinopodium macrostemum</i>	87
Tabla 32. Comparación del porcentaje de Inhibición de <i>Escherichia coli</i> con respecto a Gentamicina (Control +) de los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	89
Tabla 33. Comparación de los resultados de los mm de inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> con los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	91
Tabla 34. CMB de <i>Staphylococcus aureus</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i> .	93
Tabla 35. CMB de <i>Escherichia coli</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	94
Tabla 36. Resultados de la Prueba Kirby-Bouer y CMB de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	96

Índice de Figuras

Figura 1. Hoja y flor de la planta de Nurite (Delfin, 2015).....	4
Figura 2. Distribución en México de los Taxones infraespecíficos de <i>Clinopodium macrostemum</i> Var. <i>Laevigatum</i> y <i>macrostemum</i> . (Turner, 2008).....	7
Figura 3. Distribución del nurite en municipios de Michoacán (Bello, 1993).....	8
Figura 4. Aceites esenciales extraídos de partes de las plantas (OKDIARIO, 2019).....	12
Figura 5. Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Alonso, 2009).	16
Figura 6. Compuesto 7-C-[α -L-Ramnopiranosil-(1 3)- β -D-glucopiranosido]- 5, hidrox-3,6,4'-trimetoxiflavona (Alonso, 2009).	17
Figura 7. Compuesto 5,4'-dimetoxi-7,3'5'-trihidroxi,3-O-[β -D-ramnosido]-flavona (Alonso, 2009).....	17
Figura 8. Estructura del radical DPPH y su reducción por un antioxidante (AO-H) (Boligon <i>et al.</i> , 2014).....	20
Figura 9. Reacción química de ABTS (Pannala <i>et al.</i> , 2011).	21
Figura 10. Reacción química FRAP (Benzie y Strain, 1996).	22
Figura 11. Esquema de las envolturas de las bacterias	25
Figura 12. Mecanismos de acción y sitios de acción de los aceites esenciales en las células microbianas (Nazzaro, 2013).....	26
Figura 13. Efecto intracelular de agentes pro-oxidantes (Kong <i>et al.</i> , 2022).	27
Figura 14. Distribución de discos impregnados con diversas concentraciones de <i>Clinopodium macrostemum</i>	45
Figura 15. Porcentaje de humedad de los tejidos frescos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	49
Figura 16. Porcentaje de materia seca de los tejidos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	51
Figura 17. Porcentaje de humedad de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	53
Figura 18. Porcentaje de materia seca de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	54
Figura 19. Porcentaje de ceniza de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	55
Figura 20. Porcentaje de grasa de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	57
Figura 21. Porcentaje de proteínas de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	58
Figura 22. Porcentaje de fibra de los tejidos secos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	60
Figura 23. Porcentaje de carbohidratos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	61

Figura 24. Rendimiento de <i>Clinopodium macrostemum</i> del extracto crudo.....	63
Figura 25. Contenido de fenoles en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	65
Figura 26. Contenido de flavonoides en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	67
Figura 27. Contenido de Terpenos en los extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	69
Figura 28. IC ₅₀ de DPPH con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	70
Figura 29. IC ₅₀ de ABTS con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	72
Figura 30. IC ₅₀ de FRAP con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	73
Figura 31. Prueba Kirby-Bauer para <i>Staphylococcus aureus</i> con Ampicilina y solvente de extracción DMSO:Agua.	79
Figura 32. Prueba Kirby-Bauer para <i>Staphylococcus aureus</i> con Estreptomicina, Gentamicina y solvente DMSO:Agua.....	79
Figura 33. Comparación de los mm del halo de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	82
Figura 34. Prueba Kirby-Bauer para <i>Escherichia coli</i> con Ampicilina y solvente DMSO:Agua.	85
Figura 35. Prueba Kirby-Bauer para <i>Escherichia coli</i> con Estreptomicina, Gentamicina y solvente DMSO:Agua.	85
Figura 36. Comparación de los mm del halo de Inhibición de <i>Escherichia coli</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	88
Figura 37. CMB de <i>Staphylococcus aureus</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	93
Figura 38. CMB de <i>Escherichia coli</i> con extractos de <i>Clinopodium macrostemum</i>	94

Índice de Anexos

Anexo 1. Último reporte de la herramienta anti plagio	113
Anexo 2. Formato de declaración de originalidad y uso de inteligencia artificial	115
Anexo 3. Determinación taxonómica	117

Resumen

El Nurite (*Clinopodium macrostemum*) es una planta endémica de México a la cual se le atribuyen propiedades curativas y antimicrobianas. El objetivo del presente trabajo fue determinar el análisis químico proximal, perfil fitoquímico, capacidad antioxidante, así como antimicrobiana contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* de extractos de nurite (*Clinopodium macrostemum*). Se utilizó la planta de Nurite, originaria de Paracho Michoacán, la cual se caracterizó taxonómicamente para después someterla a secado a la sombra y su posterior molienda. Se realizó el análisis químico proximal a tres tratamientos hojas, hojas/tallo y tallo, donde el tejido de hoja fue el mejor en las determinaciones de: humedad (8.90 ± 0.07), cenizas (11.5 ± 0.089 %), grasa (1.11 ± 0.05 %), proteínas (12.41 ± 0.60 %). En el porcentaje de materia seca y fibra el mejor resultado fue el tejido de tallo (91.53 ± 0.07 % y 37.80 ± 0.022 %). Posteriormente, se prepararon extractos etanólicos por maceración, obteniéndose el mejor rendimiento en el extracto de hoja de nurite (EHN) (11.47 ± 0.63 %). El EHN presentó el mayor valor de fenoles totales, flavonoides totales y terpenos totales de 102.58 ± 0.36 mg EAG/g PS, 23.18 ± 0.20 mg EQ/g PS y 262.44 ± 6.33 mg EL/g PS respectivamente. También se determinó la capacidad antioxidante, donde en DPPH el extracto de tallo de nurite (ETN) presentó la mejor capacidad (IC_{50} 0.079 mg/mL y 628.348 ± 0.114 μ M Eq Trolox/mL). En el ensayo con ABTS y FRAP el mejor extracto fue EHN (IC_{50} de 0.0065 ± 0.00012 mg/mL y 204.197 ± 0.158 μ M Eq Trolox/mL) (IC_{50} de 0.038 ± 0.0002 mg/mL y 294.070 ± 1.124 μ M Eq Trolox/mL). Se realizó la correlación lineal de Pearson y prueba de hipótesis para la correlación (t) entre los compuestos (fenoles, flavonoides y terpenos) con la respuesta antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP), donde se obtuvieron valores de $R^2 0.9 >$ con una $P < 0.05$. En el ensayo antimicrobiano Kirby - Bauer para las bacterias *E. coli* y *S. aureus* la mayor inhibición la presentó el extracto de EHN con 8mg/disco (13.43 ± 0.25 mm y 17.43 ± 0.25 mm respectivamente) y en el ensayo de macrodilución en caldo para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) en *E. coli* el extracto de hoja/tallo de nurite (EHTN) a la concentración de 3.5 mg/mL fue la mejor y para *S. aureus* a la concentración de 225mg/mL el EHN fue el mejor.

Palabras clave: Capacidad antioxidante, inhibición antimicrobiana, tallo, hojas, extractos.

Abstract

Nurite (*Clinopodium macrostemum*) is an endemic plant of Mexico that has been attributed medicinal and antimicrobial properties. The objective of the present work was to determine the proximal chemical analysis, phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial capacity against bacterial strains of *S. aureus* and *E. coli* of nurite (*Clinopodium macrostemum*) extracts. The nurite plant from Paracho, Michoacán, was taxonomically characterised and then subjected to shade drying and subsequent grinding. The proximate chemical analysis was performed on three treatments: leaves, leaves/stem and stem, where the leaf tissue was the best in the determinations of: moisture (8.90 ± 0.07), ash ($11.5 \pm 0.089\%$), fat ($1.11 \pm 0.05\%$), protein ($12.41 \pm 0.60\%$). The best results for dry matter and fiber were obtained with stem tissue ($91.53 \pm 0.07\%$ and $37.80 \pm 0.022\%$). Subsequently, ethanolic extracts were prepared by maceration, with the optimal yield being obtained in nurite leaf extract (EHN) ($11.47 \pm 0.63\%$). The EHN exhibited the highest values for total phenols, flavonoids and terpenes, measuring 102.58 ± 0.36 mg EAG/g DW, 23.18 ± 0.20 mg EQ/g DW and 262.44 ± 6.33 mg EL/g DW, respectively. Antioxidant capacity was also determined, where in DPPH the nurite stem extract (ETN) presented the most effective capacity (IC₅₀ 0.079 mg/mL and 628.348 ± 0.114 μ M Eq Trolox/mL). In the assay with ABTS and FRAP, the best extract was EHN (IC₅₀ of 0.0065 ± 0.00012 mg/mL and 204.197 ± 0.158 μ M Eq Trolox/mL) (IC₅₀ of 0.038 ± 0.0002 mg/mL and 294.070 ± 1.124 μ M Eq Trolox/mL). Pearson's linear correlation coefficient and the hypothesis test for correlation (t) between compounds (phenols, flavonoids and terpenes) and the antioxidant response (ABTS, DPPH and FRAP) were performed. R² values of 0.9 or greater with a P < 0.05 were obtained. In the Kirby-Bauer antimicrobial assay for *E. coli* and *S. aureus* bacteria, the highest inhibition was presented by the EHN extract with 8 mg/disc (13.43 ± 0.25 mm and 17.43 ± 0.25 mm, respectively) and in the broth macrodilution assay, the minimum bactericidal concentration (MBC) in *E. coli* the nurite leaf/stem extract (EHTN) at the concentration of 3.5 mg/mL was the best and for *S. aureus* at the concentration of 225mg/mL was identified as the most effective for this bacteria.

Keywords: Antioxidant capacity, antimicrobial inhibition, stem, leaves, extracts.

1. Introducción

El Nurite (*Clinopodium macrostemum*) conocido en Michoacán como Té Nurite es una planta endémica de México perteneciente a la familia de las *Lamiaceae* o *labiadas* y al igual que la mayoría de las especies de esta familia presentan propiedades de interés por su sabor y aroma, así como también por sus propiedades curativas. Esta planta es muy conocida en los pueblos purépechas, ya que funge como símbolo y tradición de su cultura, ya que para ellos es considerado símbolo de fertilidad y es utilizada en la actualidad para tratar diversos padecimientos. Esta se consume en forma de infusión hirviendo la planta completa en agua y se toma como agua de uso, brindando beneficios a la salud aliviando el dolor de estómago, la inflamación de los ovarios, las afecciones gastrointestinales, entre otros padecimientos (González, 2014). Cabe mencionar que esta planta emite un olor y sabor agradable además de ser utilizada para sazonar platillos típicos de Michoacán como el churipo y el chileatole. En la literatura se documenta que la planta de nurite presenta una mezcla de compuestos químicos denominados flavonoides, los cuales fueron estudiados de manera extensa en los últimos años, sobre todo por su efecto antioxidante (Pérez y Gallardo, 2010); entre aquellos que se han extraído de sus hojas se citan a la naringenina, y ciertos terpenos como limoneno, pulegona, carvacrol y timol, los cuales son ampliamente estudiados y considerados por su efecto antimicrobiano (Bello, 2006).

El uso de materias primas de origen vegetal ha existido desde hace mucho tiempo, por lo que se han encontrado vestigios de las civilizaciones antiguas. El empleo de plantas para su utilización fue de manera inesperada o por mera casualidad, pero al ver los efectos benéficos que algunas plantas generaban en las personas se preservó esta actividad hasta el día de hoy llevando la fitoterapia a ser relacionada en la actualidad con varias ciencias aparte de la medicina como lo son: farmacéutica, cosmética y alimentaria (Aiache *et al.*, 1996).

En la industria alimentaria los conservadores son los principales aditivos empleados para aumentar la vida útil de los alimentos ya que tienen efectos antioxidantes (AOX) y antimicrobianos (AMA). Tal es el caso de los aditivos de origen sintético como los sulfitos (SO₃) y nitritos (NO₂) pero estos pueden producir reacciones adversas si no se respeta la dosis máxima establecida (Martínez *et al.*, 2015).

Por motivo de los efectos adversos que generan el consumir alimentos procesados se han puesto en curso varias investigaciones donde los extractos de plantas pueden fungir como una fuente de compuestos capaces de controlar la actividad antibacteriana para evitar el deterioro de los alimentos. Así como también se ha probado sus efectos como antioxidante brindando una alternativa más saludable comparada con los antioxidantes sintéticos del mercado (Vieitez *et al.*, 2018).

Como se sabe los efectos antioxidantes y antimicrobianos de las plantas son atribuidos a sus metabolitos secundarios tras su extracción principalmente por el contenido de fenoles y aceites esenciales (Beuchat y Golden, 1989; Rodríguez, 2011).

Existen diversas investigaciones con extractos de Nurite (*Clinopodium macrostemum*) la mayoría de ellas se enfocan en sus aceites esenciales los cuales generalmente son extraídos por el método de arrastre de vapor los cuales tienen compuestos volátiles como lo son terpenos, terpenoides y fenilpropanoides. Sus aceites esenciales han demostrado que esta planta estabiliza al radical DPPH y ABTS, así como también genera inhibición de microorganismos tales como *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolitica*, *Pseudomonas syringae* pv. *Glicinea*, *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Rhizopusstolonifer* a diferentes concentraciones (Villa *et al.*, 2015).

Al hablar de compuestos no volátiles como los fenoles y flavonoides que se extraen por maceraciones al hacer una exhaustiva investigación respecto al nurite únicamente se han publicado 3 trabajos con materia prima de Oaxaca (Alonso, 2009, Carbajal, 2023 y García-Reyes *et al.*, 2023).

En nuestro grupo de trabajo es de interés dar a conocer que no solamente los compuestos volátiles del Nurite presentan actividad antioxidante y antimicrobiana, sino que también los compuestos con mayor peso molecular como los fenoles y flavonoides los cuales presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas para con ello enriquecer la bibliografía actual que se encuentra disponible de esta planta. Cabe resaltar que nuestra materia prima fue colectada en el cerro del Águila localizado en Paracho de Verduzco Michoacán, México (2816 msm, 19°34'60" N y 102°3'0" W) de la cual no existen reportes aún por lo que el objetivo general de este estudio fue determinar la composición química proximal,

fitoquímica, capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de nurite (*Clinopodium macrostemum*, Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze.

2. Marco teórico

2.1 Nurite (*Clinopodium macrostemum*, Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze

El nurite es una planta perteneciente a la familia de las labiadas (Lamiaceae). Las labiadas son una familia botánica que tienen alrededor de 3000 especies de plantas distribuidas por las zonas cálidas y templadas de todo el planeta. Este tipo de plantas presentan la característica de medir hasta 3 metros de altura. Estas tienen importancia nutricional y terapéutica y aplicaciones en el área ornamental, gastronómica y salud (Masats, 2021).

La investigación presentada por Martínez-Gordillo, *et al* (2017), indica que las lamiáceas presentan un endemismo del 66.2% de 33 géneros y 598 especies en México, donde se resalta el género *Salvia* con 306 especies, siendo el más diverso. El estado que presenta mayor diversidad es Oaxaca; mientras que Jalisco es el que alberga mayor número de especies endémicas. Con ello las lamiáceas se encuentran como la octava familia con mayor diversidad en México, y representando el 5.5% de esta familia a nivel mundial.

2.1.1 Características físicas

Las hojas de la planta de nurite son alargadas, ovaladas y puntiagudas. En el anverso presentan un color verde oscuro y en el reverso verde pálido con vellosidades (pubescencias), sus flores son de color rosa a amarillo las cuales aparecen al inicio del año (Muñoz, 2012) (Figura 1).



Figura 1. Hoja y flor de la planta de Nurite (Delfín, 2015).

Rzedowski y Rzedowski (2010) mencionan que es una planta en forma de arbusto que cuando se aprieta produce un aroma mentolado. En cuanto a sus características físicas puede llegar a medir entre 1 a 2 m, sus tallos son erectos (derechos), ramas arqueadas y es pubescente (tricomas). En sus hojas cuenta con peciolo de 2 a 5 mm de largo, en su limbo (parte de la hoja que se ensancha) puede llegar a tener forma de huevo (ovado) la cual puede ser más larga que ancha (oblongo) hasta tener forma de lanza (lanceolado) por lo que su ápice es agudo, tiene en sus lados formas aserradas y en su base muestra una forma redondeada. En cuanto a sus flores estas se encuentran en las axilas de las hojas en solitario o en grupos de 2 o 3 sostenidos por un pedicelo que puede ser pubescente y medir de 2 a 6 mm de largo. El cáliz de la flor puede ser dentado y en forma de dos labios (bilabiado) con un largo que va de los 7 a los 10 mm, con la garganta pilosa. En cuanto a sus pétalos (corola) miden de 2 a 3.5 cm de largo donde pueden presentar colores rojos o anaranjados y cuando estos se secan pueden virar a colores blanquizcos o rosados. Sus estambres al sobresalir de la corola se consideran exsertos con tecas de las anteras divergentes. Sus mericarpios pueden ser de forma ovoide, lisos o reticulados.

2.1.2 Taxonomía

Existen diversos nombres coloquiales o sinónimos para referirse al nurite dependiendo de la zona, estado o municipio donde se encuentre o utilice (Muñoz, 2012). En el estado de México y CDMX, se le conoce como “tabaquillo” y “toronjil”; en Oaxaca, “hierba de borracho”, “té de monte” y “poleo”. Este último también es utilizado en el estado de Michoacán donde también le llaman “té nurite”, “nurhíten” y “nurite” (Rzedowski y Rzedowski, 2010). También se le conoce como “atochietl”, “borracho”, “menta”, “nurhitini te (purépecha)”, “tragorigano quauhnhuacense” y “tunché” por mencionar algunos (González, 2014).

Por esta basta diversidad de nombres es importante esclarecer su nombre científico actual: *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth). Kuntze. Cabe mencionar que anteriormente el nombre científico de esta majestuosa planta era *Satureja macrostema* (Moc. & Sessé ex Benth) Briq, sin embargo, es preciso recordar que los nombres científicos pueden sugerir o brindar una idea al lector de la clasificación taxonómica de un ser vivo u organismo,

pero aun así pueden modificarse si los investigadores o científicos desarrollan nuevas teorías más sobre las relaciones evolutivas entre organismos ver Tabla 1.

Cantino y Wagstaff (1998) al realizar pruebas de ADN sugirieron que la planta de nurite por largo tiempo fuera llamada de manera científica *Satureja macrostema* y reclasificado en el género de *Clinopodium*.

Esta planta cuenta con dos variaciones o taxones infraespecíficos: *macrostemum* y *laevigatum*. Generalmente estas dos variedades crecen juntas o son muy cercanas, pero presentan una distribución alopátrica donde la única diferencia de estas recae específicamente en que la segunda es glabra en sus partes vegetativa y por dicha cuestión es difícil clasificarlas como individuos de diferente especie; debido a esto, estos taxones infraespecíficos se consideran de la misma especie *Clinopodium macrostemum* (Turner, 2008).

Tabla 1. Clasificación Botánica del Nurite (García, 2013).

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Labiatae
Género	<i>Clinopodium</i>
Especie	<i>Clinopodium macrostemum</i>
Nombre científico	<i>Clinopodium macrostemum</i> (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze

2.1.3 Distribución

El Nurite crece en suelos ligeramente ácidos (Ortega-Ortega y Vázquez-García, 2014), por debajo del árbol de encino y pino o donde se encuentren ambos. Estos generan una cobertura de dosel cerrado que permite poca incidencia de luz solar que traspasa la cobertura y que sea

aprovechada por la planta para la fotosíntesis y síntesis de compuestos aromáticos. Esta planta también crece generalmente en bosques de oyamel y matorrales (Valladares, 2006; Umafor, 2009; Rzedowsk y Rzedowski, 2010).

2.1.3.1 Distribución Nacional

El nurite (*Clinopodium macrostemum*) se distribuye en México en las áreas montañosas generalmente en el occidente de México (Sinaloa, Nayarit, Colima, Jalisco, Michoacán y Guerrero) pero existen reportes que también se ha encontrado en Oaxaca, Puebla y Estado de México (Turner, 2008) (Figura 2).

Generalmente la planta de nurite crece en lugares altos entre los 2450 y 3500 msnm (Rzedowski y Rzedowski, 2010). En Oaxaca se encontraron entre los 2345 y 2900 msnm (Ortega-Ortega y Vázquez-García, 2014).

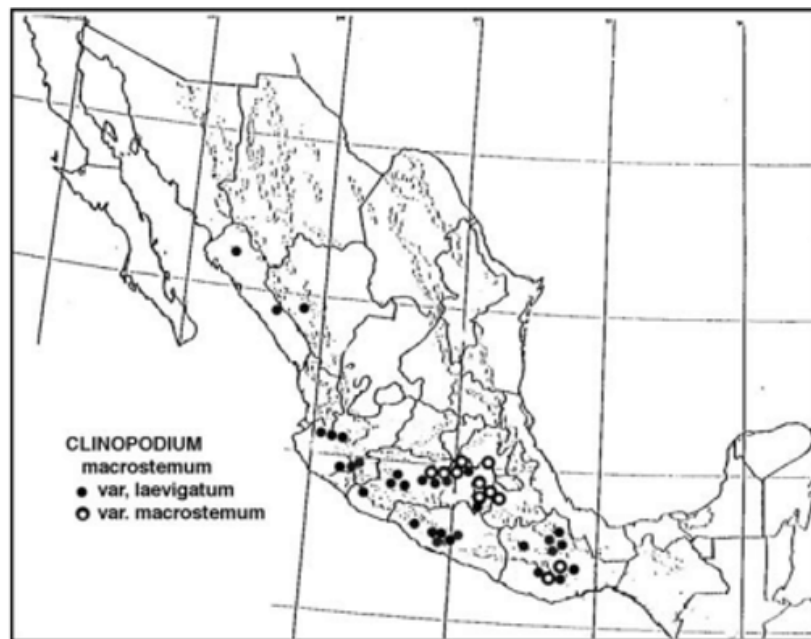


Figura 2. Distribución en México de los Taxones infraespecíficos de *Clinopodium macrostemum* Var. *Laevigatum* y *macrostemum*. (Turner, 2008).

2.1.3.2 Distribución en Michoacán

En la Figura 3 se muestra la distribución del nurite, sus taxones infraespecíficos y la ubicación en el municipio de Paracho de Verduzco en el estado de Michoacán, donde el ejemplar estudiado podría ser Variedad *laevigatum* pero acorde a lo ya mencionado, se consideraría de la especie *Clinopodium macrostemum*.

Los municipios dentro del estado de Michoacán donde se encuentra el nurite son: Uruapan, Paracho, Nuevo San Juan Parangaricutiro, Coalcomán, Aguililla, Charo, Tzintzuntzan, Zacapu, Zinapécuaro, Zitácuaro, Contepec, Chilchota, Churintzio, Erongarícuaro, Jiquilpan, Lagunillas, Madero, Tancítaro, Coalcomán, Nahuatzen, Senguio, Angangueo, Morelia, Pátzcuaro, Quiroga, Los reyes, Salvador Escalante y Tlalpujahuá (Bello, 1993; Rzedowski y Rzedowski 2010; Aguilar, 2015).



Figura 3. Distribución del nurite en municipios de Michoacán (Bello, 1993).

2.1.4 Propiedades y usos del Nurite

El nurite, conocido en Michoacán por sus propiedades curativas es utilizado como carminativo, mejora la digestión y combate las infecciones estomacales. Esta planta es ampliamente preparada como infusión en la meseta purépecha, cabe mencionar que en la actualidad se emplea para complementar ciertos platillos típicos de la región, tal es el caso del chileatole y guisados con frijol (Pérez y Gallardo, 2010). Se sabe también que el nurite es empleado para tratar síntomas de resaca tras el consumo excesivo de bebidas alcohólicas, por lo que es llamada “hierba del borracho” (Bello, 1993).

En el estado de Oaxaca se utiliza en rituales y ceremonias, un ejemplo es cuando se reparte en manojos pequeños, cómo un presente. También se ha utilizado para adornar edificios en fiestas. Por estos usos y costumbres además de los beneficios a la salud, es que el Nurite se ha convertido en una planta de interés para su investigación científica (Aguilar, 2002; Ortega-Ortega y Vázquez-García, 2014). En el municipio de Paracho de Verduzco durante la época decembrina, las mujeres de la comunidad indígena preparan atole de nurite y en ocasiones lo utilizan como condimento para ricos platillos regionales como el churipo, mejor conocido como mancha mantel (caldo a base de chile rojo y carne de res).

En Oaxaca también se ha explotado la planta al conocer su sabor y aroma agradable y empleándose en la preparación de bebidas tradicionales cómo los destilados de agave (Villa-Ruano *et al.*, 2015).

2.1.5 Economía entorno al Nurite

El nurite es considerado como un Recurso Forestal No Maderable (RFNM) lo que significa que no puede ser transformado en madera y que su producción proviene de los bosques de manera natural, el cual se cosecha *in situ* para el uso humano. Su cosecha beneficia al sector económico, así como también a comunidades forestales como la de San Miguel Mixtepec en Oaxaca ya que se comercializa por las llamadas “viudas” (mujeres adultas sin hijos y sin pareja) a bajo precio (Ortega-Ortega y Vázquez-García, 2014).

En el municipio de Paracho de Verduzco, Michoacán, es similar la manera en cómo se comercializa el Nurite que, en el estado de Oaxaca, ya que generalmente en los mercados es vendido por las mujeres de la comunidad indígena para su sustento económico donde lo aprovechan también para vender alimentos como chapatas (tamal de frijoles dulces) y atole de grano. El nurite es muy conocido por sus beneficios a la salud y se estima mayor demanda dentro de este municipio.

2.2 Extractos de plantas y sus compuestos activos

El hombre siempre ha tenido a su alcance gran variedad y diversidad de plantas para su uso personal, ya sea como fuente principal de alimento, papelería, medicina y hasta para la

obtención de materias primas de uso textil (Pedrozo, 2004; Sierra *et al.*, 2018). Las plantas contienen diferentes sustancias o compuestos químicos con actividad biológica que deben de extraerse a través de “extractos vegetales”, preparaciones líquidas o en polvo que presentan sustancias conocidas como “fitoquímicos”. Estas sustancias han sido requeridas en la actualidad por su efecto y capacidad antimicrobiana y antioxidante, por lo que han desplazado a los productos químicos sintéticos (Vieitez *et al.*, 2018).

Los compuestos producidos por las plantas que son identificados en los extractos vegetales, son conocidos como metabolitos primarios y secundarios. Cabe mencionar que los de mayor interés son los metabolitos secundarios, los cuales son sustancias que no juegan algún papel esencial en la fotosíntesis y/o asimilación y transporte de nutrientes. Estos metabolitos son sintetizados por diferentes rutas metabólicas de las plantas como mecanismo de defensa y debido a una respuesta de estrés. Dentro de los metabolitos secundarios podemos mencionar 4 grandes grupos: compuestos fenólicos, glucósidos, terpenos y alcaloides (Martín, 2018).

Una de las variables a considerar en la obtención y composición de estos extractos vegetales es la elección del solvente y del método de extracción. En el empleo de solventes es importante considerar su polaridad, ya que estos tienen efectos de relación estructura-propiedad afectando o favoreciendo propiedades moleculares como: longitud del enlace, polarizabilidad, distribución de electrones, momentos dipolares, estabilidades relativas de diferentes isómeros conformacionales y parámetros espectroscópicos; esto a su vez tiene efecto en las interacciones inter e intramoleculares y por ende su actividad (Zheng *et al.*, 2017).

2.2.1 Métodos de extracción

Diferentes métodos son utilizados en la extracción de metabolitos secundarios de las plantas. A continuación, se mencionan algunos de ellos.

2.2.1.1 Maceración y extracción con solventes volátiles

La extracción con solventes volátiles se realiza colocando la muestra seca y molida en contacto con el disolvente orgánico. Estos solubilizan la esencia y los compuestos volátiles,

así como las ceras y grasas que forman impurezas como las oleorresinas (Peredo *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2018).

Por otra parte, la maceración es un proceso de extracción sólido-líquido donde componentes solubles del sólido serán extraídos y disueltos en el solvente. El resultado de la maceración son dos productos; el sólido ausente de esencias y el solvente o extracto con los componentes solubilizados los cuales serán empleados o utilizados acorde las necesidades de la investigación. La característica de los compuestos obtenidos dependerá de la materia prima empleada y del solvente de extracción (Sierra *et al.*, 2018).

En este tipo de técnicas, el tiempo y la temperatura juegan un papel muy importante en la obtención de extractos vegetales, de ello depende la concentración y calidad de estos, ya que existen compuestos termolábiles que se ven afectados por la temperatura. Además, el consumo energético es una desventaja al aplicar calor por lo que es recomendable trabajar en frío, pero los tiempos de extracción aumentan (López, 2008; Sierra *et al.*, 2018).

2.2.1.2 Destilación por arrastre de vapor

En esta técnica se emplea vapor de agua el cual es generado en un equipo secundario e inyectado al equipo principal donde se encuentra la planta. (Günther, 1948; Rodríguez *et al.*, 2012).

Este vapor es denominado vapor de arrastre sobre la materia vegetal, para la obtención de compuestos volátiles condensados junto con el vapor de agua, formando una mezcla inmisible (que no se mezclan) de dos fases, y donde se obtiene en la parte superior el aceite esencial y en la parte inferior el agua aromática que posteriormente será separada. Al final del proceso y en el equipo de destilación, permanecen los compuestos no volátiles, los cuales pueden ser solubles en agua caliente y en el matraz colector los compuestos volátiles insolubles en agua (Rodríguez *et al.*, 2012).

2.2.1.3 Extracción por el método soxhlet

La extracción por el método Soxhlet consiste en emplear solventes orgánicos en el equipo Soxhlet. Este solvente estará en constante reflujo pasando a través de la muestra contenida

en el dedal poroso de celulosa o vidrio, realizando así varios lavados, hasta obtener la mayor cantidad de compuestos, transferidos del material sólido al solvente (Canosa, 2009; Sierra *et al.*, 2018).

2.3 Aceites esenciales

Diferentes compuestos se pueden producir en el metabolismo secundario de las plantas, entre los cuales se encuentran los aceites esenciales de naturaleza líquida con poca o nula solubilidad en agua y solubles en sustancias con polaridad menor que el agua como el alcohol y disolventes orgánicos como el éter de petróleo y el hexano. Los aceites esenciales constituyen solamente del 0.1 al 1 % del peso seco de la planta. Su composición química es compleja, ya que se constituyen de varias sustancias y en su mayoría del grupo de los terpenos y, en menor cantidad, al grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano como el aldehído cinámico, eugenol, anetol, aldehído anísico y safrol (López, 2004; Sierra *et al.*, 2018) (Figura 4).



Figura 4. Aceites esenciales extraídos de partes de las plantas (OKDIARIO, 2019).

Alrededor de 60 familias de plantas producen aceites esenciales, incluyendo a familias de las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas. Estos se encuentran en todos los órganos de las plantas donde se incluyen: brotes, flores, hojas, semillas, ramitas, tallos, flores, frutos, raíces y cortezas. Las plantas generalmente los almacenan en células secretoras, cavidades, canales, tricomas glandulares o células epidérmicas (Bakkali, 2008; Nazzaro, 2013).

Los aceites esenciales son los responsables del aroma y sabor de las plantas, y por dichas propiedades, estos son utilizados en la industria cosmética para brindar aroma a perfumes y maquillajes; en la industria alimentaria para brindar sabor o condimentar productos, y en la industria farmacéutica para ciertas características deseables en los medicamentos. Químicamente, los aceites esenciales se clasifican con base en los compuestos mayoritarios que presenten, en los que destacan: monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Martínez, 1996; Sierra *et al.*, 2018).

2.3.1 Composición del aceite esencial del Nurite

Diferentes estudios han reportado la colecta de ejemplares de Nurite en Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México (19°25'23''N, 102°07'47''W) donde fue micropropagado, estudiado y cultivado en invernadero:

- a) En el estudio de Bello *et al* (2006) se identificaron los siguientes compuestos por cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas (CG-EM):
 - Monoterpenos: linalool, limoneno, canfor, timol, pulegona, p-cimeno, α -terpineol, canfeno, limoneno y 4-terpinenol.
 - Triterpenos: ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido 3-hidroxi-ursenoico.

- b) Torres (2018), cultivó el nurite en invernadero en macetas de 1.5 kg que contenían una mezcla de peat moss y perlita (1:1), en condiciones de 50%-60% de humedad relativa sin control de luz y temperatura, y fueron regadas cada 5 días. Las plantas se fertilizaron en el sustrato una vez por cada mes con 1 g/bote de Nutrigarden Excelso (N-P-K, 17-17-17) durante 6 meses y posteriormente se obtuvo aceite esencial por hidrodestilación de sus partes aéreas. Este aceite fue analizado mediante CG-EM para la identificación y cuantificación de los terpenos, resultando los mayoritarios: pulegona (25.50%), linalool (16.62%), timol (14.64%), limoneno (5.53%), cariofileno (3.98%) y mentona (3.09%) ().

- c) En otra investigación, se micropropagó la planta de Nurite y se cultivó en condiciones de invernadero durante 30 días, se realizó CG-EM donde se identificaron los siguientes compuestos: Limoneno (1.5 %), β -Linalool (30.4%), Mentona (2.8%), Pulegona (58.3%) y acetato de verbenol (7.0 %). En este estudio se adicionó micorizas (*Rhizophagus Irregularis*) (50 spores/plant) y se determinó que la pulegona, el linalol y el acetato de verbenol aumentaron significativamente su contenido comparado con la planta sin micorriza (Carreón-Abud *et al*, 2015).
- d) Otro estudio analizó el aceite esencial de Nurite Colectado en San Andrés Paxtlán, Oaxaca, México, (16°13.081'N 096°30.331'W; 1996 masl) de diferentes estaciones del año (verano, otoño, invierno y primavera) mediante la metodología de micro extracción en fase solida (SMPE por sus siglas en inglés) y por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), mostrando 26 diferentes compuestos de los cuales la mentona (34%) y el óxido de piperitona (30%) fueron los más abundantes en todas las estaciones estudiadas. En la Tabla 2 se muestran los diferentes componentes del aceite esencial de *Clinopodium macrostemum* var. *Laevigatum* (Villa-Ruano, 2015).

Tabla 2. Constituyentes volátiles de hojas de *Clinopodium macrostemum* variedad levigata recolectada en verano.

ID	Compuesto	SMPE %	Aceite esencial %
1	-Pineno*	1.5 ± 0.02	0.8 ± 0.03
2	Sabineno	0.2 ± 0.04	0.3 ± 0.02
3	-Pineno*	1.6 ± 0.09	1.5 ± 0.07
4	Octenol	0.4 ± 0.03	0.4 ± 0.03
5	Limoneno*	1.2 ± 0.09	1.0 ± 0.09
6	Cineol	0.4 ± 0.02	1.4 ± 0.06
7	Linalool*	8.1 ± 0.05	5.2 ± 0.45
8	3-Octanol, acetato	2.1 ± 0.64	1.3 ± 0.05
9	Mentona*	34.4 ± 2.15	35.3 ± 2.5
10	Isomentona	0.2 ± 0.01	0.6 ± 0.02

11	Pulegona*	4.9 ± 0.28	3.7 ± 0.26
12	Isopulegona	0.3 ± 0.02	1.2 ± 0.07
13	Verbenona	none	3.6 ± 0.39
14	óxido de piperitona	30.1 ± 1.23	31.2 ± 1.67
15	Isopulegona, 4-metil-	1.2 ± 0.05	1.1 ± 0.09
16	Ciclooctilo acetato	none	1.2 ± 0.04
17	n- Hexil hexanoato	2.5 ± 0.07	0.5 ± 0.05
18	n- Octil butirato	1.3 ± 0.08	0.6 ± 0.04
19	cis- Jasmona	0.8 ± 0.04	0.8 ± 0.07
20	- Cariofileno *	1.8 ± 0.12	1.5 ± 0.07
21	Biciclogermacreno	0.5 ± 0.03	1.6 ± 0.12
22	- Farneseno	2.7 ± 0.09	0.4 ± 0.02
23	Spathulenol	0.4 ± 0.03	1.5 ± 0.13
24	Bulnesol	1.6 ± 0.08	1.3 ± 0.09
25	Eudesmol	0.5 ± 0.03	0.5 ± 0.03
26	Tau-Muurolol	0.6 ± 0.02	0.7 ± 0.08

SPME % = Micro extracción en fase solida (Villa-Ruano, 2015).

2.4 Polifenoles

Los polifenoles son compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos unidos a uno o varios grupos hidroxilo (OH). Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones *et al.*, 2012).

Los flavonoides son un importante grupo de moléculas biológicamente activas que se encuentran dentro de esta clasificación, de los cuales podemos mencionar su estructura básica C6-C3-C6 y donde encontramos a las antocianinas, flavonoles y flavonas, las flavanonas, chalconas y dihidrochalconas, las isoflavonas y los flavan-3-oles. De este tipo de compuestos se conocen más de 5000 en la naturaleza (Barberán, 2003).

Otros subgrupos importantes serían los conocidos como fenilpropanoides, los cuales generalmente se encuentran en los aceites esenciales, cuentan con un grupo fenol aromático de seis carbonos y una cola de propeno de tres carbonos. Dentro de los compuestos más estudiados es el eugenol, isoeugenol, vainillina, safrol y el cinamaldehído (Nazarro *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Alonso (2009), se obtuvo un extracto a base de metanol de la planta de Nurite la cual se colectó en San Pedro el Alto municipio de Zimatlán en el estado de Oaxaca. El extracto fue elaborado por el método Soxhlet utilizando 15 g únicamente de hojas secadas previamente a la sombra. Se obtuvieron 3 compuestos (Figura 5, 6 y 7) flavonoides del subgrupo de las flavonas de los cuales el que presentó una actividad antioxidante buena fue el 5,4'-dimetoxi-7,3'5'-trihidroxi,3-O-[β -D-ramnósido]-flavona (figura 7), se cree es debido a la relación estructura-actividad y por la presencia de los grupos hidroxilos en C3, C5 y C7. Hubiese tenido mayor actividad sin el azúcar C3 y grupos metoxilo en C4 y C7.

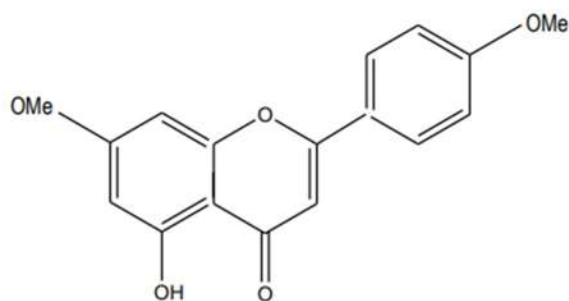


Figura 5. Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Alonso, 2009).

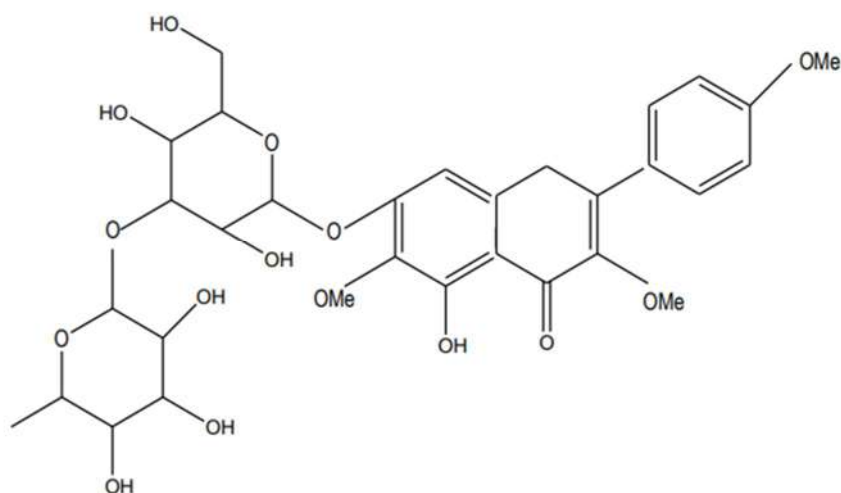


Figura 6. Compuesto 7-C-[α -L-Ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido]- 5, hidroxi-3,6,4'-trimetoxiflavona (Alonso, 2009).

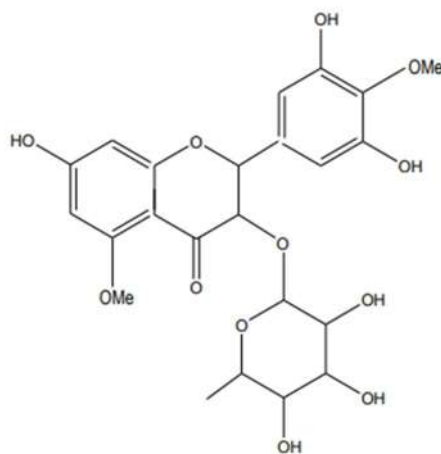


Figura 7. Compuesto 5,4'-dimetoxi-7,3'5'-trihidroxi,3-O-[β -D-ramnosido]-flavona (Alonso, 2009).

2.5 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias capaces de retardar o prevenir la oxidación lipídica causada por el exceso de radicales de oxígeno originados por el ambiente o algunos patógenos (Barbieri *et al.*, 2016). Los antioxidantes pueden ser naturales o sintéticos, y tienen relevancia

en la industria alimentaria debido a que pueden ser utilizados como conservadores ya que pueden prevenir o detener el deterioro causado por la acción del oxígeno. En la industria bioquímica y farmacéutica son de gran interés debido a su capacidad de evitar la oxidación en tejidos animales (Gupta, 2015).

La búsqueda de nuevas fuentes naturales con actividad antioxidante ha sido de gran importancia, debido a que los antioxidantes sintéticos tienen efectos adversos (Barbieri *et al.*, 2016). El uso de plantas medicinales y sus extractos son fuentes de antioxidantes ya que cuentan con sustancias derivadas de sus metabolitos secundarios con la capacidad de inhibir la formación de radicales libres (Silva *et al.*, 2018).

2.5.1 Fundamentos de las técnicas para la determinación del perfil fitoquímico

2.5.1.1 Polifenoles totales

El Ensayo de Folin-Ciocalteu es utilizado para medir el contenido de fenoles totales de una muestra de origen natural. En este método sucede una reacción de óxido reducción (redox). La oxidación de los fenoles presentes en la muestra genera la aparición de una coloración azul llegando a ser leída por el espectrofotómetro a un máximo de 765 nm y esta se cuantifica mediante una recta de ácido gálico como patrón (Rojas, 1996).

2.5.1.2 Flavonoides

El método de determinación de flavonoides requiere de $AlCl_3$, donde se utiliza el Al^{3+} el cual se une con los grupos cetos e hidroxilos de los flavonoides, a través de una reacción de transferencia de electrones generando así en la muestra un color amarillo intenso que presenta absorbancia máxima de 510nm (Chang *et al.*, 2002).

2.5.1.3 Terpenos

El ensayo es utilizado para medir el contenido de terpenos de una muestra de origen natural. En este método surge una reacción entre los terpenos o triterpenos con la vainillina en presencia del H_2SO_4 . Básicamente el ácido sulfúrico oxida a los terpenos, cediendo H^+ para

posteriormente el terpeno oxidado se une a la vainillina formando un complejo de color rojo (Chang y San Lin, 2012; Moraes *et al.*, 2020).

2.5.2 Fundamentos de las técnicas para la determinación de la capacidad antioxidante

2.5.2.1 DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

El DPPH es un radical libre estable el cual al tener una deslocalización del electrón sobrante en la molécula genera una dimerización que generalmente ocurre en la mayoría de los radicales libres produciendo con esto *in vitro* un color violeta que se lee espectrofotométricamente a una longitud de onda de 520 nm. Cuando se produce la reacción de DPPH con un donador de hidrógeno se genera una coloración amarilla (Molyneux, 2004). Se dice que esta coloración final es debido a la aparición de hidracina y el método básicamente mide la reducción de absorbancia generada por el cambio de color producido por la sustancia antioxidante (Figura 8). La actividad se expresa como concentración inhibitoria IC50, que es la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH (Choi,2002, Sánchez-Moreno,2002). La principal limitación de la determinación de IC50 es que el porcentaje de radicales libres eliminados depende de la concentración inicial de radical DPPH (Magalhães, 2008).

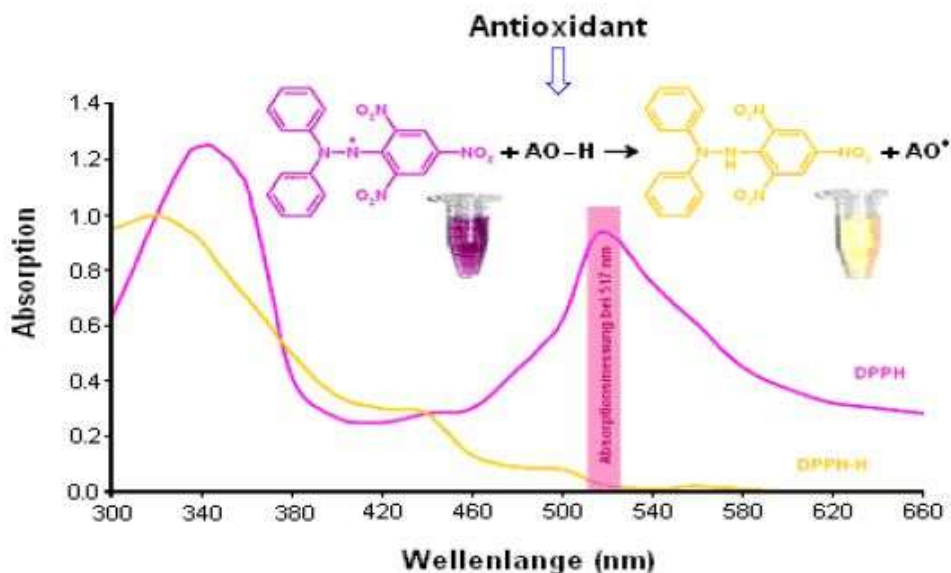


Figura 8. Estructura del radical DPPH y su reducción por un antioxidante (AO-H) (Boligon *et al.*, 2014).

Bilia, en el año 2004 describe al método donde AH es un antioxidante que actúa como un antirradical el cuál dona átomos de hidrógeno generando con esto radicales estructuralmente estables los cuales estarán encargados de retener la reacción en cadena. El nuevo radical que se formó (A) puede unirse con otro radical para generar moléculas estables como se muestra en la reacción:



2.5.2.2 Método ABTS (catión radical 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazolina-6-sulphonato) o TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox)

El método ABTS-TEAC evalúa la habilidad de un antioxidante de secuestrar el radical ABTS generado en fase acuosa y es comparado con un estándar llamado Trolox el cual es un análogo de la vitamina E. El radical ABTS es generado mediante la reacción con un fuerte agente oxidante como lo sería el permanganato de potasio o persulfato de potasio. El color original del ABTS•+ en solución es de color verde-azulado y al reaccionar con un antioxidante

donador de hidrógeno genera la decoloración del mismo convirtiéndolo de nuevo en su forma neutra incolora y con ello se mide la supresión de su característico espectro de absorción de onda larga (Figura 9). Los resultados suelen expresarse como capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) (Simonetti, 1997). Este método puede ser aplicado al estudio de antioxidantes de tipo hidrosoluble y liposoluble, compuestos puros y extractos de alimentos (Gazzani *et al.*, 1998).

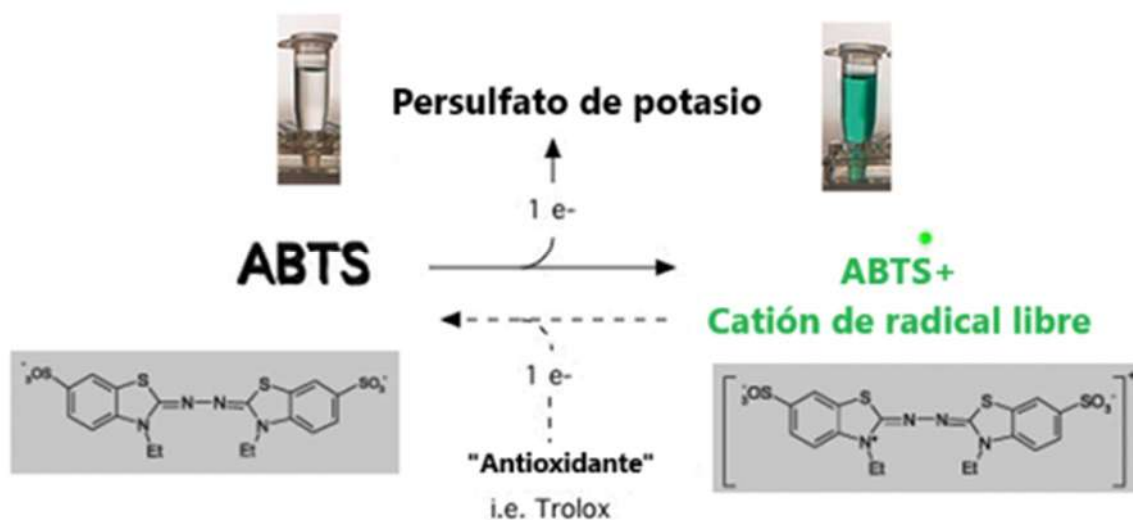


Figura 9. Reacción química de ABTS (Pannala *et al.*, 2011).

2.5.2.3 Método FRAP (Poder antioxidante para reducir el Hierro o capacidad reductora férrica del plasma)

Esta técnica tiene el fin de medir la actividad antioxidante total basándose en la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El análisis se basa en la capacidad de reducir el ion férrico (Fe^{3+}) al ion ferroso (Fe^{2+}) usando un antioxidante produciendo con esta reacción un complejo azul (Figura 10). Esta reacción se realiza a pH 3.6. Cuando existe un antioxidante la forma férrica del complejo hierro-tripiridyl-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a la forma ferroso (Fe^{2+} -TPTZ). Esta última da la coloración al azul intenso que se lee a no más de 593 nm. Cabe mencionar que no todos los antioxidantes son capaces de reducir el Fe^{+3} y

este método no detecta antioxidantes que actúen por transferencia de átomos de H, por ejemplo, los Tioles (Antolovich *et al.*, 2002; Benzie y Strain, 1996; Pullido *et al.*, 2000).

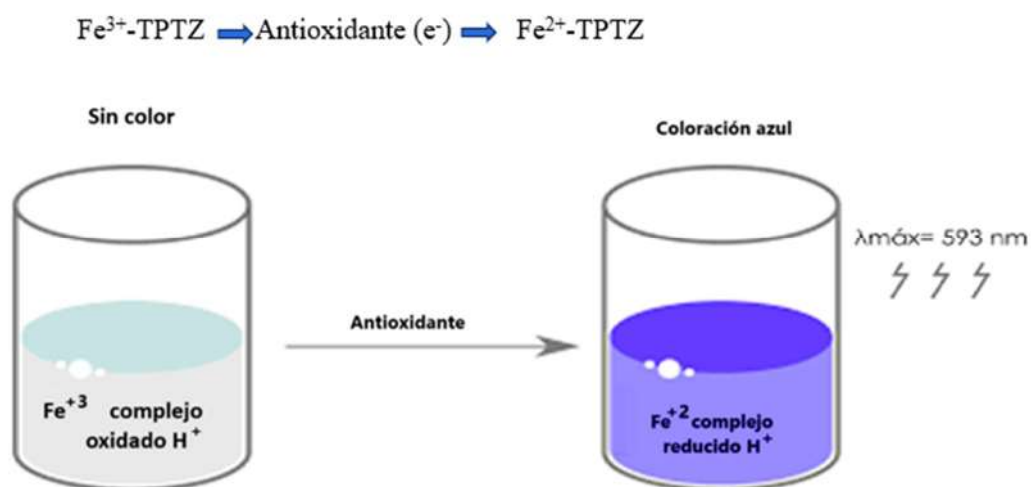


Figura 10. Reacción química FRAP (Benzie y Strain, 1996).

2.5.3 Antecedentes de pruebas del nurite como antioxidante

El nurite tiene propiedades antioxidantes en extracto metanólico. Esto fue demostrado en pruebas de ensayo de decoloración de β -caroteno, en las cuales, al someter el extracto al proceso de biofraccionamiento por métodos cromatográficos (CC y CCD) se obtuvieron tres compuestos puros:

- 5, Hidroxi-7,4-dimetoxiflavona
- 7-C-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosido]-5, hidroxi-3,6,4-trimetoxiflavona.
- 5,4-dimetoxi-7,3 ,5-trihidroxi-3-O-[β -D-ramnósido]-flavanona.

Estos fueron identificados por espectroscopia, EM, EIR, RMN, de H y RMN de C, COSY y HMBC. Se encontró que el compuesto 5,4-dimetoxi-7,3 ,5-trihidroxi-3-O-[β -D-ramnosido]-flavanona presentó un 75% de actividad antioxidante ($IC_{50} = 93.31 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) con respecto al del ácido ascórbico ($IC_{50}=123.46 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$) (Alonso, 2009).

En otro estudio y con la misma técnica de decoloración de β -caroteno, pero con aceite esencial en concentración de 3 – 4 mg/mL⁻¹ al realizar pruebas de DPPH en concentraciones de 1 – 4 mg/mL⁻¹ se obtuvo en ambos ensayos una inhibición hasta de un 60% (Villa *et al.*, 2015).

También se ha demostrado la actividad antioxidante del aceite esencial de *S. macrostema* y terpenos mayoritarios (1, 10, 100 y 1000 μ g/mL) mediante la generación de radicales libres in vitro con los métodos DPPH, ABTS y TAC, donde obtuvieron que el aceite esencial a una concentración de 100 μ g/mL presentó una alta actividad antioxidante de 53.11%, 92.12% y 98.25%, respectivamente (Torres-Martínez, 2018).

2.6 Microorganismos oportunistas en la salud humana y en los alimentos

En los alimentos es imprescindible evitar la contaminación de estos por microorganismos ya que pueden dañar la calidad del alimento y en el peor de los casos poner en riesgo la salud del consumidor. Por tal motivo existen diversas medidas de higiene que evitan su contaminación. Existen cepas hospederas en el hombre las cuales por un déficit en el manejo de los alimentos pudieran llegar a contaminarlos. Dentro de las cepas hospederas de transmisión habitual en los alimentos tenemos a *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram-positiva) y *Escherichia coli* (bacteria Gram-negativa). Al hablar de antecedentes de contaminación por *S. aureus* se tiene registro de un estudio realizado en el mercado de la ciudad de Cuenca en Ecuador, afirman la presencia de este microorganismo en carne de: pollo, res y cerdo. En dicho estudio se analizaron diversos puestos, y durante tres semanas de muestreo analizando las UFC, se concluyó la prevalencia de *S. aureus* en un 100% (Ordoñez y Peñafiel, 2022). Otro estudio realizado en un mercado del municipio de Piendamó Cauca en Colombia, uno de cada cinco establecimientos presentaba contaminación por *E. coli* multirresistente (Fernández y Ordóñez.,2021). De igual manera en la venta de carne molida en Perú se encontró presencia de *E. coli* (Moncayo de Freitas, 2019).

Estos microorganismos además de estar presentes en alimentos y ser hospederos en el ser humano han logrado obtener resistencia a los antibióticos en los últimos años debido a su uso inadecuado (Chambers *et al.*, 2009; Pinilla et al, 2020 y Córdova-Zea *et al.*, 2023).

2.6.1 Mecanismos de acción de los metabolitos secundarios contra los microorganismos

En los extractos de plantas están presentes diversos compuestos donde resulta de interés sus metabolitos secundarios ya que algunos de estos logran presentar actividades antimicrobianas y como anteriormente se mencionó podemos encontrar metabolitos secundarios capaces de inhibir a las bacterias.

Las bacterias se clasifican en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas fácilmente diferenciadas por la prueba llamada tinción Gram en honor al médico danés Hans Christian Gram que fue quien la desarrollo donde las primeras se tiñen de color azul – violeta y las segundas al aplicar safranina se decoloran dando color rosa – rojo generalmente. Estas diferencias en su coloración son debidas a la configuración estructural de su pared celular. Las Bacterias Gram positivas presentan una pared celular gruesa constituida de peptidoglucano o mureína y polímeros que la hacen impermeable y por ende resistente a la decoloración teniendo un espesor que va de 20 a 80 nm de espesor. En cambio, las Bacterias Gram negativas presentan una bicapa lipídica llamada membrana externa la cual está ligada por las proteínas de Braun a la capa de peptidoglucano la cual apenas en estas tiene un espesor de 2 a 3 nm (Rodríguez, 2018). En la figura 11 se muestra un esquema de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas (izquierda) y bacterias Gram positivas (derecha) (Nazzaro,2013).

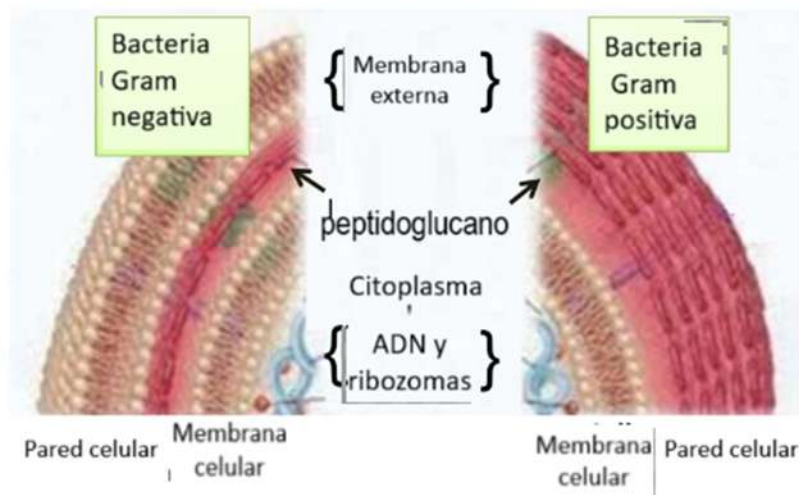


Figura 11. Esquema de las envolturas de las bacterias

Los aceites esenciales generalmente tienen efectos antimicrobianos mayores en las bacterias Gram positivas ya que estas no tienen la doble capa externa de fosfolípidos la cual está unida a la membrana interna por LPS (lipopolisacárido), haciendo de esta peculiaridad la parte más importante que define que un género de bacterias sea más susceptible o no a los extractos de plantas como los aceites esenciales (Nazzaro, 2013).

Las bacterias Gram positivas son afectadas directamente en su pared celular permitiendo que las sustancias hidrofóbicas entren o dañen fácilmente su pared celular llegando al citoplasma. En cambio, las bacterias Gram negativas requieren de sustancias con compuestos hidrofílicos que permitan su ingreso por las porinas (Vaara, 1992). Aunque se diga que la capa externa de las bacterias Gram negativas sea impermeable no lo es del todo ya que ciertas moléculas hidrofóbicas son capaces de penetrarla atravesando lentamente sus porinas (Plesiat, 1962 citado por Nazzaro, 2013).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales y generalmente de los extractos de plantas dependerá de la diversidad de sus compuestos químicos, su concentración y la cantidad de sus compuestos individuales. Cabe resaltar que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo único de acción, sino más bien una variedad de reacciones que involucran a toda la célula por lo que a estas propiedades se les conoce como la “versatilidad de los aceites esenciales” (Burt, 2004 citado por Nazzaro, 2013).

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales puede ser debida por su hidrofobicidad la cual hace incapaz su separación de las paredes celulares bacterianas llegando a dañar su

estructura y si penetran la célula su objetivo secundario sería el citoplasma el cual pueden llegarlo a coagular. Al dañar la pared celular permite la fuga de componentes celulares aumentando su permeabilidad reduciendo la fuerza motriz de protones, reduciendo sus reservas de ATP por la reducción de su síntesis por la acción de la célula para realizar hidrólisis reduciendo así su potencial de membrana (Nazzaro, 2013).

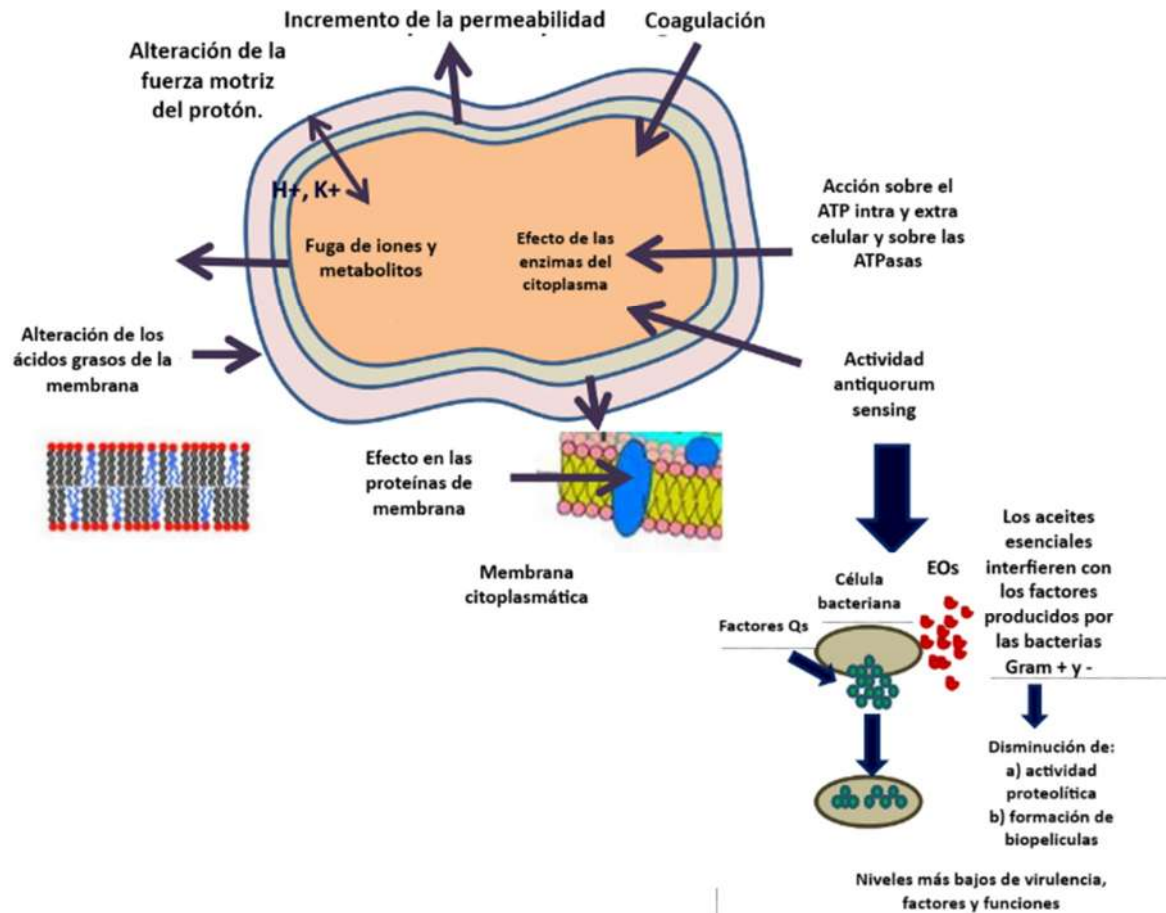


Figura 12. Mecanismos de acción y sitios de acción de los aceites esenciales en las células microbianas (Nazzaro, 2013).

2.6.1.1 Mecanismos de acción de los compuestos vegetales actuando como pro-oxidantes.

Como es bien sabido los compuestos fenólicos son compuestos capaces de fungir como antioxidantes los cuales estabilizan a las moléculas inestables llamadas radicales libres que generalmente son producidas por especies reactivas de oxígeno (ERO). Los extractos de plantas pueden propiciar la activación de enzimas, reducción de radicales α -tocoferilo,

inhibición de oxidasas, mitigación del estrés causado por el óxido nítrico y quelación de iones metálicos (Basavegowda, 2021).

Los antioxidantes de los compuestos vegetales pueden actuar como pro-oxidantes dependiendo de su estructura química, concentración y su desequilibrio de oxido reducción (redox) en la célula. Esto provoca estrés oxidativo por ERO he inhibición de los mecanismos antioxidantes generando la peroxidación lipídica lo que produce una reacción en cadena de estas especies que por consiguiente generará daño a la membrana celular y permitirá la fuga de los componentes celulares. A nivel de proteínas las ERO las modifican he inactivan y en los ácidos nucleicos generan rupturas y lesiones en el ADN, esto conlleva a la generación de proteínas deficientes que generan irregularidades que finalmente llevan a la muerte celular (Bakkali *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2022).

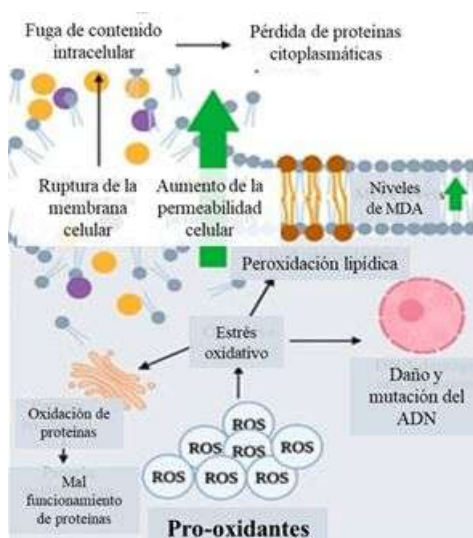


Figura 13. Efecto intracelular de agentes pro-oxidantes (Kong *et al.*, 2022).

2.6.2 Capacidad antimicrobiana de los compuestos antioxidantes

Los polifenoles también son conocidos por sus efectos benéficos para la salud, ya que están presentes en varios alimentos y bebidas como los vinos que presentan una alta concentración de estos y que son provenientes de su conformación o transferidos de las barricas de roble donde llevan el proceso de añejamiento (Marchal, 2013). En un estudio realizado se inhibió por completo el desarrollo de bacterias como *Bacteroides galacturonicus*, *Lactobacillus sp*, *Ruminococcus gauvreauii*, *Enterococcus caccae*, *Bifidobacterium catenulatum* y

Escherichia coli, las cuales son bacterias intestinales de la microbiota. Dicho efecto inhibitorio fue atribuido a flavonoides como la quercetina y la naringenina. (Duda-Chodak, 2012).

En otro estudio reportado, se desarrolló un extracto polifenólico de la corteza de *Quercus crassifolia* el cual fue probado contra las bacterias probióticas *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y como resultado no obtuvieron inhibición significativa, pero al ser probado y comparado con *E. coli* se observó mayor inhibición a la cual llamaron “inhibición selectiva” (Valencia, 2019).

2.6.3 Algunos extractos con actividad antimicrobiana

Entre el 1 y 10 % de las especies de plantas existentes en el mundo tienen aplicaciones medicinales. Se reporta que existen productos de origen botánico con actividad antimicrobiana, tal es el caso de ajo, orégano, mostaza, canela, albahaca, tomillo, pimienta, mejorana, chile, achiote, cebolla, cilantro, té, limón y naranja (Draughon, 2004) (Tabla 3).

Tabla 3. Extractos naturales con actividad antimicrobiana (Ramírez-Rojo, 2018).

Material Vegetal	Método Extracción	Resultado	Referencias
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>)	Combinación de maceración y fluido supercrítico	<i>Escherichia coli</i> , CMI: 0.149 mg/mL, <i>Staphylococcus aureus</i> , CMI 0.376 mg/mL, <i>Bacillus cereus</i> , CMI: 0.151 mg/mL, <i>Salmonella typhimurium</i> , CMI: 0.753 mg/mL	Vieitez <i>et al.</i> , 2018
Mangle (<i>Avicennia marina</i>)	Maceración	<i>Enterococcus faecium</i> CMI: 2 mg/mL, <i>Streptococcus pneumoniae</i> CMI: 4 mg/mL, <i>Klebsiella pneumoniae</i> CMI: 8 mg/mL.	Behbahani <i>et al.</i> , 2018
Vid (<i>Vitis vinifera</i>)	Maceración	<i>Staphylococcus aureus</i> CMI: 0.91 mg EAG/mL, <i>Bacillus cereus</i> CMI: 0.45 mg EAG/mL, <i>Campylobacter jejuni</i> CMI: 0.91 mg EAG/mL, <i>Salmonella infantis</i> CMI 1.36 mg EAG/mL, <i>Escherichia coli</i> CMI: 1.36 mg EAG/mL.	Katalinic <i>et al.</i> , 2013
Acerolo (<i>Crataegus azarolus</i> L.)	Ultrasonido	<i>Staphylococcus aureus</i> , 12.7 mm <i>Streptococcus faecalis</i> , 11.7 mm <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 7.5 mm	Belkhir <i>et al.</i> , 2013
Mezquite (<i>Prosopis cineraria</i>)	Maceración	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Bacillus subtilis</i> . CMI 15 mg/mL	Aziz <i>et al.</i> , 2012
Ingábaú (<i>Eugenia beaurepaireana</i>)	Maceración	<i>Mollicutes arginini</i> , <i>Mollicutes hominis</i> y <i>Ureaplasma urealyticum</i> 1.25 mg/mL	Simões <i>et al.</i> , 2010
Macaranga (<i>Macaranga triloba</i>)	Maceración	<i>Bacillus cereus</i> 1 mg/mL	Simões <i>et al.</i> , 2010
Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i> Linn)	Combinación de maceración y ultrasonido	<i>Salmonella typhimurium</i> . 5 mm	Thongson <i>et al.</i> , 2004

2.7 Actividad antimicrobiana del nurite

Se han probado extractos etanólicos de la planta de nurite contra bacterias como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, obteniendo el 80% del halo de inhibición por el método de Kirby-Bauer, atribuyendo este efecto a terpenos como el limoneno y la pulegona, compuestos responsables de la inhibición (Bello *et al.*, 2006).

Fulgencio, en el año 2013 realizó un extracto de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de la planta del nurite con hexano y por el método de maceración en frío durante 5 días. Posteriormente utilizaron dos métodos para determinar la inhibición o actividad antifúngica del extracto de nurite contra dos hongos patógenos de la fresa: *Botrytis cinera* y *Colletotrichum acutatum*. Para el método uno se realizó un orificio en el medio de cultivo PDA con un sacabocado y se adicionaron 50 µl del preparado con etanol absoluto; para el método 2 se impregnaron sensidiscos con 25 µl del preparado con etanol absoluto con una concentración del extracto de nurite de 1mg/ml.

Como resultados del estudio, en el método se logró inhibir al hongo *Colletotrichum acutatum* con un 18.9% y 5.5% a *Botrytis cinerea*. Sin embargo, en el método dos se inhibió un 6.7% al hongo *Colletotrichum acutatum* y 5.2% al hongo *Botrytis cinerea*.

3. Justificación

El nurite (*Clinopodium macrostemum*) es una planta endémica de México de la cual se han realizado diversas investigaciones para descubrir, validar y fundamentar algunas propiedades de interés como sus beneficios en la salud humana, ya que en la medicina tradicional herbolaria y en la cultura Purépecha ha sido empleada para tratar algunas enfermedades siendo considerada como curativa. Diferentes investigaciones de la planta del nurite, resaltan su capacidad antioxidante, así como su efecto antimicrobiano contra hongos y bacterias, debido a su contenido de metabolitos secundarios, sin embargo, no existe investigación realizada de la planta de nurite del Cerro del Águila ubicado en el municipio de Paracho de Verduzco en el estado de Michoacán, y en este trabajo se estudiará a la especie de esta región. Se considera que el estudio es necesario para conocer sus propiedades y realizar una comparación con las investigaciones de otros estados y municipios de México.

4. Hipótesis

La planta de nurite (*Clinopodium macrostemum*) del Cerro del Águila de Paracho de Verduzco por sus metabolitos secundarios tiene capacidad antioxidante y antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

5. Objetivo general

Realizar análisis químico proximal, perfil fitoquímico y la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos del nurite (*Clinopodium macrostemum*, Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze colectada en Paracho de Verduzco, Michoacán, México.

5.1 Objetivos específicos

- 1.- Realizar el análisis químico proximal de hojas, tallos y la combinación de estos de la planta del nurite.
- 2.- Obtener extractos por maceración etanólica de los tejidos de nurite.
- 3.- Determinar el contenido de fenoles y flavonoides, terpenos totales, así como la capacidad antioxidante.
- 4.- Realizar pruebas de capacidad antimicrobiana de los extractos de nurite contra *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

6. Estrategia experimental

Colecta de material biológico Nurite y confirmación de especie en el Herbario de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Realizar el análisis bromatológico de hojas, hoja/tallo y tallo



Obtención de extractos etanólicos de hojas, hoja/tallo y tallo



Ensayos antioxidantes: DPPH, ABTS, FRAP.
Ensayos de caracterización química: fenoles, flavonoides y terpenos totales.



Ensayos Biológicos: Difusión en placa método Kirby-bauer, Concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (MBC) sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

7. Materiales y métodos

7.1 Materia prima.

El trabajo de investigación se realizó con la planta nurite (*Clinopodium macrostemum*) procedente del estado de Michoacán, México obtenida directamente de Paracho de Verduzco en el cerro del Águila (2816 msm, 19°34'60" N y 102°3'0" W).

7.1.1 Análisis botánico

El nurite se analizó para autenticar género y especie observando en el microscopio sus partes aéreas (hojas, tallos y flores) y se compararon formas y estructuras morfológicas en el Herbario EBUM de la Facultad de Biología de la UMSNH. Se usó la clave dicotómica de la Flora Fanerogámica del Valle de México para la determinación a nivel de familia (Rzedowski y Rzedowski, 2005). Para género se usó la clave de Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013). Para la especie se usó la clave de la Familia Lamiaceae de la Flora de Tehuacán-Cuicatlán (Martínez-Gordillo *et al.*, 2019).

Para poder analizar el nurite y herborizarlo correctamente para tener un ejemplar en el herbario se requiere que la planta estuviera fresca con buena humedad, por ello se le realizó prueba de humedad.

7.1.1.1 Determinación de humedad de la planta fresca

Se le realizó prueba de humedad a la muestra fresca de hojas, hoja/tallo y tallo acorde al método 934.01 AOAC (2000). Se realizó esta metodología por triplicado en la que las cápsulas se pusieron a peso constante calentándolas 1 h a 105 °C, se atemperaron en un desecador y se pesaron 3 g de muestra en cada cápsula previamente a peso constante. Posteriormente, se colocaron las muestras con las cápsulas en la estufa a 105 °C durante 4 h. Luego se colocaron las cápsulas con muestra en el desecador hasta atemperar durante 30 minutos. Se pesaron las cápsulas y se determinó el contenido de humedad de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \left(\frac{P_m - P_s}{M} \right) \times 100$$

Donde:

P_m= Peso de la cápsula y la muestra húmeda en gramos.

P_s= Peso de la cápsula y la muestra seca en gramos.

M= Peso de la muestra húmeda en gramos.

7.1.2 Secado de la planta y separación de tejidos

Para evitar que el material biológico se contaminara por, se secó a la sombra por el método de colgado tradicional durante 15 días a temperatura ambiente, y se separaron hojas y tallos para posteriormente ser almacenaron hasta su posterior utilización. Se realizó prueba del % de materia seca tras el secado de la planta para ello se separaron hojas, hojas/tallo y tallo en fresco de Nurite 3 g c/u y se secó a la sombra durante 15 días. Después se pesó y se calculó el % de materia seca en base húmeda.

7.2 Análisis bromatológico de la planta seca

A la muestra seca se le realizaron las pruebas de humedad, cenizas, grasa, proteínas, fibra y acorde a diferencia se calcularon los carbohidratos.

7.2.1 Determinación de humedad

Se realizó la técnica descrita anteriormente acorde al método 934.01 AOAC (2000).

7.2.2 Determinación del porcentaje de materia seca

Después del secado y cálculo de humedad se determinó el porcentaje de materia seca acorde a la NMX-F-0.83-1986 y NMX- Y-098 SCFI- 2001 utilizando la siguiente fórmula

$$\% \text{ materia seca} = \left(\frac{P_{seco}}{P_{inicial}} \right) \times 100$$

Donde:

P seco= Peso seco tras el secado

P inicial= Peso de la materia prima fresca

7.2.2.1 Determinación de cenizas

Para esta determinación se utilizó el método 923.03 de la AOAC (2000). Este está basado en la incineración hasta llegar a cenizas del material biológico mediante el uso de horno mufla a 525 °C. Las cenizas son el residuo de materia inorgánica presente en la muestra. Para este método se ponen los crisoles a peso constante calentándolos 1 h a 105 °C en una estufa. Posterior a ello se atemperaron en un desecador y se pesan. Se colocan 3 g de muestra en cada crisol por separado y se dejan calentar en una placa calentadora hasta observar la ausencia de desprendimiento de vapores para después sean colocadas las muestras en la mufla a 560 °C durante 3 h. Posterior a ello se atemperan las muestras en un desecador y por diferencia de pesos se calcula el contenido de cenizas realizando los cálculos acordes a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \left(\frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \right) \times 100$$

Donde:

P_2 = Peso del crisol con las cenizas

P_1 = Peso del crisol con la muestra

P_0 = Peso del crisol vacío

7.2.3 Determinación de extracto etéreo

Para la determinación de esta técnica se empleó el equipo Goldfish y se siguieron los pasos acordes al método descrito por Nielsen (2003), NMX-F-0.83-1986 y AOAC (1990) método 920.39C. En esta se emplean solventes orgánicos apolares que realizan una extracción continua ya que este se calienta y volatiliza para posteriormente ser condensado sobre la muestra. Para realizar esta metodología primero se colocaron los vasos del equipo goldfish a peso constante calentándolos 1 h a 105 °C en una estufa. Posteriormente se atemperan en un desecador y se pesan, después se colocan 3 g de muestra en papel filtro, se coloca el solvente hasta tapar la muestra y se deja trabajar por 3 h. Luego se quitan los vasos del equipo con la grasa ya extraída y se colocan en la estufa a 100 °C durante 30 minutos, después se atemperan

en un desecador y se pesan. Por diferencia de pesos se calcula el contenido de grasa realizando los cálculos acordes a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ grasa} = \left(\frac{W_2 - W_0}{W} \right) \times 100$$

Donde:

W_2 = Peso del vaso con grasa

W_0 = Peso del vaso solo

W = Peso de la muestra

7.2.4 Determinación de proteínas

Para la determinación de esta variable se empleó la metodología de la NOM-F-68-S-1980. Se pesaron 2 g de muestra previamente deshidratada en un papel filtro, se colocó el papel filtro con la muestra dentro del matraz de Kjeldahl. Se añadieron al matraz 10.7 g de mezcla catalítica: 10g de sulfato de sodio anhidro y 0.7 g de óxido de mercurio y se adicionó 25 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se coloca el papel filtro con la muestra y se realiza la digestión. Posterior a ello se realiza la destilación donde se recuperan hasta 200 mL de destilado. Al destilado se le adiciona rojo de metilo como indicador y se titula con NaOH al 0.1 N anotando los ml gastados y se aplica la siguiente fórmula para el cálculo de Nitrógeno proteico.

$$\% \text{ N} = \frac{(N_0V_0 - N_aV_a) - (N_1V_1 - NV) * 0.014 * 100}{W}$$

Donde:

N_0 = Normalidad del ácido sulfúrico en la muestra

V_0 = Volumen del ácido sulfúrico usado en la muestra

V_a = Volumen del NaOH gastado en la muestra

N_a = Normalidad del NaOH gastado en la muestra

N_1 = Normalidad del ácido sulfúrico en el blanco

V_1 = Volumen del ácido sulfúrico usado en el blanco

N = Normalidad del NaOH usado en el blanco

V= Volumen del NaOH gastado en el blanco

W= peso de la muestra

Para el cálculo del porcentaje de proteínas se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Proteína} = \%N * F$$

Donde:

%N= Porcentaje de Nitrógeno

F= Factor de conversión

7.2.5 Determinación de fibra

Para esta determinación se utilizó la técnica de Van Soest (1963). La cual dice que a la muestra libre de humedad y grasa se coloca en un vaso Berzelius añadiendo 0.3g de fibra cerámica. Se añaden 200 mL de ácido sulfúrico al 0.255N y se coloca en calentamiento dejándolo hervir. Después se lava la muestra y se añaden 200 mL de NaOH al 0.313N se coloca el vaso de nuevo en calentamiento hasta hervir. Luego se coloca la muestra en crisol Gooch previamente tarado y se colocan en mufla durante 30 minutos y posterior a ello se lleva a peso constante y por diferencia de pesos se calcula la fibra cruda acorde a la siguiente ecuación:

$$\% FC = \frac{(\text{Peso crisol con muestra calcinada} - \text{peso crisol solo}) * 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

7.2.6 Cálculo de carbohidratos

Esta se calculó al restarle al porcentaje de materia seca de cada tejido de nuriite cada determinación (extracto etéreo, cenizas, proteínas y fibra cruda). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$ELN = \%Ms - (\%ET + \%C + \%P + \%Fc)$$

Donde:

ELN = Extracto libre de nitrógeno

%Ms = Porcentaje de materia seca

%ET = Porcentaje de extracto etéreo

%C = Porcentaje de cenizas

%P = Porcentaje de proteínas

%Fc = Porcentaje de fibra cruda

7.3 Obtención de los extractos y cálculo del rendimiento.

De la planta Nurite se pulverizaron hojas, tallos y la combinación de estos cada uno por separado para posteriormente macerarlos en frío (4-10°C) en alcohol del 96%, por cada 40 g de muestra se adicionó 400 mL de solvente y se dejó macerar durante 15 días en frascos ámbar herméticamente cerrados. Posterior al tiempo de reposo los macerados fueron filtrado en papel filtro (Whatman® No. 1) y con el fin de obtener la mayor cantidad de extracto el residuo de la planta se volvió a macerar con 200 mL con el mismo solvente y se dejó macerar por otros 10 días el cual fue nuevamente filtrado; Después se llevaron a sequedad empleando un rotavapor (Vante RE-100 pro) haciendo uso de la presión reducida, con rotación en el nivel 7 del equipo y temperatura de 40°C esto con el fin de eliminar el solvente. Al tener el extracto seco en el matraz se calculó el rendimiento utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \left(\frac{M - M_0}{W} \right) \times 100$$

Donde:

M= Matraz con extracto seco

M₀ = Matraz a peso constante

W= Peso inicial de la hierba o tejido seco que se macero

Por último, se resuspendieron los extractos secos en etanol hasta disolver. Por cada g de sólido se adicionó 1 mL de etanol [96%], para así obtener extractos en concentración de 1g/mL de extracto de hoja de nurite (EHN), extracto de hoja/tallo de nurite (EHTN) y extracto de tallo de nurite (ETN).

7.4 Cuantificación de fitoquímicos y de la capacidad antioxidante

7.4.1 Preparación de soluciones vegetales

De cada extracto por separado de hojas, tallos y tallo/hoja con concentración de 1g/mL se tomaron 400 μ L y se disolvieron en 600 μ L de etanol al 96% para obtener una concentración de 400 mg/mL. De estas soluciones se tomaron alícuotas de 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 300 μ L y 400 μ L y se aforaron a 1 mL con el mismo solvente y así preparar soluciones en concentración de: 20 mg/mL, 40 mg/mL, 80 mg/mL, 120 mg/mL y 160 mg/mL. Se tomaron alícuotas de 1 μ L de cada solución seriada para las determinaciones de concentraciones de fenoles totales, flavonoides totales, terpenos y capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP). Para los antioxidantes al utilizar diversas concentraciones fue posible calcular la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) que es cuando el antioxidante logra estabilizar en un 50% al agente oxidante.

7.4.2 Determinación del contenido de compuestos fenólicos

Se tomó 1 μ L de las muestras a analizar y por separado se les adicionó 99 μ L agua destilada, se le añadió 500 μ L del reactivo de Folin.Ciocalteu (1:9 Fc-H₂O), 500 μ L de una solución acuosa de Na₂CO₃ al 7% y 2.5 mL de agua destilada, se mezcló vigorosamente, y se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente en completa oscuridad, y después se tomaron lecturas a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Genesys 10 UV). Se usó ácido gálico como estándar (0.1 a 1 mg/mL) (Pripdeevech *et al.*, 2010).

7.4.3 Determinación del contenido de flavonoides

Se tomó 1 μ L de las muestras a analizar y se les adicionaron 499 μ L de metanol para posteriormente a cada uno agregar: 1500 μ L de metanol, 100 μ L de AlCl₃ al 10% y 100 μ L de acetato de potasio (1M) y 2800 μ L de agua destilada, se agitó la mezcla y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en completa oscuridad, después se determinó la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Genesys 10UV). Se utilizó Quercetina como estándar (0.03 a 0.5 mg/mL) (Chang *et al.*, 2002).

7.4.4 Determinación del contenido de terpenos

Se agrego 1 µL de extracto con 99 µL de etanol, posteriormente 150 µL de la solución de vanillina/ ácido acético glacial (5% w/v), y 20 µL de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se calentó a 60°C durante 45 min. Después se enfriaron en baño frío y se les adicionaron 2.25 mL de ácido acético glacial y se tomó lectura en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Genesys 10UV) a 548 nm. Se utilizó como blanco metanol y como estándar limoneno (1 a 6 mg/mL) (Chang y San Lin.,2012).

7.4.5 Capacidad antioxidante DPPH

Se siguió la metodología de Karamác *et al.* (2005). Se preparó el reactivo DPPH al 1 mM en metanol. La reacción se realizó adicionando 1 µL de extracto y 99 µL de metanol, después se añadieron 2 mL de la solución DPPH (0.25 mL DPPH y 1.75 mL metanol). Posteriormente la mezcla se incubó 20 minutos tomando lectura a 517 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Genesys 10UV). Se utilizó Trolox como estándar (25 a 1000 µM/mL). Para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{A - A1}{A} \right) \times 100$$

Donde:

A= absorbancia del control inicial

A1= absorbancia de la muestra

La actividad del extracto para atrapar a los radicales libre se expresó como IC₅₀ la cual es la concentración del extracto requerido para inhibir el radical DPPH al 50%.

7.4.6 Capacidad antioxidante ABTS

Se siguió la metodología de Arnao *et al.* (2001). Se preparó una solución de trabajo mezclando: ABTS (reactivo ready to use 7.4mM) y persulfato de potasio (2.4 mM) en cantidades iguales, la mezcla se dejó reaccionar durante 3 h a temperatura ambiente en absoluta obscuridad y con agitación. Después, la solución se diluyó tomando 1mL de la solución de trabajo de ABTS con 60mL de metanol y se tomaron lecturas en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Genesys 10UV) esperando obtener una absorbancia de

0.8 a 0.9 unidades a 734 nm. Se tomó 1 µL de extracto y se aforó a 50 µL con metanol y se adicionaron 950 µL de la solución ABTS, la mezcla se dejó reaccionar durante 7 min en oscuridad y se tomaron lecturas cada minuto a 734nm. Se utilizó Trolox como estándar (25 a 400 µM/mL). Para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{A - A1}{A} \right) \times 100$$

Donde:

A= absorbancia del control inicial

A1= absorbancia de la muestra

La actividad del extracto para atrapar a los radicales libre se expresó como IC₅₀ la cual es la concentración del extracto requerido para inhibir el radical ABTS al 50%.

7.4.7 Capacidad antioxidante FRAP

Se siguió la metodología de Thaipong *et al.* (2006). La solución FRAP está compuesta de soluciones [2,4,6- Tris(2-piridil)-s-triazina, TPTZ a 10 mM], (FeCl₃ a 20mM) y (acetato de sodio a 300 mM con un pH de 3.6) y se preparó en relación 1:1:10. Se tomó 1 µL de extracto y se adicionaron 99 µL de agua destilada. Posteriormente, se adicionaron 1.5mL de la solución FRAP y se dejó reposar 20 minutos en completa oscuridad para llevarse a cabo la reacción y tomar lectura a 593 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Genesys 10UV). Se utilizó Trolox como estándar (25 a 500 µM/mL). Para la IC₅₀ se reportó el valor de la concentración que se obtuvo al obtener el 0.5 de absorbancia.

7.5 Evaluación de las propiedades inhibitorias de los extractos de Nurite contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

7.5.1 Adecuaciones de las cepas y extractos para los ensayos microbiológicos

7.5.1.1 Cepas microbiológicas

- La cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada para este estudio fue proporcionada por la Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Uruapan, Mich.
- La cepa de *Escherichia Coli* fue proporcionada por el laboratorio de Fitobioquímica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich.

7.5.1.2 Preparación de los extractos

Los extractos utilizados fueron elaborados de igual manera con 40 g de tejido para cada tratamiento y macerados durante 15 días con 400 mL de etanol al 96%. Posterior a ello se filtraron con papel filtro Whatman No.1. El residuo de los tejidos se volvió a macerar con 200 mL más de solvente durante 10 días para obtener el mayor rendimiento posible y después se volvió a filtrar. Los extractos fueron resuspendidos a 450 mg/mL con una solución de dimetil sulfóxido al 50% utilizando como diluyente agua destilada.

7.5.2 Determinación de la sensibilidad bacteriana por el método Kirby-Bauer

A continuación, se describe el método Kirby-Bauer para el ensayo de sensibilidad bacteriana de las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

7.5.2.1 Preparación del inóculo bacteriano

En agar nutritivo se activaron las cepas (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) mediante el método de estriación escocés y se incubaron a 37 °C por 24 h, en posición invertida en la incubadora. Para la preparación del inóculo se tomaron cinco colonias bien definidas con un hisopo estéril y se inocularon en 5 ml de caldo nutritivo, incubándose a 37 °C por 24 h para observar una turbidez ligeramente visible. Se confirmaron las bacterias realizando tinción

Gram de rutina observando morfologías en el microscopio. Se estandarizó la densidad del inóculo mediante el espectrofotómetro a 625 nm comparando la turbidez con el estándar del tubo número 5 de la escala de McFarland (0.08-0.1 ABS), dando como resultado una suspensión final de $1.2 - 1.5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (NCCLS,2012).

7.5.2.2 Preparación de los discos de papel filtro (sensidiscos)

A partir de las soluciones madre de 100 mg/mL de cada tejido (hojas, tallo/hojas y tallo) se tomaron alícuotas de 10 uL para impregnar cada disco hasta obtener las concentraciones de 2, 4, 6 y 8 mg/disco. Entre cada adición de la alícuota (10 uL) para llegar a la concentración en los discos se dejaba secar el extracto para evitar que se saliera del disco.

7.5.2.3 Cultivo de los microorganismos (difusión en Agar)

En cajas Petri estériles con 20 mL de agar nutritivo se inocularon individualmente las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* estandarizados al 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC) y con un isopo estéril se distribuyeron los inóculos por toda la caja de Petri rotándola a 60° tres veces y dejando secar durante 10 min antes de colocar los discos.

7.5.2.4 Montaje de la técnica (Kirby – bower)

Los discos impregnados de los extractos de Nurite se ubicaron en la placa de agar con una pinza anatómica estéril a 15 mm del borde de la placa, presionando suavemente sobre el agar para permitir su adherencia. Los discos fueron ubicados como se aprecia en la figura 11.

7.5.2.5 Controles del experimento

Se colocaron controles positivos con antibiótico en una caja ampicilina y en otra: gentamicina, estreptomycin todos a la concentración de 10 ug/disco dejándolos secar en la campana a flujo constante de aire para posteriormente colocarlo en las cajas con el microorganismo.

Se utilizó como control negativo el solvente con el que fueron resuspendidos los extractos conformados de DMSO: Agua (1:1) el cual se adicionó de 10 uL en 10 uL en el disco dejando secar en cada dosificación hasta haber agregado 100 uL en el disco (NCCLS,2012).

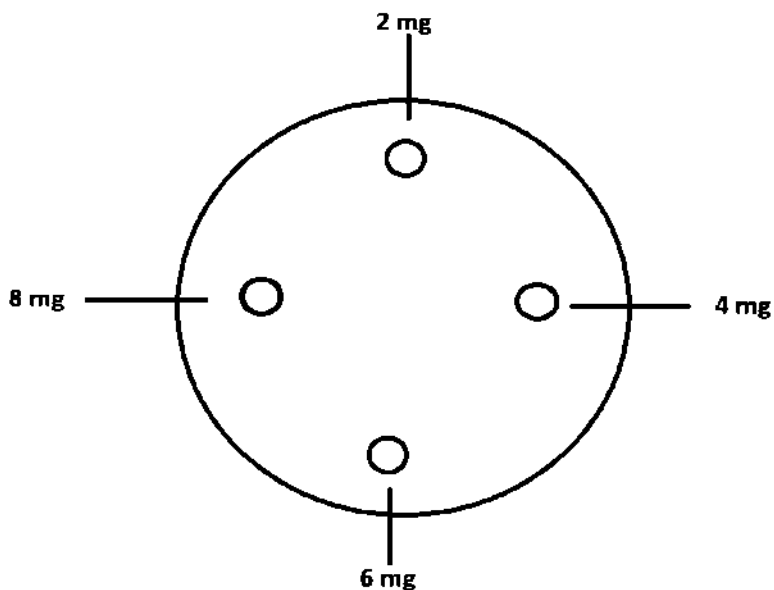


Figura 14. Distribución de discos impregnados con diversas concentraciones de *Clinopodium macrostemum*.

Para presentar los resultados acordes a porcentaje de inhibición se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{Promedio diámetros de halo de inhibición del extracto}}{\text{Promedio diámetros de halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

7.5.3 Técnica de macrodilución en caldo para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Acorde a los resultados obtenidos en la técnica de difusión en disco se determinó que los 3 extractos (EHN, EHTN y ETN) mostraron inhibición bacteriana para ser probados en la técnica de macrodilución en caldo.

7.5.3.1 Preparación del inóculo para la prueba de macrodilución en caldo

Se realizó la misma adecuación de los inóculos como en la prueba de difusión en disco solo que posterior a ello se realizó una dilución para obtener 1.5×10^6 UFC/mL la cual sería nuestra solución de trabajo para los análisis microbiológicos (Klančnik *et al.*, 2010; Navarrete *et al.*, 2020).

7.5.3.2 Descripción de la técnica de la sensibilidad bacteriana por el método de macrodilución en caldo

Se trabajó con el inóculo preparado a 1.5×10^6 UFC/mL para esta prueba.

A partir de las soluciones vegetales de cada extracto a concentración de 450 mg/ml en DMSO al 50%, se agregó 300 μ L de la solución stock del extracto vegetal al tubo N°1, el cual correspondía a la concentración de 450 mg/mL. Luego, a partir del tubo N°2 se prepararon tubos que contenían 150 μ L de agar nutritivo, y se les agregó 150 μ L de la solución madre del extracto. A partir de este tubo se realizaron diluciones dobles seriadas hasta el tubo N°9, mezclando cada dilución con vórtex. Evaluando de esta manera concentraciones de 225 mg/mL, 112 mg/mL, 56 mg/mL, 28 mg/mL, 14 mg/mL, 7 mg/mL, 3.5 mg/mL, 1.75 mg/mL. Luego se adicionaron 150 μ L del inóculo bacteriano ajustado (1.5×10^6 UFC/mL) para obtener un volumen final de 300 μ L por tubo. Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 h. Se utilizó un control de crecimiento el cual se elaboró adicionando 150 μ L de una solución DMSO:agua al 50% más 150 μ L de caldo nutritivo, se mezcló en vortex y de esta se tomó la mitad y se transfirió a un tubo con 150 μ L del inóculo bacteriano ajustado. También se utilizó un control negativo como control de esterilidad el cual contenía 150 μ L de caldo nutritivo y 150 μ L de la solución de DMSO al 50%. Como control positivo se utilizó gentamicina y se preparó de la siguiente manera: a partir de una solución de 150 μ L en concentración de 20 μ g del antibiótico se le adicionó 150 μ L de caldo nutritivo, se mezcló en vortex y de esta solución se tomaron 150 μ L para ser adicionados a un tubo con 150 μ L del inóculo bacteriano ajustado (1.5×10^6 UFC/mL) para así probar la concentración del antibiótico a 10 μ g (Klančnik *et al.*, 2010; Navarrete, 2020).

Finalmente se inocularon 5 μ L de cada disolución en cajas Petri con 20 mL de agar nutritivo para determinar hasta que concentración de extracto no se observa desarrollo bacteriano y así determinar la concentración mínima bactericida (CBM). Se sembraron placas sin el inóculo

a la misma concentración de los extractos vegetales como control negativo el cual sirvió para observar la ausencia o la presencia de desarrollo bacteriano (Navarrete, 2020; Tran y Green, 2019).

7.6 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico JMP versión 13 pro y para las tablas el programa GraphPad Prism 8. Cada determinación se realizó por triplicado ($n=3$) y sus medias fueron sometidas al análisis ANOVA y se hizo una prueba post hoc de Tukey. El nivel de significancia fue de $\alpha=0,05$ para establecer las diferencias entre las medias de cada tratamiento.

8. Resultados y Discusión

8.1 Pruebas y adecuación de la materia prima

8.1.1 Análisis botánico

La planta llevada al Herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo fue Certificada con la determinación taxonómica de un ejemplar botánico el cual fue herborizado y estaba constituido por hojas y flores. El ejemplar cuenta con las características necesarias para formar parte de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM (anexo 1).

8.1.1.1 Determinación de humedad de la planta fresca

En la tabla 4 se muestra el porcentaje de humedad de la planta fresca donde el contenido mayor fue en el tallo con un 93.5 ± 0.09 % y el menor fue en el tejido de hoja con 88.53 ± 0.63 %. Se aprecia que existe mayor humedad en el tallo y en hoja/tallo comparado con hoja debido posiblemente al sistema vascular que presenta la planta ya que el tallo almacena agua para el transporte de nutrientes. En ambientes no controlados los gradientes de aridez (falta de humedad en aire o suelo) pueden variar el contenido de agua en la planta, así como los intercambios de los isótopos de oxígeno que se dan en floema, cambium y xilema dando con ello problemas en la acumulación de agua en las hojas almacenándola en la celulosa del tallo (Steven *et al.*, 2017).

El porcentaje de humedad reportado para plantas aromáticas es del 60 al 85 % (Hillbay *et al.*, 2016). El valor superior de este intervalo comparado con nuestro tejido de hoja es casi similar siendo nuestro valor mayor por 3.53%. En los tejidos hoja/tallo y tallo se obtuvieron valores mayores al 90% de humedad.

Al comparar el contenido de humedad de las hojas de nurite con las hojas de 4 plantas (*Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium*, y *Teucrium polium*) de la misma familia (lamiácea) que presentaron: 76.61 ± 1.75 , 70.55 ± 2.03 , 81.73 ± 1.54 y 58.59 ± 0.86 % respectivamente (Khaled-Khodja *et al.*, 2014), se aprecia que el contenido de humedad de las hojas de la planta de estudio fue mayor, esto posiblemente al periodo de colecta de estas donde el estrés hídrico puede ser un factor importante, cabe resaltar que cuando las células vegetales se encuentran en crecimiento se permite la relajación de la pared celular y con ello

mayor absorción de agua durante la etapa de crecimiento caso contrario cuando la planta ya es madura y no se encuentra en crecimiento la relajación de la pared celular no se produce (Taiz y Zeiger, 2006).

Tabla 4. Porcentaje de humedad de los tejidos frescos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	% de humedad
Hoja	88.53 ± 0.63 ^c
Hoja/Tallo	91.01 ± 0.05 ^b
Tallo	93.5 ± 0.09 ^a

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en una columna indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

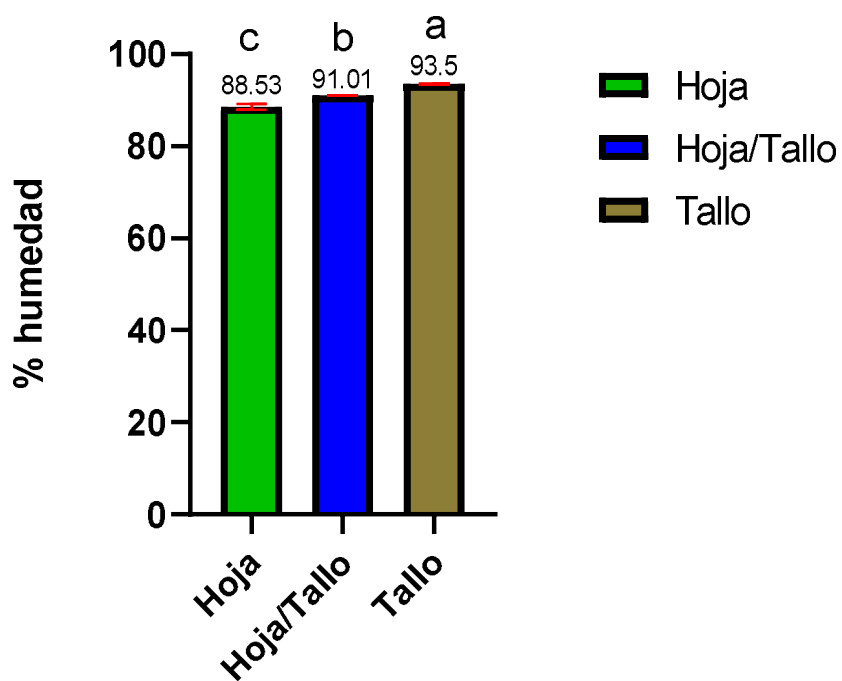


Figura 15. Porcentaje de humedad de los tejidos frescos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.2 Secado de la planta y separación de tejidos

Se calculó el % de materia seca de la planta del nurite separando en fresco para esta prueba las hojas, hoja/tallo y tallo dejándose secar a la sombra acorde a la metodología planteada. Los resultados se presentan acorde a la ecuación planteada en la metodología en base húmeda debido al porcentaje del peso total del producto donde incluye el agua.

En la Tabla 5 y Figura 16, se muestra el % de materia seca la cual fue mayor en la hoja con un 12.59 ± 0.69 % seguido de hoja/tallo con un 9.87 ± 0.05 % y el menor fue el tallo con un 7.14 ± 0.10 %. Se cree que es mayor hoja/tallo que tallo, ya que, al tener tejido de hoja, este presentó mayor % a diferencia del tallo. Cabe mencionar que, al presentar estos resultados en base húmeda, pudieran algunos tejidos retener más agua después del secado.

Tabla 5. Porcentaje de materia seca de los tejidos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	Materia seca (%)
Hoja	12.59 ± 0.69^a
Hoja/Tallo	9.87 ± 0.05^b
Tallo	7.14 ± 0.10^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en las columnas indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

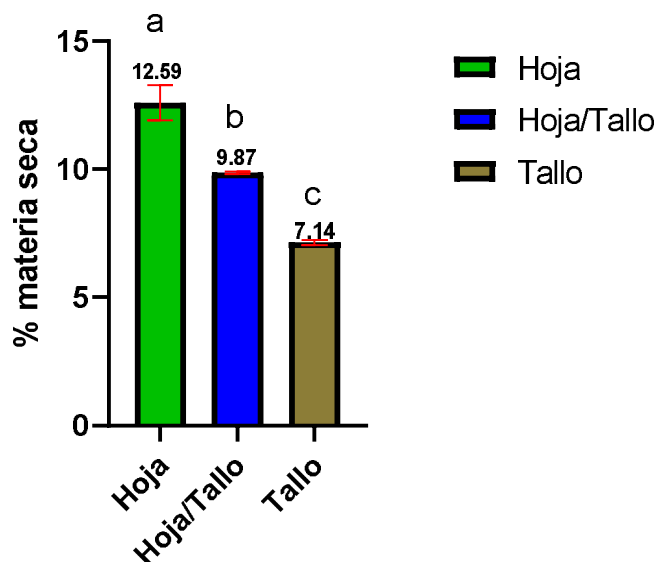


Figura 16. Porcentaje de materia seca de los tejidos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3 Análisis bromatológico de la planta seca

Una vez seca la planta por el método de colgado, se calculó el porcentaje de materia seca en base fresca. También se realizó el análisis bromatológico a la materia seca, la cual posteriormente se utilizó para la obtención de los extractos y su evaluación antioxidante y antimicrobiana.

8.1.3.1 Determinación de humedad

Es importante conocer la humedad en este caso del nurite tras ser secado ya que el control de esta variable evita la proliferación de microorganismos no deseados en el almacenaje para su utilización posterior, así como también, ayuda a mejorar y controlar los procesos de secado (García, 2024). Al contemplar la humedad se puede reportar en dos bases húmeda y seca. Dichas bases, aunque expresan la cantidad de humedad de un material sólido presentan valores numéricos diferentes por lo que es importante indicar con que base se está trabajando para evitar errores de interpretación y obtener correctamente los rendimientos sin interferencia de humedad (Martines y Lira, 2010).

En la Tabla 6 y Figura 17 se muestra el porcentaje de humedad de los tejidos secos estudiados en base seca, donde se aprecia que la muestra de hoja presenta la mayor cantidad de humedad con un $8.9\% \pm 0.07$ y la combinación de hoja/tallo con $8.16\% \pm 0.13$ como la menor. En un estudio utilizando alcachofa (*Cynaria scolymus L*) después del secado se obtuvo un porcentaje de humedad de 9.98% siendo este valor mayor al de los tejidos de Nurite (Hillbay *et al.*, 2016). En un estudio de árboles jóvenes de *Cryptomeria japonica* se mencionó que las hojas al tener la capacidad de realizar la fotosíntesis y la transpiración necesitan mayor retención de agua por lo que almacenan el 51% del total en comparación a los tallos que solo almacenan el 29% y lo demás se distribuye en el tejido elástico de los árboles (Himeno *et al.*, 2017). Por esta razón después del secado, las hojas pueden presentar mayor contenido de humedad que el tallo y hoja/tallo. Cabe resaltar que también por los factores estructurales de las células foliares (hojas) tienen más espacios intercelulares al ser más blandas y elásticas retienen más agua en comparación a las células madre (tallos) que son más fibrosas y menos elásticas por lo que retienen menos agua (Escasos *et al.*, 2010).

Tabla 6. Porcentaje de humedad de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	% de humedad
Hoja	8.90 ± 0.07^a
Hoja/Tallo	8.16 ± 0.13^c
Tallo	8.47 ± 0.07^b

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en la columna, indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

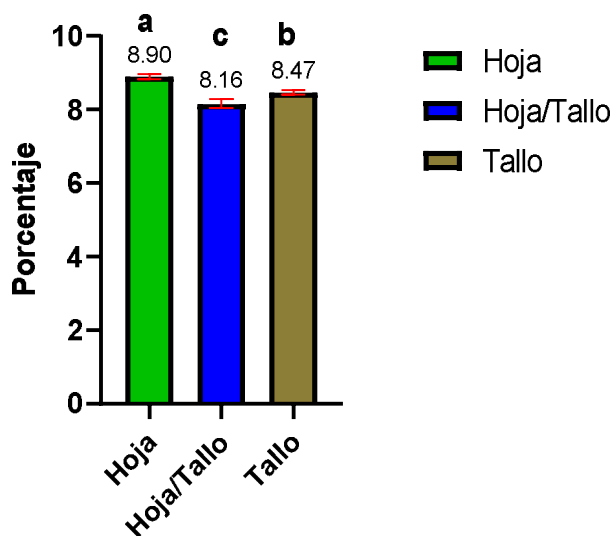


Figura 17. Porcentaje de humedad de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3.2 Determinación del % de materia seca

Para obtener el análisis bromatológico en base seca es necesario calcular el porcentaje de materia seca tras el secado ya que todos los estudios bromatológicos se realizaron con la planta en estas condiciones. Se aprecia en la Tabla 7 y Figura 18 que el porcentaje de materia seca en hoja/tallo ($91.84 \pm 0.13\%$) fue mayor que los otros tejidos debido a que su porcentaje de humedad fue menor. En hoja ($91.1 \pm 0.07\%$) fue menor que los demás tratamientos debido a que en la prueba de humedad fue el que presentó mayor porcentaje.

Tabla 7. Porcentaje de materia seca de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	Materia seca (%)
Hoja	91.1 ± 0.07^c
Hoja/Tallo	91.84 ± 0.13^a
Tallo	91.53 ± 0.07^b

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

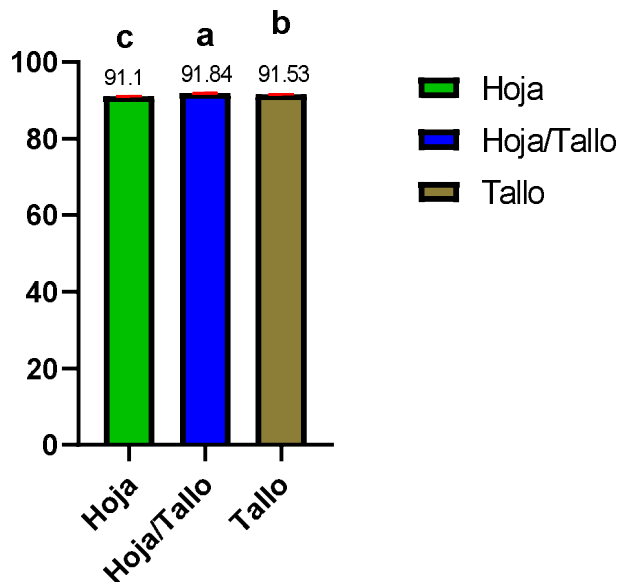


Figura 18. Porcentaje de materia seca de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3.3 Determinación de cenizas

En la Tabla 8 y en la Figura 19 se muestra el porcentaje cenizas de los tejidos secos de Nurite donde la hoja presentó el mayor porcentaje con un 11.50 ± 0.089 % y el menor porcentaje fue respecto al tallo con un 4.98 ± 0.26 %. Fue mayor la mezcla de hoja/tallo en comparación al tallo debido a que la mezcla al contener el 50% hoja en su composición brindó mayor contenido de cenizas que el tallo por sí solo. En las hojas se produce mayormente la fotosíntesis y absorción de nutrientes ya que están mayormente expuestas al sol dando con ello mayor síntesis de compuestos y mayor almacenamiento de estos en comparación al tallo (Ifeanacho *et al.*, 2017). Por dicha actividad que existe en las hojas es probable que la concentración de minerales sea mayor. Además, en el resultado de humedad se presentó un contenido mayor de agua en las hojas en comparación a los otros tejidos por lo que pudiera contener minerales del agua retenida en el tejido. En un estudio donde se emplearon hojas secas de *Origanum Vulgare* la cual es de la familia de las *Lamiáceas* se obtuvo un % de

ceniza de 8.90 ± 0.60 el cual fue menor que las hojas de Nurite, pero fue mayor que la mezcla y el tallo (Rivas *et al.*, 2017).

Acorde a las especificaciones farmacognósticas para *Menta cordifolia* mencionan que el contenido de cenizas en hojas debe de ser de máximo 9.41% y en tallos de 7.04 % para cumplir los estándares de calidad establecidos (Chamnanthongpiwan, 2020). Con esto se infiere que la cantidad de cenizas es generalmente mayor en las hojas que en los tallos para *M. cordifolia* la cual es de la familia de las *lamiáceas* al igual que el Nurite por lo que en nuestros resultados se observó dicha tendencia.

Tabla 8. Porcentaje de cenizas de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	Cenizas (%)
Hoja	11.5 ± 0.089^a
Hoja/Tallo	8.48 ± 0.69^b
Tallo	4.98 ± 0.26^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

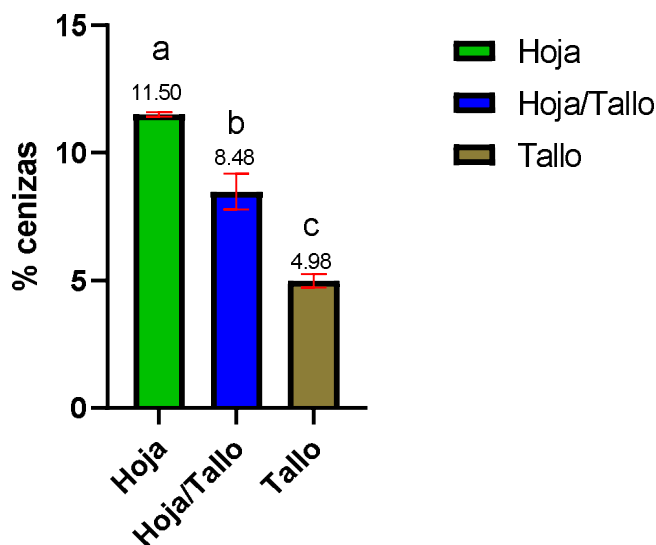


Figura 19. Porcentaje de ceniza de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3.4 Determinación de extracto etéreo

En la Tabla 9 y en la Figura 20 se muestra el porcentaje de grasa de los tejidos secos de Nurite donde el mayor contenido fue en la hoja con un 1.11 ± 0.05 % y el menor fue en tallo con un 0.59 ± 0.05 %. Fue mayor la mezcla de hoja/tallo en comparación al tallo debido a que la mezcla al contener el 50% hoja en su composición brindó mayor contenido de grasa que el tallo por sí solo. En un estudio donde se emplearon hojas secas de *Origanum Vulgare* la cual es de la familia de las *Lamiáceas* se obtuvo un % de grasa de 3.10 ± 0.57 el cual fue mayor que los tejidos de Nurite (Rivas *et al.*, 2017).

Se sabe que la presencia de cloroplastos es mayor en las hojas que en los tallos por lo que se cree que por la presencia mayoritaria de este orgánulo en las hojas pudiera aumentar el contenido de ácidos grasos ya que este orgánulo interviene en la biosíntesis lipídica y los almacena (Crombie, 1958).

Tabla 9. Porcentaje de grasa de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	Grasa (%)
Hoja	1.11 ± 0.05 ^a
Hoja/Tallo	0.79 ± 0.1 ^b
Tallo	0.59 ± 0.05 ^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

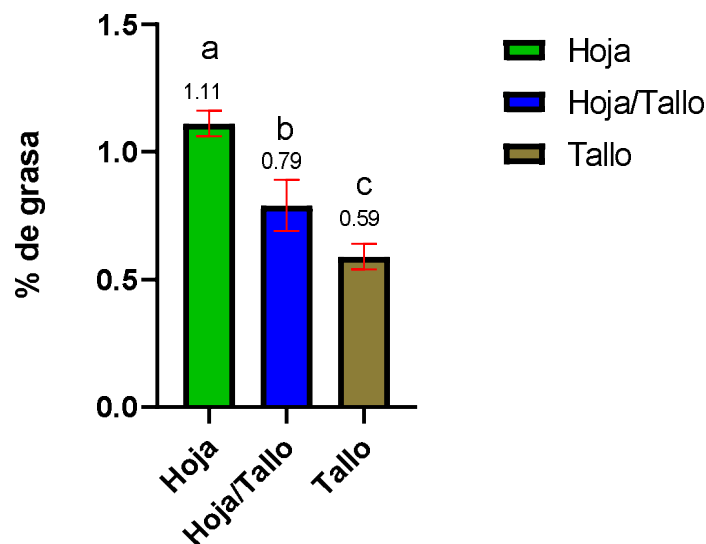


Figura 20. Porcentaje de grasa de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3.5 Determinación de Proteínas

En la Tabla 10 y Figura 21 se observan los resultados del análisis de proteína de la planta de nurite en donde se aprecia que la hoja fue la que tuvo un porcentaje mayor (12.41 ± 0.60 %) y el tallo un porcentaje menor (5.76 ± 0.32 %). En Hoja/Tallo (8.79 ± 0.027 %) fue mayor el porcentaje respecto al tallo debido a que presenta el 50% de hoja en su composición por lo que brinda mayor contenido de proteínas que el tallo por sí solo. En un estudio donde se emplearon hojas secas de *Origanum Vulgare* la cual es de la familia de las *Lamiáceas* se obtuvo un % de proteínas de 9.09 ± 0.40 el cual fue menor que las hojas de nurite, pero mayor que Hoja/Tallo y Tallo (Rivas *et al.*, 2017).

Solati *et al.* (2018) menciona que el sitio primario de producción de proteínas se encuentra en las hojas ya que tienen funciones fisiológicas diversas como lo es la fotosíntesis y es sabido que tienen la capacidad de acumular nutrientes por lo que se puede obtener un mayor contenido de proteína que en los tallos. El método de extracción y la senescencia de la planta afectan los contenidos de proteína especialmente en los tallos (Popović *et al.*, 2001).

Tabla 10. Porcentaje de proteínas de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	Proteínas (%)
Hoja	12.41 ± 0.60 ^a
Hoja/Tallo	8.79 ± 0.027 ^b
Tallo	5.76 ± 0.32 ^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

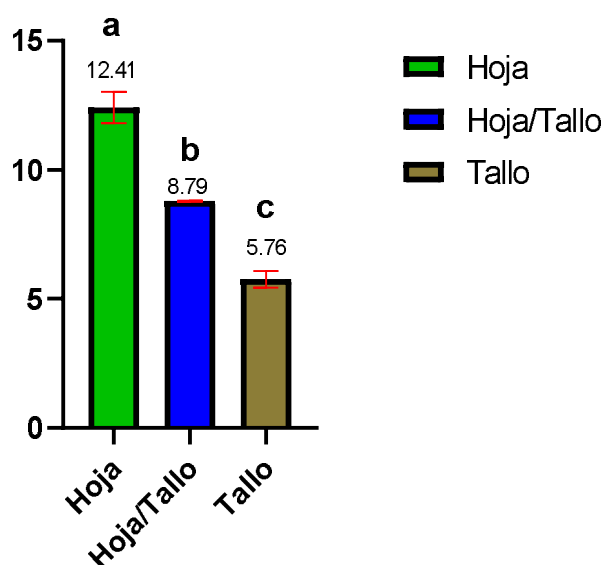


Figura 21. Porcentaje de proteínas de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3.6 Determinación de Fibra

En la Tabla 11 y Figura 22 se observan los resultados del análisis de fibra de la planta de nurite en donde se aprecia que el tallo tuvo un porcentaje mayor (37.80 ± 0.022 %) y Hoja/Tallo un porcentaje menor (26.43 ± 0.0054 %). En Hoja (27.19 ± 0.07 %) fue mayor el porcentaje respecto a Hoja/Tallo y este último fue menor a Tallo ya que el 50% de este es de hoja en su composición por lo que generó un contenido menor de fibra que el tallo por sí

solo. En un estudio donde se emplearon hojas secas de *Origanum Vulgare* la cual es de la familia de las *Lamiáceas* se obtuvo un % de fibra de 8.01 ± 0.08 el cual fue menor que los tejidos de nurite (Rivas *et al.*, 2017).

Generalmente el contenido de fibra es mayor en los tallos que en las hojas por lo que es mayormente factible la extracción de fibra de tallo que de hoja para la producción de biocombustibles ya que presentan mayor contenido de azúcares fermentables. El contenido de proteínas en las hojas pudiera afectar la producción de los hidrocarburos a nivel industrial (Solati *et al.*, 2018). La celulosa está estrechamente relacionada con el contenido de fibra de las plantas por lo que los tallos generalmente presentan mayor contenido de celulosa que las hojas por su configuración estructural esto se ve reflejado en los tallos de plátano que contienen aproximadamente 50% de celulosa en comparación con las fibras de las hojas que solo tienen el 26% (Reddy y Yang, 2015).

Tabla 11. Porcentaje de fibra de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

Tejido	Fibra (%)
Hoja	27.19 ± 0.07^b
Hoja/Tallo	26.43 ± 0.0054^c
Tallo	37.80 ± 0.022^a

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

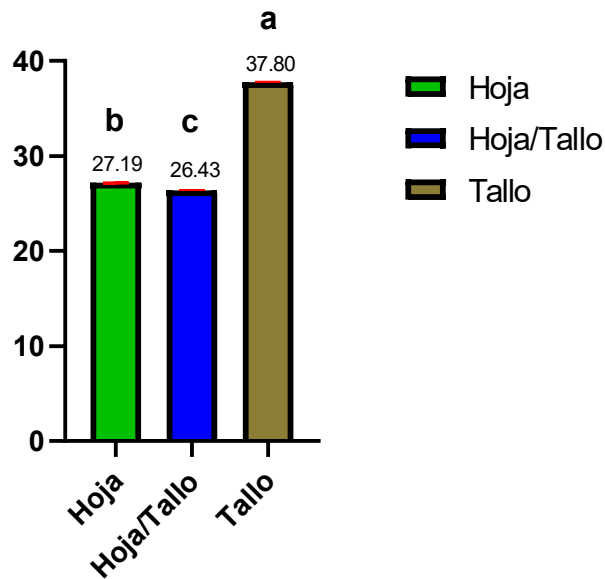


Figura 22. Porcentaje de fibra de los tejidos secos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.1.3.7 Cálculo de carbohidratos.

En la tabla 12 y figura 23 se observa el resultado del cálculo de carbohidratos donde el mayor porcentaje fue respecto a Hoja/Tallo (47.35 ± 0.90) y el menor fue el de hoja (38.89 ± 0.60). Este último se debe a que existía una cantidad mayor de proteínas y su materia seca fue menor debido a que tenía una cantidad mayor de humedad.

En algunos casos los tallos pueden llegar a presentar mayor contenido de carbohidratos que las hojas esto es debido a que en condiciones de sequía o falta de agua la planta debe de almacenar carbohidratos no estructurales (CNE) para su supervivencia por lo que la planta los almacena en su tallo. Las plantas cicadas pueden contener en sus tallos hasta un 79% de CNE el cual es significativo para la supervivencia de la planta y comparado este porcentaje es un valor superior al del nurite (Marler, 2023).

En un estudio donde se emplearon hojas secas de *Origanum Vulgare* la cual es de la familia de las *Lamiáceas* se obtuvo un % de carbohidratos de 59 ± 1.3 el cual fue mayor que los tejidos de nurite (Rivas *et al.*, 2017).

Tabla 12. Caracterización fisicoquímica (% en base seca) de los tejidos de *Clinopodium macrostemum* provenientes de Paracho de Verduzco, Michoacán, México.

Análisis (%)	Tejidos		
	Hoja	Hoja /Tallo	Tallo
Humedad	8.90 ± 0.07 ^a	8.16 ± 0.13 ^c	8.47 ± 0.07 ^b
Materia seca	91.1 ± 0.07 ^c	91.84 ± 0.13 ^a	91.53 ± 0.07 ^b
Cenizas	11.5 ± 0.089 ^a	8.48 ± 0.69 ^b	4.98 ± 0.26 ^c
Grasa	1.11 ± 0.05 ^a	0.79 ± 0.1 ^b	0.59 ± 0.05 ^c
Proteínas	12.41 ± 0.60 ^a	8.79 ± 0.027 ^b	5.76 ± 0.32 ^c
Fibra cruda	27.19 ± 0.07 ^b	26.43 ± 0.0054 ^c	37.80 ± 0.022 ^a
Carbohidratos	38.89 ± 0.60 ^c	47.35 ± 0.90 ^a	42.4 ± 0.52 ^b

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre filas ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

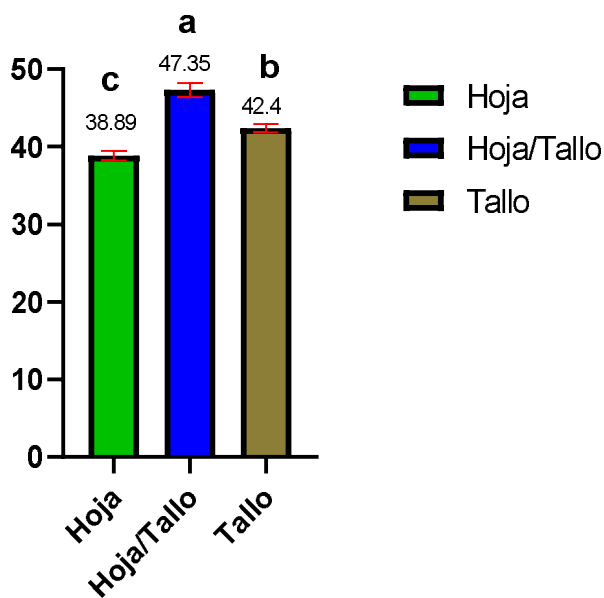


Figura 23. Porcentaje de carbohidratos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre filas ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.2 Obtención de los extractos y cálculo del rendimiento

En la Tabla 13 y Figura 24 se muestran los rendimientos obtenidos de los extractos, en donde se puede observar que el mayor rendimiento de los extractos etanólicos obtenidos de los tejidos de Nurite fue del tejido de hoja con un 11.47 ± 0.63 % y el menor fue el del tejido de tallo con un 6.5 ± 0.093 %. Los rendimientos obtenidos comparados con el extracto etanólico de 2 plantas medicinales son bajos ya que las plantas Alegría (*Scutellaria incarnata*) y amansatoros (*Justicia pectoralis*) presentaron rendimientos de 37 y 37.6 % respectivamente, en estas extracciones fue empleada la agitación la cual favorece la interacción de las partículas y por ende al rendimiento (Benítez *et al.*, 2020). Al comparar los resultados con el extracto metanólico de plantas de la misma familia (Lamiaceae): *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium*, y *Teucrium polium* se reportaron los rendimientos de 22.25 %, 22.5 %, 25.12 % y 27.50 %, los cuales fueron mayores en comparación a nuestra planta de estudio (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Las diferencias de rendimiento entre cada materia vegetal son fuertemente influenciadas por las características físicas y químicas de los compuestos extraídos (Dai y Mumper, 2010). El tipo de solvente de extracción es importante ya que Cakir *et al.* (2006) y Sharififar *et al.* (2009) trabajaron con plantas lamiáceas donde en todos los casos el mejor solvente de extracción para obtener el mayor rendimiento y contenido de compuestos fenólicos fue el metanol en comparación con el agua, éter de petróleo, acetona, entre otros. Al comparar nuestro rendimiento con el extracto metanólico de las partes aéreas (sin especificar hojas, tallos o flores) de una planta del mismo género Calaminta (*C. clinopodium* L.) presentó 13.12 ± 0.68 siendo este valor ligeramente mayor al reportado por nosotros con el extracto etanólico (Khaled-Khodjaa *et al.*, 2013).

Los tipos de fitoquímicos obtenidos en los extractos son ampliamente influenciados por la polaridad de los solventes de extracción y se ha reportado que es mejor el metanol que el etanol al ser más polar (Ramírez-Rojo *et al.*, 2018). Cabe mencionar que en este trabajo de investigación se utilizó etanol debido al interés de conocer y determinar los compuestos que se extraen y si estos son significativamente importantes para su utilización en la industria farmacéutica y alimentaria sin interferencias por toxicidad del solvente empleado.

Tabla 13. Rendimiento del extracto etanólico de *Clinopodium macrostemum* en base seca.

Tejido	Rendimiento de extracto crudo (%)
Hoja	11.47 ± 0.63 ^a
Hoja/Tallo	9 ± 0.047 ^b
Tallo	6.5 ± 0.093 ^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en la columna indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

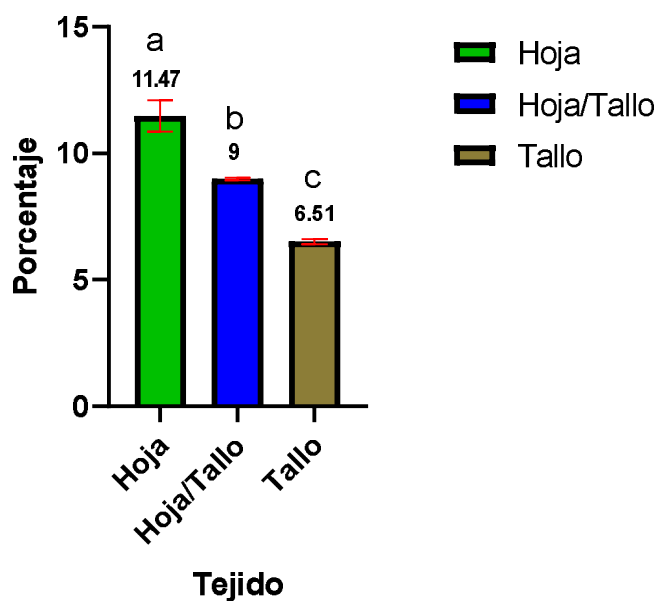


Figura 24. Rendimiento de *Clinopodium macrostemum* del extracto crudo.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey).

8.3 Cuantificación de fitoquímicos y capacidad antioxidante

A continuación, se muestran los análisis de cuantificación de fitoquímicos y de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de Nurite por maceración en etanol: Extracto de hoja

de Nurite (EHN), Extracto de hoja y tallo de Nurite (EHTN) y extracto de tallo de Nurite (ETN).

8.3.1 Determinación del contenido de compuestos fenólicos

La presencia de fenoles está asociada a la actividad antioxidante. En la Tabla 14 y Figura 25 se reporta la cantidad de Fenoles totales expresados en miligramos equivalentes a ácido gálico/ gramos de peso seco (mg EAG/g Ps) donde todos los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) el valor más alto fue del EHN 102.58 ± 0.37 seguido del EHTN 94.70 ± 0.30 y el menor valor fue para ETN 85.90 ± 0.47 . Es común observar que el contenido de polifenoles sea mayor en las hojas que en los tallos ya que existen diversos artículos que reportan esta tendencia. Tal es el caso de un estudio donde se utilizó de igual manera hojas y tallos de nurite presentando valores de 11.59 ± 0.12 y 9.53 ± 0.301 mg EAG/g de tejido los cuales son significativamente menores en comparación a los obtenidos para los extractos analizados en este trabajo, cabe resaltar que de igual manera el extracto de hoja en este caso presentó mayor contenido de polifenoles que el extracto de tallo (Carbajal *et al.*, 2023). Las hojas en comparación a los tallos tienden a ser una de las partes más expuestas a factores bióticos y abióticos por lo que presentan mayor contenido de polifenoles para protegerse de la luz ultravioleta, de herbívoros y condiciones de estrés (Hari Om *et al.*, 2021). La senescencia de las hojas cuando presentan un color marrón indica la presencia de polifenoles, así como también, el estrés por la salinidad del suelo pudiera ser contrarrestada con mayor producción de polifenoles en las hojas (Pratyusha, 2022). Al ser una planta silvestre no se conoce los factores bióticos y abióticos que presentó la planta por lo que estos pueden afectar el contenido de polifenoles en las diferentes partes de la planta.

Al comparar los resultados con extractos metanólicos de hojas de *Lamiaceae: Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium* y *Teucrium polium* (26.86 ± 0.84 , 20.07 ± 0.44 , 72.84 ± 1.46 y 45.65 ± 1.1 EAG/gPS) (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Al comparar nuestro rendimiento con el extracto metanólico de las partes aéreas (sin especificar hojas, tallos o flores) de una planta del mismo género *Calaminta (C. clinopodium L.)* presentó 22.88 ± 1.57 (Khaled-Khodjaa *et al.*, 2013). Estos fueron menores comparados con los extractos evaluados. Las plantas *Lamiaceae* pueden presentar diferente contenido de fenoles debido a

su variación entre especies, condiciones ambientales y diversidad genética lo cual conlleva a los cambios en las diferentes rutas bioquímicas (Usanmaz *et al.*, 2022).

Tabla 14. Contenido de fenoles en los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Extracto	mg EAG/g PS
EHN	102.58 ± 0.36 ^a
EHTN	94.70 ± 0.30 ^b
ETN	85.90 ± 0.47 ^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en la columna indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: mg EAG/g Ps = miligramos equivalentes a ácido gálico/ gramos de Peso seco, EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y ETN = Extracto de tallo de Nurite.

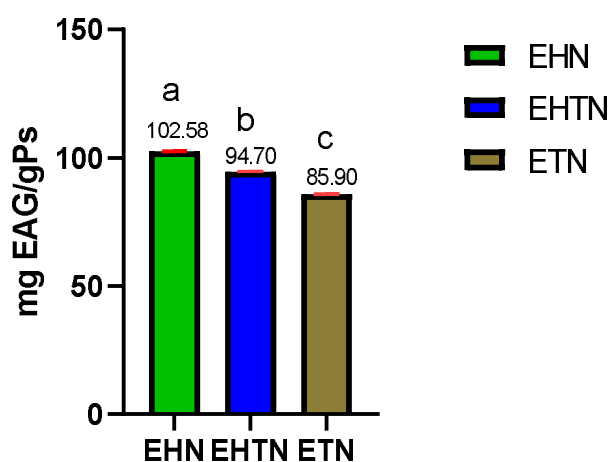


Figura 25. Contenido de fenoles en los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 VÍA (1 FACTOR) y prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey). Abreviaturas: mg EAG/gPs = miligramos equivalentes a ácido gálico/ gramos de Peso seco, EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y ETN = Extracto de tallo de Nurite.

8.3.2 Determinación del contenido de flavonoides

En la Figura 26 y Tabla 15, se reporta el contenido de flavonoides expresados en miligramos equivalentes a Quercetina/ gramos de peso seco (mg EQ/g PS) donde el EHN presentó el valor mayor 23.18 ± 0.2 teniendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con el EHTN 16.68 ± 0.08 y ETN 15.61 ± 0.78 . Estos dos últimos extractos no presentaron diferencia significativa entre ellos. Carbajal *et al.* (2023) realizó estudios con hoja y tallo de nurite donde reportó 10.38 ± 0.12 y 6.54 ± 0.67 mg EQ/ gPS, respectivamente. Estos valores son menores en comparación a los extractos evaluados en este estudio, sin embargo, estos extractos presentaron la misma relación mayoritaria del contenido de flavonoides en hoja respecto al tallo. El mayor contenido de flavonoides en las hojas en comparación al tallo es debido posiblemente a que en las hojas al tener mayor exposición a la luz en comparación al tallo absorben mayor cantidad de energía y por la fotosíntesis la producción de estos compuestos es mayor (Ifeanacho *et al.*, 2017). Los flavonoides de las hojas que se encuentran en las células epidérmicas juegan un papel importante en la supervivencia fisiológica de las plantas solo que se esconden por el verde omnipresente de la clorofila por lo que es normal encontrar en algunos casos mayor contenido de estos compuestos en las hojas que en otros tejidos (Beghdad *et al.*, 2014). En un estudio donde se utilizó *Herba Mentha Haplocalycis* cultivada en Jiangsu, China se evaluaron los flavonoides en diferentes etapas y tiempos de cosecha donde sin importar estos factores los flavonoides hesperidina, diosmina, didimina y buddleosida fueron significativamente mayores en las hojas que en los tallos por lo que esto sugiere que las hojas en este caso tienen mayor capacidad de acumular estos compuestos que los tallos (Shao-Wei *et al.*, 2018).

Al comparar los resultados con extractos metanólicos de hojas de Lamiaceae: *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium* y *Teucrium polium* (7.41 ± 0.21 , 7.03 ± 0.28 , 13.82 ± 0.97 y 10.98 ± 0.27 EQ/gPS respectivamente) presentaron valores menores en comparación con los extractos evaluados (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Al comparar el contenido de flavonoides con el extracto metanólico de las partes aéreas (sin especificar hojas, tallos o flores) de una planta del mismo género *Calaminta* (*C. clinopodium* L.) (11.05 ± 0.11 EQ/gPS) presentó de igual manera un contenido menor al de los extractos estudiados (Khaled-Khodjaa *et al.*, 2013). El contenido de flavonoides puede llegar a variar por diversas causas incluso con plantas de la misma familia entre ellas están las etapas de desarrollo, los

tipos de tejidos, la locación subcelular, factores bióticos y abióticos (Mouradoy y Spangenberg, 2014).

Tabla 15. Contenido de flavonoides en los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Extracto	mg EQ/g PS
EHN	23.18 ± 0.20 ^a
EHTN	16.68 ± 0.08 ^b
ETN	15.61 ± 0.78 ^b

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: mg EAG/g Ps = miligramos equivalentes a ácido gálico/ gramos de Peso seco, EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y ETN = Extracto de tallo de Nurite.

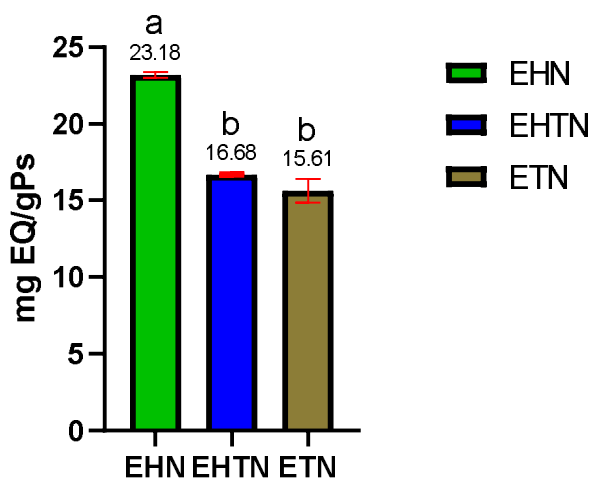


Figura 26. Contenido de flavonoides en los extractos de *Clinopodium macrostemum*

ANOVA 1 VÍA (1 FACTOR) y prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey). Abreviaturas: mg EQ/gPs = miligramos Equivalentes a Quercetina/ gramos de Peso seco, EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y ETN = Extracto de tallo de Nurite.

8.3.3 Determinación del contenido de terpenos

En la Figura 27 y en la Tabla 16, se reporta el contenido de terpenos expresados en

Miligramos equivalentes de limoneno/ gramos de peso seco (mg EL/gPs) donde el mayor contenido de estos fue encontrado en EHN con un 262.44 ± 6.33 seguido del EHTN con un 92.80 ± 4.46 y finalmente del ETN con un 21.80 ± 1.88 . Al observar en el microscopio las partes aéreas (hojas, tallos y flores) y comparar formas y estructuras morfológicas del Nurite en el Herbario EBUM de la Facultad de Biología de la UMSNH se observaron mayor número de tricomas (pubescencias) en las hojas que en los tallos. Los tricomas son estructuras glandulares capaces de producir y almacenar aceites esenciales los cuales son ricos en terpenos tal es el caso de *Lavandula angustifolia* la cual produce y almacena su aceite esencial en sus tricomas foliares (Guadarrama-Flores *et al.*, 2012; Guitton *et al.*, 2010). Se sabe que los aceites esenciales son metabolitos secundarios que se producen y almacenan en estructuras glandulares de hojas, flores y tallos, donde estos pueden variar entre tejido u órgano por los distintos tipos de estructuras y densidades de las glándulas presentes en ellos (Camina *et al.*, 2018).

En un estudio donde se valida y se emplea el mismo método de cuantificación de terpenos de los extractos de nurite donde se utiliza la espectrofotometría (usando vainillina, ácido acético y ácido sulfúrico) se evaluaron extractos de hoja de *B. holophylla* y *M. ilicifolia* utilizando como estándar β -sitoesterol dando valores de 132.36 ± 20.36 y 53.91 ± 2.6 expresados en mg E β S/g de extracto seco respectivamente (Moraes *et al.*, 2020). Estos datos comparados con EHN fueron menores y comparados con EHTN y ETN fueron mayores. Esto puede ser debido a la gama de compuestos y el contenido de estos en las matrices de plantas, así como también por el uso del reactivo estándar al cual están expresados los equivalentes.

Tabla 16. Contenido de Terpenos en los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Extracto	mg EL/g PS
EHN	262.44 ± 6.33^a
EHTN	92.80 ± 4.46^b
ETN	21.80 ± 1.88^c

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: mg EL/g PS= miligramos equivalentes a limoneno/ gramos de Peso seco, EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y ETN = Extracto de tallo de Nurite.

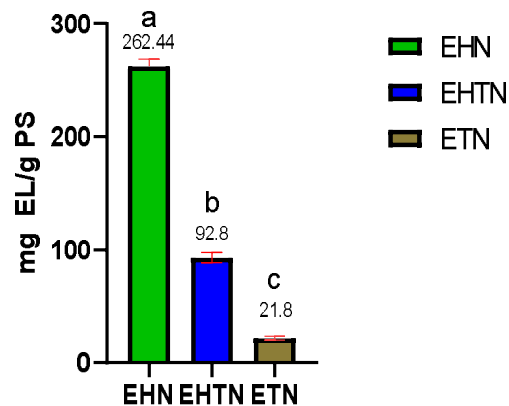


Figura 27. Contenido de Terpenos en los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: mg EL/g PS= miligramos equivalentes a limoneno/ gramos de Peso seco, EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y ETN = Extracto de tallo de Nurite.

8.3.4 Capacidad antioxidante DPPH

Para realizar la prueba de la capacidad antioxidante que tienen los extractos etanólicos de nurite se midió la decoloración que generaban dichos extractos al donar átomos de hidrógeno o electrones para estabilizar al radical DPPH observando un cambio de color morado a color amarillo. En la Tabla 17 y en la Figura 28 se muestra la IC_{50} (concentración inhibitoria 50 %) del radical DPPH con extractos de nurite expresada en mg/mL siendo de estos el mejor el ETN con un 0.079 ± 0.007 ya que recordemos que para evaluar la IC_{50} el valor más bajo corresponde a una mayor actividad antioxidante, seguido de EHTN con un 0.089 ± 0.004 y finalmente el EHN con un 0.095 ± 0.008 con el cual se utilizó una concentración mayor para lograr dicha inhibición. No obstante, al comparar los extractos con un análogo de la vitamina E (alfa-tocoferol) llamado Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic

ácido) el cual es muy soluble en agua y fácil de trabajar *in vitro* fue mejor que los extracto ya que se utilizó una concentración del 0.011 ± 0.00026 para obtener la IC_{50} .

Al comparar los resultados con el extracto metanólico de hojas de plantas de la misma familia (Lamiaceae): *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium*, y *Teucrium polium* se reportaron IC_{50} de 1.168 ± 0.003 , 0.522 ± 0.001 , 0.051 ± 0.001 , 0.095 ± 0.001 mg/mL respectivamente (Khaled-Khodja *et al.*, 2014), siendo los extractos de Nurite EHN, EHTN y ETN mejores que los de *Ajuga iva* y *Marrubium vulgare* los extractos de EHTN y ETN fueron mejores que los de *Teucrium polium* y resultó similar con el EHN. El extracto de *Mentha pulegium* fue mejor que todos los extractos de nurite evaluados. En el presente estudio en cada extracto se observa que la capacidad antioxidante aumenta con el incremento de la concentración de los extractos.

Tabla 17. IC_{50} de DPPH con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

EHN mg/ mL	EHTN mg/ mL	ETN mg/ mL	CT mg/mL
0.095 ± 0.008 ^b	0.089 ± 0.004 ^c	0.079 ± 0.007 ^d	0.011 ± 0.00026 ^a

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite y, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

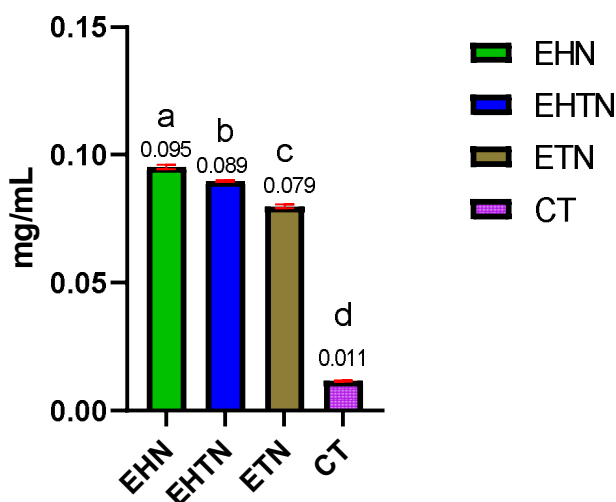


Figura 28. IC_{50} de DPPH con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

8.3.5 Capacidad antioxidante ABTS

El radical ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) presenta un color verde azulado por la interacción de este radical y el persulfato de potasio $K_2S_2O_8$. La técnica ABTS cuantifica la decoloración o el vire al color transparente al estabilizar al radical por la acción de átomos de hidrogeno o electrones que en este caso pueden ser provistos por los extractos de Nurite. En la Tabla 18 y en la Figura 29 se muestran los resultados de la IC_{50} (concentración inhibitoria 50 %) del radical ABTS con extractos de nurite expresada en mg/mL siendo de estos el mejor el EHN con un 0.0065 ± 0.00012 ya que para la IC_{50} el valor más bajo corresponde a una mayor actividad antioxidante, seguido del ETN con un 0.044 ± 0.0012 y por último el EHTN con un 0.052 ± 0.00024 con el cual se utilizó una concentración mayor para lograr dicha inhibición. No obstante, al comparar los extractos con un análogo de la vitamina E (alfa-tocoferol) llamado Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic ácido) el cual es muy soluble en agua y fácil de trabajar *in vitro* fue mejor que los extracto ya que se utilizó una concentración del 0.0008 ± 0.0000023 para obtener la IC_{50} . Al comparar dichos extractos, se aprecia que fueron mejores que los extractos hidro etanólico e hidro metanólico de *Clinopodium macrostemum* y de *Clinopodium mexicanum* originarios de Oaxaca con un IC_{50} de 5.479, 4.945, 0.8161 y 0.7869 mg/mL (García-Reyes *et al.*, 2023).

Tabla 18. IC_{50} de ABTS con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

EHN mg/ mL	EHTN mg/ mL	ETN mg/ mL	CT mg/mL
0.0065 ± 0.00012^c	0.052 ± 0.00024^a	0.044 ± 0.00123252^b	0.0008 ± 0.0000023^d

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en la fila indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

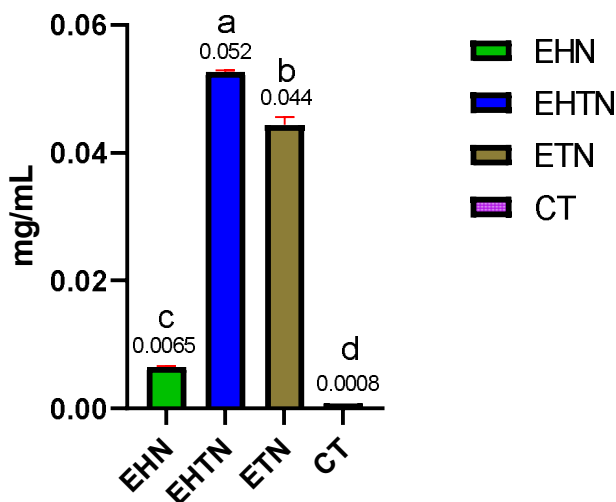


Figura 29. IC₅₀ de ABTS con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

8.3.6 Capacidad antioxidante FRAP

En la Técnica de FRAP (poder antioxidante de reducir el hierro) se mide la capacidad en este caso de los extractos de Nurite de reducir al hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6- Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}). Recordemos que la capacidad reductora de un antioxidante o compuesto antioxidante puede servir como indicador de su capacidad donante de electrones. En esta técnica el IC₅₀ se define como la concentración del sustrato a la cual se obtiene una absorbancia de 0.5.

En la Tabla 19 y Figura 30 se muestra la IC₅₀ de los extractos de nurite expresada en mg/mL de extracto donde el mejor poder antioxidante es atribuido al EHN con un 0.038 ± 0.0002 ya que recordemos que para la IC₅₀ el valor más bajo corresponde a una mayor actividad antioxidante. El siguiente extracto que presentó buen poder antioxidante fue el EHTN con un 0.041 ± 0.0003 y por último fue ETN con un 0.044 ± 0.0003 . Cabe resaltar que la IC₅₀ de todos los extractos evaluados fue mejor ya que se empleó una concentración menor de sustancia comparada con el control el cual es un análogo de la vitamina E (alfa-tocoferol) llamado Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic ácido) con el cual se empleó una concentración de 0.069 ± 0.00038 .

Tabla 19. IC₅₀ de FRAP con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

EHN mg/ mL	EHTN mg/ mL	ETN mg/ mL	CT mg/mL
0.038 ± 0.0002 ^d	0.041 ± 0.0003 ^c	0.044 ± 0.0003 ^b	0.069 ± 0.00038 ^a

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en las filas indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

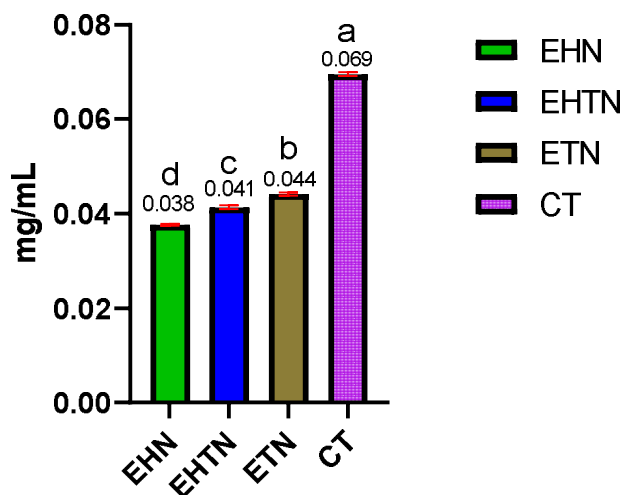


Figura 30. IC₅₀ de FRAP con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$, $n=3$, prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

8.3.7 Discusión general de antioxidantes presentes en los extractos de *Clinopodium macrostemum*

En la Tabla 20 se muestra la comparación de la IC₅₀ de los extractos de Nurite, así como también los valores de trolox para las técnicas utilizadas (DPPH, ABTS y FRAP). Se observa que al comparar los extractos el EHN fue mejor en las pruebas ABTS y DPPH debido a que

se gasta menos extracto para lograr la inhibición, por ende, el valor más bajo corresponde a una mayor actividad antioxidante. En el caso de DPPH el mejor extracto donde se utilizó una concentración menor fue el ETN. La diferencia de las concentraciones de los extractos para llegar a la IC₅₀ entre DPPH y ABTS respecto a EHN se debe posiblemente a que en la hoja existen mayores compuestos hidrofílicos que lipofílicos ya que la técnica ABTS es más sensible a este tipo de compuesto y DPPH es sensible a los compuestos lipofílicos (Rivas *et al.*, 2017). En la prueba FRAP el EHN fue el mejor comparado con los otros extractos de igual manera que en la prueba ABTS debido a que se utilizó una cantidad menor de concentración de extracto para llegar a la IC₅₀, al obtener diferencias significativas respecto a los otros extractos se puede inferir que los compuestos antioxidantes presentes en EHN tienen mayor capacidad de transferencia de electrones y átomos como los de hidrógeno. Cabe resaltar que no todos los antioxidantes son capaces de reducir al hierro férrico ya que no actúan por transferencia de electrones como lo son los tioles (Boligon *et al.*, 2014). En DPPH y ABTS el CT fue mejor que los extractos evaluados, pero en FRAP fueron mejores los extractos que CT sugiriendo en esta ocasión el control presentaba una capacidad donante menor para esa última prueba.

Tabla 20. Comparación de la IC₅₀ DPPH, ABTS y FRAP de los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Extractos	DPPH IC₅₀ mg/mL	ABTS IC₅₀ mg/mL	FRAP IC₅₀ mg/mL
EHN	0.0953 ± 0.0008 ^a	0.0065 ± 0.0001 ^c	0.0376 ± 0.0002 ^d
EHTN	0.0898 ± 0.0004 ^b	0.052 ± 0.0002 ^a	0.0413 ± 0.00038 ^c
ETN	0.0798 ± 0.0007 ^c	0.044 ± 0.0012 ^b	0.044 ± 0.00034 ^b
CT	0.01154 ± 0.002 ^d	0.00081 ± 0 ^d	0.069 ± 0.00038 ^a

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes en la misma columna, indican que existe diferencia significativa entre cada tejido en la misma técnica ($p < 0.05$, $n=3$ prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

En la Tabla 21 se presentan los resultados de los tres ensayos antioxidantes de los extractos de *Clinopodium macrostemum*, expresados en valores equivalentes de trolox (μM Eq Trolox/mL).

El EHN presentó mayor contenido de fenoles, flavonoides y terpenos en comparación a los otros extractos evaluados dando con esto una noción del porqué en las técnicas de la capacidad antioxidante expresada en equivalentes de trolox en las técnica ABTS y FRAP fueron mayores los valores y respecto a la técnica DPPH recordemos que el EHN en el IC_{50} requirió mayor cantidad de concentración para dicha inhibición por lo que sus equivalentes fueron menores y se cree que los compuestos hidrofílicos se encuentran en mayor concentración que los lipofílicos los cuales estos últimos presentan mayor sensibilidad a DPPH (Rivas *et al.*,2017).

En un estudio donde se evaluó la capacidad de inhibición de DPPH de extractos etanólicos de hojas y tallos de nurite proveniente de Oaxaca presentó valores de 225.5 ± 0.23 y 183.5 ± 0.51 μg Eq. Trolox /g respectivamente los cuales son menores en comparación a los obtenidos para los extractos analizados en este trabajo, cabe resaltar que de igual manera el extracto de hoja presentó mayor capacidad antioxidante que el extracto de tallo (Carbajal *et al.*, 2023).

Tabla 21. Capacidad antioxidante de los extractos de *Clinopodium macrostemum* expresada en μM Eq Trolox/mL y el contenido de fenoles, flavonoides y terpenos.

Extractos	DPPH		ABTS		FRAP	
	μM	Eq	μM	Eq	μM	Eq
	Trolox/mL		Trolox/mL		Trolox/mL	
EHN	599.895		204.197		294.070	
	$\pm 1.118^c$		$\pm 0.158^a$		$\pm 1.124^a$	
EHTN	610.642		149.685		247.952	
	$\pm 0.094^b$		$\pm 0.0005^c$		$\pm 1.124^c$	
ETN	628.348		154.756		284.509	
	$\pm 0.114^a$		$\pm 0.0163^b$		$\pm 5.061^b$	

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre cada tejido en la misma técnica ($p < 0.05$, $n=3$ prueba post hoc de Tukey). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite y CT= Control Trolox.

8.3.8 Correlación lineal (R^2) entre los fitoquímicos (compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos) y las técnicas antioxidantes

Acorde a las correlaciones presentadas en las Tablas 22, 23 y 24 se aprecia que hay correlaciones positivas entre los fenoles y flavonoides con los ensayos antioxidantes, como lo expresó Khaled-Khodja *et al.* (2014). Las correlaciones pudieran darnos a entender que los mismos fenoles y flavonoides fueron en todos los casos los mismos actuando como antioxidantes y empleando los mismos mecanismos de acción. Así como también al correlacionar los Terpenos con las técnicas antioxidantes se obtuvieron correlaciones positivas por lo que también estos son los responsables de la capacidad antioxidante. Después se realizó prueba de hipótesis para la correlación en donde en todos los casos fueron correlaciones estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Tabla 22. Correlación de compuestos fenólicos con capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP.

Ensayo	Fenoles hoja	P	Fenoles hoja/tallo	P	Fenoles tallo	P
DPPH	0.99	0.00037*	0.97	0.0023	0.97	0.0023
ABTS	0.97	0.014	0.96	0.020	0.9	0.048
FRAP	0.99	0.00027*	0.97	0.0023	0.98	0.0015

Prueba de hipótesis para la correlación t ($\alpha = 0.05$).

Tabla 23. Correlación de flavonoides con capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP.

Ensayo	Flavonoides hoja	P	Flavonoides hoja/tallo	P	Flavonoides tallo	P
DPPH	0.99	0.00073*	0.99	0.00006	0.94	0.0051
ABTS	0.94	0.029	0.99	0.004	0.99	0.00077*
FRAP	0.96	0.0029	0.97	0.00002	0.98	0.0011

Prueba de hipótesis para la correlación t ($\alpha = 0.05$).

Tabla 24. Correlación de terpenos con capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP

Ensayo	Terpenos hoja	P	Terpenos hoja/tallo	P	Terpenos tallo	P
DPPH	0.97	0.00156	0.99	0.00031*	0.99	0.00035*
ABTS	0.97	0.0022	0.99	0.00039*	0.93	0.013
FRAP	0.93	0.0073	0.98	0.00062	0.99	0.00017

Prueba de hipótesis para la correlación t ($\alpha= 0.05$).

8.4 Evaluación de las propiedades inhibitorias de los extractos de Nurite contra: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

8.4.1 Inhibición de *S. aureus* por el método de Kirby-Bauer

8.4.1.1 Selección del control positivo y negativo para las pruebas de Kirby-Bauer para *Staphylococcus aureus*

Con la finalidad de elegir algún antibiótico que presentara sensibilidad mediante el halo de inhibición en *Staphylococcus aureus* se usó de primera instancia la ampicilina con 10 μ g en disco, y como se aprecia en la Figura 31 y en la Tabla 25 tuvo un nulo halo de inhibición, sugiriendo resistencia a este antibiótico acorde a los parámetros establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2020) y el Manual de prácticas de microbiología (Pérez y Galiana, 2020).

Al observar la nula inhibición de *Staphylococcus aureus* con ampicilina la cual es un β lactámico con la peculiaridad de actuar en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP por sus siglas en inglés) lo que esto genera la activación de un sistema de enzimas líticas que están implicadas en la degradación del peptidoglicano. Este es un polímero presente en la estructura de la pared celular de las bacterias donde es más abundante en las gram + en comparación a las gram -. Dentro de los mecanismos de resistencia posibles en esta cepa pudieran ser la producción de β -lactamasas que evitan la función de los β lactámicos y por consiguiente, no permite que se forme correctamente el peptidoglicano en la pared celular bacteriana (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Al saber que los Ribosomas son los organelos principales para la producción de proteínas se optó por emplear antibióticos de tipo aminoglucósido (gentamicina y estreptomicina) los cuales, son moléculas cargadas positivamente que interactúan con las cargas negativas de la pared celular, provistas por los grupos fosfato para las bacterias gram – y los ácidos teicos unidos al peptidoglicano de las bacterias gram + esta interacción provoca el desplazamiento de los iones de calcio y magnesio que se encuentran unidos a las moléculas de lipopolisacárido y por este desplazamiento modifica la estructura de la célula permitiendo el ingreso de los aminoglucósidos a la membrana celular y posteriormente al citoplasma. Dentro de la célula actúa en los ribosomas produciendo errores en la lectura del ARNm produciendo proteínas deficientes que se unirán en la membrana, y el ribosoma terminará colapsando por interactuar con las grandes cantidades de aminoglucósidos (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Con el uso de los aminoglucósidos a 10 µg en el disco se obtuvo sensibilidad expresada con los halos de inhibición los cuales fueron medidos con un pie de rey digital. Para gentamicina se obtuvo 13.93 ± 0.31 mm el cual tuvo diferencias significativas con estreptomicina 12.5 ± 0.5 mm siendo este primero mejor por lo que se seleccionó este como nuestro control positivo para los experimentos ver Figura 32. Cabe mencionar que acorde a los parámetros establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2020) y el Manual de prácticas de microbiología (Pérez, M. y Galiana, C. 2020). se considera para ambos antibióticos un nivel de susceptibilidad bacteriana intermedia ver Tablas 25 y 26.

Para el control negativo (C-) se utilizó el solvente con el que fueron resuspendidos los extractos conformados de DMSO y agua (1:1) el cual fue dosificado en la campana de flujo laminar de 10 uL en 10 uL secando en cada dosificación hasta obtener 100 uL en el disco. En la figura 31 y 32 se aprecia que el C- no presentó inhibición hacia el mo. por lo que esto indica que las inhibiciones presentadas por los extractos son del contenido de compuestos bioactivos y no del solvente.

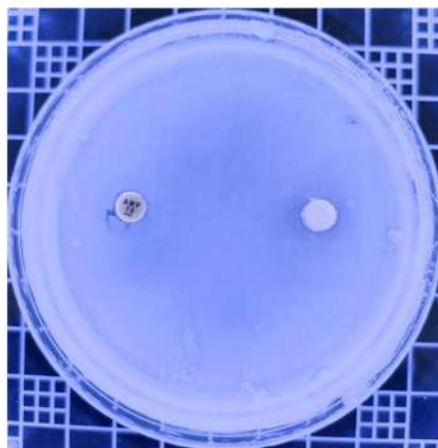


Figura 31. Prueba *Kirby-Bauer* para *Staphylococcus aureus* con Ampicilina y solvente de extracción DMSO:Agua.

Se observa la caja Petri con desarrollo de *Staphylococcus aureus* al cual se le realizó prueba de *kirby bauer* para medir su sensibilidad con Ampicilina a 10 μ g en el disco (izquierdo), también se colocó un disco con el solvente de extracción considerado como control negativo (C-) al cual se le dosificaron 100 uL del solvente de extracción (DMSO:Agua).

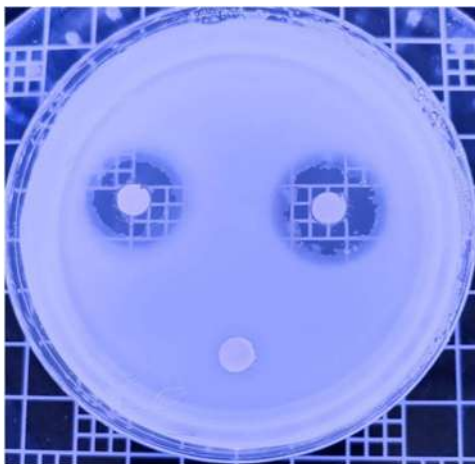


Figura 32. Prueba *Kirby-Bauer* para *Staphylococcus aureus* con Estreptomina, Gentamicina y solvente DMSO:Agua.

Se observa la caja Petri con desarrollo de *Staphylococcus aureus* al cual se le realizó prueba de *Kirby - Bauer* para medir su sensibilidad con estreptomina (izquierda) y gentamicina (derecha). También se observa el control – (C-) (abajo) al cual se le dosificaron 100 uL del solvente de extracción (DMSO:Agua).

Tabla 25. Interpretación de los halos de inhibición para *Staphylococcus aureus*.

Antibiótico 10 µg en disco	Diámetro (mm)		
	Susceptible ≥	Intermedio	Resistente ≤
Ampicilina	29	-	28
Estreptomicina	15	12-14	11
Gentamicina	15	13-14	12

Fuente: Tabla realizada acorde a los parámetros establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2020) y el Manual de prácticas de microbiología (Pérez, M. y Galiana, C. 2020).

Tabla 26. Selección del control + para *Staphylococcus aureus* acorde a susceptibilidad.

Antibiótico 10 µg en disco	mm inhibición	Susceptibilidad bacteriana acorde CLSI
Ampicilina	0 ± 0 ^c	Resistente
Estreptomicina	12.5 ± 0.5 ^b	Intermedia
Gentamicina	13.93 ± 0.31 ^a	Intermedia

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre cada antibiótico (p<_ 0.05, n=3 prueba post hoc de Tukey).

8.4.1.2 Prueba Kirby-Bauer con extractos de *Clinopodium macrostemum* sobre *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 27 y Figura 33, se observan los resultados obtenidos de los mm del halo de inhibición de los extractos de nurite con respecto a *Staphylococcus aureus* donde se aprecia sensibilidad en todos los extractos de 2 a 8 mg en el disco siendo en todos los casos creciente el halo de inhibición conforme iba creciendo la concentración. Cuando se evaluó a 2 mg en el disco el mayor valor de halo de inhibición fue el de EHTN y el menor fue el de EHN. Después de aumentar la concentración en el disco de 4 a 8 mg el mejor en todos los casos fue EHN y el que presentó menor fue ETN. Cabe resaltar que el control + (C+) sigue siendo mejor que los extractos evaluados ya que se empleó únicamente 10 µg en el disco. Los resultados obtenidos de los extractos de nurite en todos los casos fueron menores al compararlos con extractos metanólicos de hojas de la misma familia (Lamiaceae): *Ajuga iva*,

Marrubium vulgare, *Mentha pulegium*, y *Teucrium polium* a una concentración de 2 mg en el disco se reportaron halos de inhibición de 13.25 ± 0.98 , 15.5 ± 0.7 , 15.25 ± 0.35 , 14.75 ± 0.35 mm respectivamente (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Como en todos los casos se presentó halo de inhibición medible a partir de 2 mg en el disco, se consideró esta como la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Klančnik *et al.*, 2010).

Tabla 27. Comparación de los mm del halo de Inhibición de *Staphylococcus aureus* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

mg del extracto en disco	mm del halo de inhibición EHN al 50% DMSO/agua	mm del halo de inhibición EHTN al 50% DMSO/agua	mm del halo de inhibición ETN al 50% DMSO/agua
2	8.73 ± 0.68 ^{cD}	11.47 ± 0.23 ^{aD}	10.36 ± 0.15 ^{bD}
4	14.20 ± 0.26 ^{aC}	13.07 ± 0.25 ^{bC}	11.80 ± 0.10 ^{cC}
6	15.37 ± 0.32 ^{aB}	14.17 ± 0.12 ^{bB}	12.73 ± 0.15 ^{cB}
8	17.43 ± 0.25 ^{aA}	16.63 ± 0.15 ^{bA}	14.17 ± 0.31 ^{cA}
Gentamicina 10 µg (C +)	13.93 ± 0.31		

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias de los mm de inhibición \pm DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de Nurite contra *Staphylococcus aureus* respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$) (entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la columna (mismo extracto a diferentes concentraciones). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido y C+= Control positivo

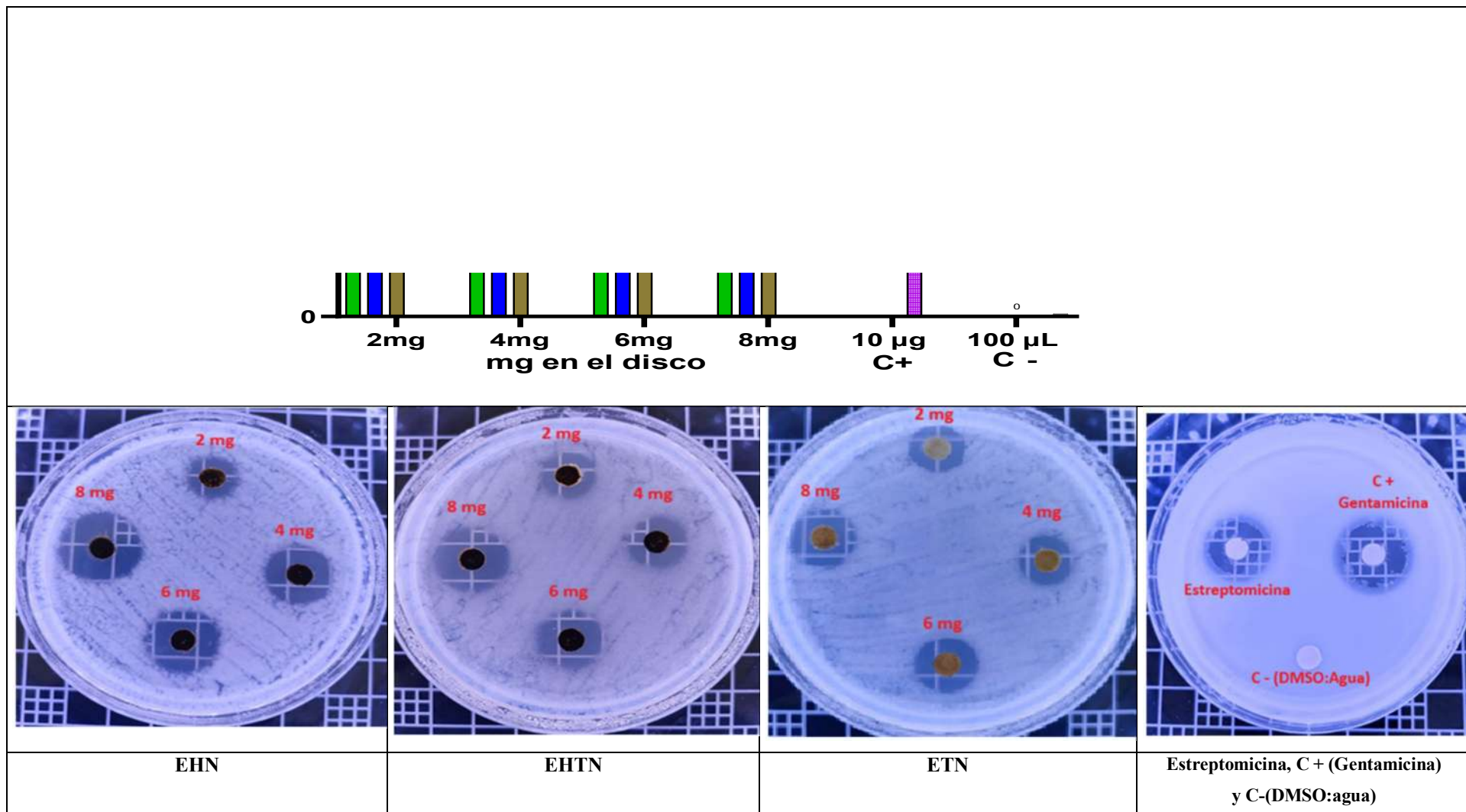


Figura 33. Comparación de los mm del halo de Inhibición de *Staphylococcus aureus* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medidas de los mm de inhibición \pm DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de Nurite contra *Staphylococcus aureus* respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$) (entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la columna (mismo extracto a diferentes concentraciones). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido y C+= Control positivo.

En la Tabla 28 se muestra el porcentaje de inhibición de los halos generados por los extractos de Nurite en la cepa de *Staphylococcus aureus* respecto al control positivo (gentamicina 10 µg/disco) donde se aprecia que a 8 mg/disco los 3 extractos fueron mayores al control. A esa concentración el de mayor porcentaje de inhibición es el EHN con un $125.15 \pm 1.81\%$, y el de menor porcentaje de inhibición el ETN con un $101.70 \pm 2.19\%$.

A 2mg/ disco el mejor extracto fue EHTN con un $82.32 \pm 1.66 \%$ y el peor fue $62.69 \pm 4.89 \%$. En las siguientes concentraciones 4-6 mg el mejor porcentaje de inhibición fue de EHN y el peor de ETN. En todos los extractos a medida que aumenta la concentración, el porcentaje de inhibición fue mayor. Cabe resaltar que el control positivo (C+) sigue siendo mejor que los extractos evaluados ya que se empleó únicamente 10 µg en el disco. Para considerar una actividad antimicrobiana importante el % de inhibición de los extractos o sus fracciones debe ser >70%, intermedia entre el 50 y 70% y baja cuando es <50% (Ramírez y Díaz, 2007; Navarrete *et al.*, 2020). Acorde a este criterio los extractos evaluados a 2mg el EHN tuvo una inhibición intermedia y el EHTN y ETN una inhibición alta. A partir de 4 a 6 mg todos los extractos presentaron inhibición alta.

Tabla 28. Comparación del porcentaje de Inhibición de *Staphylococcus aureus* con respecto a Gentamicina (Control +) de los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

mg del extracto en disco	% del halo de inhibición EHN al 50% DMSO/agua	% del halo de inhibición EHTN al 50% DMSO/agua	% del halo de inhibición ETN al 50% DMSO/agua
2	62.69 ± 4.89 ^{c, D}	82.32 ± 1.66 ^{a, D}	76.09 ± 3.80 ^{b, D}
4	101.94 ± 1.90 ^{a, C}	93.80 ± 1.81 ^{b, C}	84.71 ± 0.72 ^{c, C}
6	110.31 ± 2.31 ^{a, B}	101.7 ± 0.83 ^{b, B}	91.41 ± 1.10 ^{c, B}
8	125.15 ± 1.81 ^{a, A}	120.84 ± 3.54 ^{b, A}	101.70 ± 2.19 ^{c, A}
Gentamicina (C+) 10 µg/disco	$13.93 \pm 0.31\text{mm} = 100\%$		

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias de los porcentajes de inhibición ± DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de Nurite contra *Staphylococcus aureus* respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$)

(entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la columna (mismo extracto a diferentes concentraciones). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido y C+= Control positivo.

8.4.2 Inhibición de *E. coli* por el método de Kirby-Bauer

8.4.2.1 Selección del control positivo y negativo para las pruebas de Kirby-Bauer para *Escherichia coli*

Con la finalidad de elegir algún antibiótico que presentara sensibilidad mediante el halo de inhibición en *Escherichia coli* se usó de primera instancia la ampicilina con 10 μg en el disco y como se aprecia en la figura 34 si existe inhibición ya que presentó halo de inhibición de 17 ± 0.20 mm este se evaluó acorde a los parámetros establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2020) y el Manual de prácticas de microbiología (Pérez, M. y Galiana, C. 2020), las cuales nos dicen que acorde al halo de inhibición presentado la cepa si es susceptible a ampicilina ver tabla 29 y 30.

También se determinaron los antibióticos de tipo aminoglucósido (Gentamicina y Estreptomicina) como con la cepa anterior los cuales fueron evaluados a 10 μg en el disco, obteniendo sensibilidad expresada con los halos de inhibición los cuales fueron medidos con un pie de rey digital. El mayor halo de inhibición fue el de gentamicina 17.63 ± 0.15 mm el cual tuvo diferencias significativas con estreptomicina 15.66 ± 0.25 mm siendo este menor ver figura 35. Cabe mencionar que acorde a los parámetros establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2020) y el Manual de prácticas de microbiología (Pérez, M. y Galiana, C. 2020) y se consideró para ambos antibióticos que son susceptibles ver Tablas 29 y 30. Al obtener el mayor halo de inhibición con gentamicina y para homogenizar con la otra cepa el control positivo (C+) este fue seleccionado.

Para el control negativo (C-) se utilizó de igual manera el solvente con el que fueron resuspendidos los extractos conformados de DMSO y agua (1:1) el cual fue dosificado como se explicó anteriormente con la otra cepa. En la Figura 34 y 35 se aprecia que no presentó inhibición hacía el MO por lo que esto indica que las inhibiciones presentadas por los extractos son del contenido de compuestos bioactivos y no del solvente.

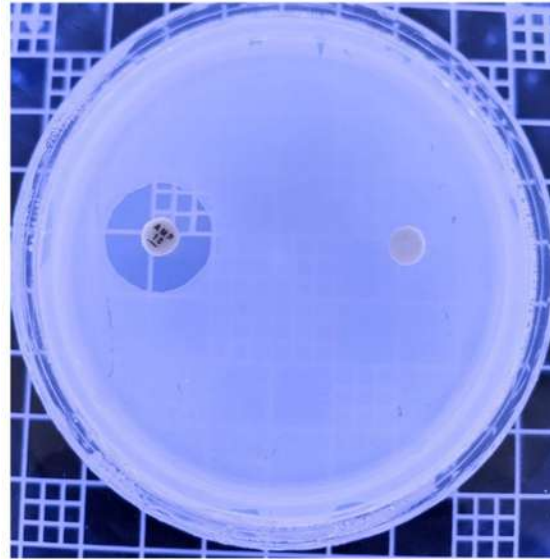


Figura 34. Prueba Kirby-Bauer para *Escherichia coli* con Ampicilina y solvente DMSO:Agua.

Se observa la caja petri con desarrollo de *Escherichia coli* al cual se le realizó prueba de kirby bauer para medir su sensibilidad con Ampicilina a 10 µg en el disco (izquierdo), así como también se colocó un disco con el solvente de extracción (derecha) considerado como control negativo (C-) al cual se le dosificaron 100 uL del solvente de extracción (DMSO:Agua).

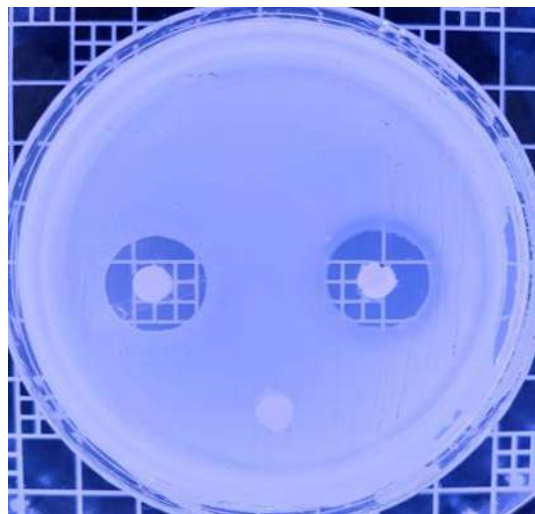


Figura 35. Prueba Kirby-Bauer para *Escherichia coli* con Estreptomina, Gentamicina y solvente DMSO:Agua.

Se observa la caja Petri con desarrollo de *Escherichia coli* al cual se le realizó prueba de kirby bauer para medir su sensibilidad con estreptomina (izquierda) y gentamicina (derecha). También se observa el control – (C-) (abajo) al cual se le dosificaron 100 uL del solvente de extracción (DMSO:Agua).

Tabla 29. Interpretación de los halos de inhibición para Enterobacterias (*Escherichia coli*).

Antibiótico 10 µg en disco	Diámetro (mm)		
	Susceptible ≥	Intermedio	Resistente ≤
Ampicilina	17	14 - 16	13
Estreptomina	15	12-14	11
Gentamicina	15	13-14	12

Fuente: Tabla realizada acorde a los parámetros establecidos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI,2020) y el Manual de prácticas de microbiología (Pérez, y Galiana, 2020).

Tabla 30. Selección del control + para *Escherichia coli*.

Antibiótico 10 µg en disco	mm inhibición	Susceptibilidad bacteriana acorde CLSI
Ampicilina	17 ± 0.20 ^b	Susceptible
Estreptomina	15.66 ± 0.25 ^c	Susceptible
Gentamicina	17.63 ± 0.15 ^a	Susceptible

ANOVA 1 vía (1 Factor). Letras diferentes indican que existe diferencia significativa entre cada antibiótico (p<_ 0.05, n=3 prueba post hoc de Tukey).

8.4.2.2 Prueba Kirby Bauer con extractos de *Clinopodium macrostemum* sobre *Escherichia coli*

En la Tabla 31 y Figura 36 se observan los resultados obtenidos de los mm del halo de inhibición de los extractos de nurite con respecto a *Escherichia coli* donde se aprecia sensibilidad en todos los extractos de 2 a 8 mg en el disco siendo el mejor el EHN en comparación a los otros tratamientos. En todos los casos fue creciente el halo de inhibición conforme iba aumentando la concentración. Cuando se evaluó a 2 mg en el disco el mayor halo de inhibición fue el de EHTN con un 9.27 ± 0.38 mm y el ETN 9.20± 0.26 mm sin mostrar diferencia estadística significativa y el menor extracto fue el de EHTN con 7.67 ± 0.35 mm. Después de aumentar la concentración en el disco de 4 a 8 mg el mejor en todos

los casos fue EHN y el que presentó menor fue EHTN y ETN ya que en sus valores no existió diferencia significativa. Cabe resaltar que el control + (C+) sigue siendo mejor que los extractos evaluados ya que se empleó únicamente 10 µg en el disco y dio un halo de inhibición mayor comparado con los extractos. Los resultados obtenidos de los extractos de nurite en todos los casos a 2 mg/disco fueron menores al compararlos a la misma concentración con extractos metanólicos de hojas de la misma familia (Lamiaceae): *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium*, y *Teucrium polium* de 13 ± 0.7 , 18.5 ± 1.04 , 17.5 ± 0.35 , 15 ± 1.06 mm respectivamente (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Como en todos los casos se presenció halo de inhibición medible a partir de 2 mg en el disco se consideró esta como la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Klančnik *et al.*, 2010).

Tabla 31. Comparación de los halos de Inhibición de *Escherichia coli* con extracto de hoja, hoja/tallo y tallo de *Clinopodium macrostemum*.

mg del extracto en disco	mm del halo de inhibición EHN al 50% DMSO/agua	mm del halo de inhibición EHTN al 50% DMSO/agua	mm del halo de inhibición ETN al 50% DMSO/agua
2	9.27 ± 0.38 ^{aC}	7.67 ± 0.35 ^{bD}	9.20 ± 0.26 ^{aB}
4	11.43 ± 0.42 ^{aB}	9.03 ± 0.15 ^{bC}	9.70 ± 0.62 ^{bB}
6	12.37 ± 0.38 ^{aB}	10.47 ± 0.38 ^{bB}	10.90 ± 0.40 ^{bA}
8	13.43 ± 0.25 ^{aA}	12.07 ± 0.21 ^{bA}	11.63 ± 0.15 ^{bA}
Gentamicina 10 µg (C +)	17.63 ± 0.15 mm		

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias de los mm de inhibición \pm DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de nurite contra *Escherichia coli* respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente en las columnas, indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$) (entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la columna (mismo extracto a diferentes concentraciones). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido y C+= Control positivo.

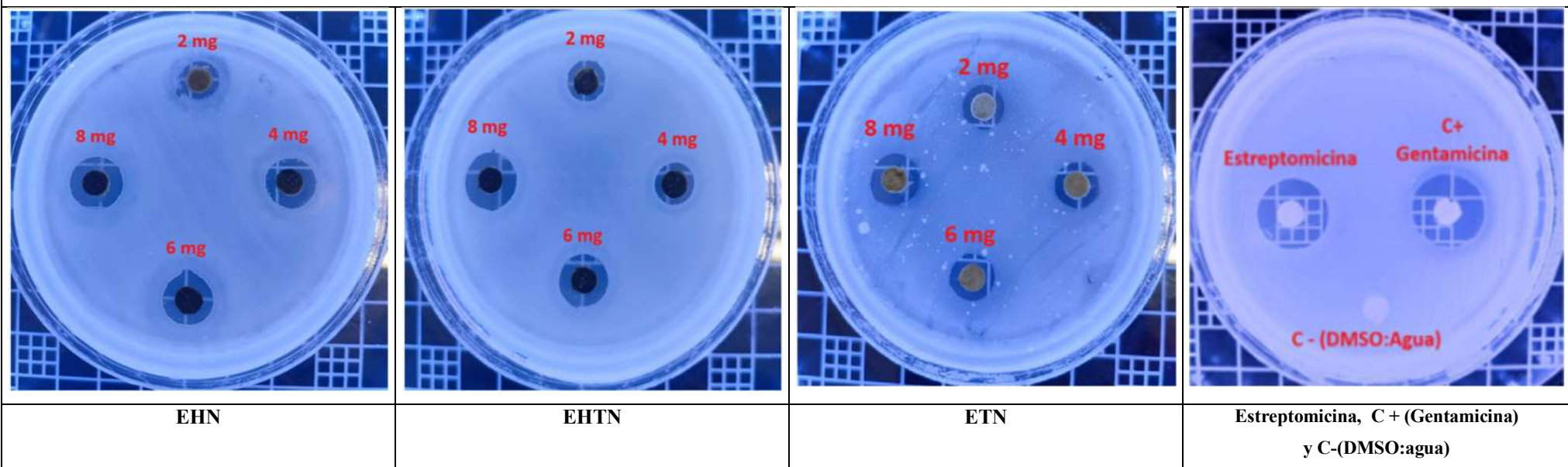
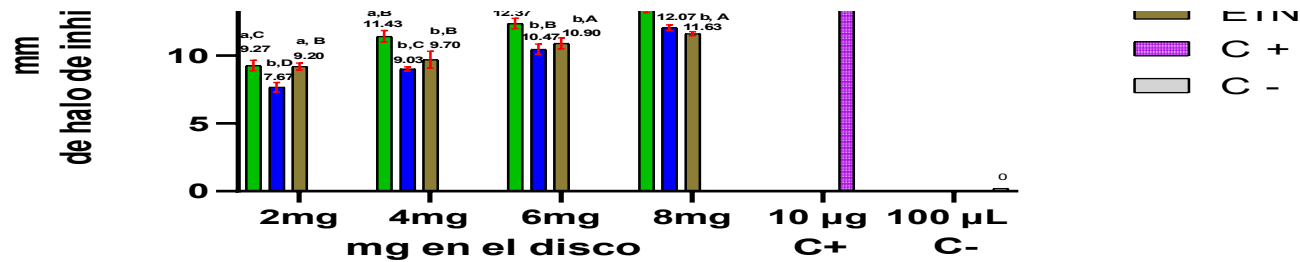


Figura 36. Comparación de los mm del halo de Inhibición de *Escherichia coli* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias de los mm de inhibición \pm DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de Nurite contra *Escherichia coli* respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$) (entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la columna (mismo extracto a diferentes concentraciones). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido y C+= Control positivo.

En la Tabla 32 se muestra el porcentaje de inhibición de los halos generados por los extractos de nurite en la cepa de *Escherichia coli* respecto al control positivo (gentamicina 10 µg/disco) donde se aprecia que a ninguna concentración los extractos fueron mayores al control. A 8 mg/disco se obtuvo el de mayor porcentaje de inhibición para los tres extractos ya que se observa que a medida que incrementa la concentración su porcentaje de inhibición es mayor. A esta concentración el mejor extracto fue EHN el cual presentó un 76.20 ± 1.43 %, y el menos eficaz fue el ETN con un 65.99 ± 0.87 %, sin embargo, no existió diferencia significativa con EHTN 68.44 ± 1.18 %.

Cabe resaltar que el control + (C+) sigue siendo mejor que los extractos evaluados ya que se empleó únicamente 10 µg en el disco. Para considerar una actividad antimicrobiana importante el % de inhibición de los extractos o sus fracciones debe ser >70%, intermedia entre el 50 y 70% y baja cuando es <50% (Navarrete et al 2020; Ramírez y Díaz, 2007). Acorde a este criterio los extractos evaluados a 2mg el EHN y ETN tuvo una inhibición intermedia y el EHTN una inhibición baja. En 4 mg todos los extractos presentaron inhibición intermedia. En 6 mg y 8 mg el EHN presentó inhibición alta y EHTN ETN inhibición intermedia.

Tabla 32. Comparación del porcentaje de Inhibición de *Escherichia coli* con respecto a Gentamicina (Control +) de los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

mg del extracto en disco	% del halo de inhibición EHN al 50% DMSO/agua	% del halo de inhibición EHTN al 50% DMSO/agua	% del halo de inhibición ETN al 50% DMSO/agua
2	52.56 ± 2.15 ^{aC}	43.49 ± 1.99 ^{bD}	52.18 ± 1.50 ^{aB}
4	64.85 ± 2.36 ^{aB}	51.24 ± 0.87 ^{bC}	55.02 ± 3.54 ^{bB}
6	70.15 ± 2.15 ^{aB}	59.37 ± 2.15 ^{bB}	61.83 ± 2.27 ^{bA}
8	76.20 ± 1.43 ^{aA}	68.44 ± 1.18 ^{bA}	65.99 ± 0.87 ^{bA}
Gentamicina 10 µg	$17.63 \pm 0.15\text{mm} = 100\%$		

(Control +)	
-------------	--

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias de los porcentajes de inhibición \pm DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de Nurite contra *Escherichia coli* respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$) (entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre la columna (mismo extracto a diferentes concentraciones). Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido y C+= Control positivo.

8.4.2.3 Comparación de los resultados de los halos de inhibición de *S. aureus* y *E. coli*

En la Tabla 33 se muestra la comparación de los mm de halo de inhibición presentados en las cepas de estudio *S. aureus* y *E. coli* con los extractos de *Clinopodium macrostemum*. A 2 mg/disco la mayor inhibición fue la de EHTN con la cepa de *S. aureus* (11.47 ± 0.23 mm) y la menor inhibición fue la de *E. coli* con el mismo extracto (7.67 ± 0.35 mm). A 4 mg/disco la mayor inhibición fue la de EHN con la cepa de *S. aureus* (14.20 ± 0.26 mm) y la menor inhibición fue la de *E. coli* con EHTN y ETN con el cual no hubo diferencias significativas (9.03 ± 0.15 y 9.70 ± 0.62 mm respectivamente). A 6mg/disco la mayor inhibición fue la de EHN con la cepa de *S. aureus* (15.37 ± 0.32 mm) y la menor inhibición fue la de *E. coli* con EHTN y ETN con el cual no hubo diferencias significativas (10.47 ± 0.38 y 10.90 ± 0.40 mm). A 8mg/disco la mayor inhibición fue la de EHN con la cepa de *S. aureus* (17.43 ± 0.25 mm) y la menor inhibición fue la de *E. coli* con ETN y EHTN con el cual no hubo diferencias significativas (11.63 ± 0.15 y 12.07 ± 0.21). Dentro de las pruebas con el EHN el mayor halo de inhibición fue a la concentración de 8mg/disco para la cepa de *S. aureus* (17.43 ± 0.25 mm) y el menor fue el de 2mg/disco (8.73 ± 0.68 mm) para la misma cepa y a la misma concentración con la cepa de *E. coli* (9.27 ± 0.38 mm) no existió diferencia significativa. Dentro de las pruebas con el EHTN el mayor halo de inhibición fue a la concentración de 8 mg/disco (16.63 ± 0.15 mm) con la cepa de *S. aureus* y el menor halo de inhibición fue a la concentración de 2 mg/disco con la cepa de *E. coli* (7.67 ± 0.35 mm). Dentro de las pruebas con el ETN el mayor halo de inhibición fue a la concentración de 8 mg/disco para la cepa de *S. aureus* (14.17 ± 0.31 mm) y el menor halo de inhibición fue presentado en la cepa de *E. coli* a 2mg/disco (9.20 ± 0.26 mm) aunque no existió diferencia significativa a 4 mg/disco en la misma cepa (9.70 ± 0.62). Como se puede apreciar, por esta técnica se obtuvieron mayores halos de inhibición con los 3 extractos evaluados con la bacteria Gram positiva (*S. aureus*). Esto se esperaba ya que se sabe que generalmente las bacterias Gram-positivas son más susceptibles a los antimicrobianos que las Gram-negativas debido a la configuración de su

pared celular la cual en el caso de la Gram-positiva no presenta capa externa de fosfolípidos dejando la capa de peptidoglucano expuesta (Nazzaro *et al.*, 2013). Este efecto se observó en el trabajo de Khaled-Khodja *et al.* (2014) al utilizar como estándar ácido gálico y tánico presentando 37.67 ± 3.30 y 27.67 ± 3.09 mm sobre la cepa de *S. aureus* y sobre *E. coli* 16.33 ± 0.94 y 19.67 ± 3.77 mm respectivamente, pero resulta que con los extractos metanólicos de hojas de *lamiáceas* (*Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium*, y *Teucrium polium*) fue mayor la inhibición sobre la bacteria Gram-negativa en comparación a la Gram-positiva.

Tabla 33. Comparación de los resultados de los mm de inhibición de *S. aureus* y *E. coli* con los extractos de *Clinopodium macrostemum*.

mg del extracto en disco	mm del halo de inhibición EHN		mm del halo de inhibición EHTN		mm del halo de inhibición ETN	
	<i>S. a</i>	<i>E. c</i>	<i>S. a</i>	<i>E. c</i>	<i>S. a</i>	<i>E. c</i>
2	8.73 ± 0.68 ^{cF}	9.27 ± 0.38 ^{cF}	11.47 ± 0.23 ^{aD}	7.67 ± 0.35 ^{dG}	10.36 ± 0.15 ^{bEF}	9.20 ± 0.26 ^{cG}
4	14.20 ± 0.26 ^{aC}	11.43 ± 0.42 ^{cE}	13.07 ± 0.25 ^{bC}	9.03 ± 0.15 ^{dF}	11.80 ± 0.10 ^{cC}	9.70 ± 0.62 ^{dFG}
6	15.37 ± 0.32 ^{aB}	12.37 ± 0.38 ^{cDE}	14.17 ± 0.12 ^{bB}	10.47 ± 0.38 ^{dE}	12.73 ± 0.15 ^{cB}	10.90 ± 0.40 ^{dDE}
8	17.43 ± 0.25 ^{aA}	13.43 ± 0.25 ^{dCD}	16.63 ± 0.15 ^{bA}	12.07 ± 0.21 ^{eD}	14.17 ± 0.31 ^{cA}	11.63 ± 0.15 ^{eCD}
S.a C+	13.93 ± 0.31 mm ^b					
E.c C+	17.63 ± 0.15 mm ^a					

ANOVA 1 vía (1 factor) y prueba post hoc de Tukey. Los valores son medias de los mm de inhibición \pm DE (desviación estándar) (n=3) de los extractos de Nurite contra *Escherichia coli* (*E. c*) y *Staphylococcus aureus* (*S. a*) respecto al control + (Gentamicina). Medias con una letra minúscula diferente indican diferencia significativa entre filas ($p \leq 0.05$) (entre los diferentes extractos a la misma concentración) y las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el mismo extracto a diferentes concentraciones. Abreviaturas: EHN = Extracto de hojas de Nurite, EHTN = Extracto de hojas y tallos de Nurite, ETN = Extracto de tallo de Nurite, DMSO=Dimetilsulfóxido, C+= Control positivo gentamicina a 10 μ g.

8.4.3 Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Aunque se haya calculado la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas por el método de *Kirby-Bauer* resulta esta determinación en el ámbito de la seguridad alimentaria insuficiente ya que la CMI nos dice qué es la concentración que tiene un antimicrobiano para ejercer la inhibición que impida el crecimiento de un microorganismo, sin especificar, que a esta concentración elimina o no al microorganismo. Por tal motivo se busca la capacidad bactericida de un antimicrobiano que en este caso lo elimine por completo. Para este término existe lo que se llama Concentración Mínima Bactericida (CMB) la cual es la concentración de un antimicrobiano que elimina el 99.99% del inóculo original, lo que equivale a una disminución de 3 logaritmos decimales (Klančnik et al., 2010; Navarrete, 2024, Rivas y Pérez, 2020,). Con la turbidez en un medio líquido, no basta para saber hasta cuando no habrá desarrollo del microorganismo, y más cuando los antimicrobianos que en este caso son extractos etanólicos y que presentan pigmentación o color, será difícil observar el desarrollo de este, por lo que se debe de colocar en medio sólido para corroborar la ausencia del microorganismo.

8.4.3.1 CMB de *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 34 y Figura 37 se observa el estudio realizado para la CMB de los extractos de nurite respecto a *Staphylococcus aureus*, donde se aprecia que EHN a concentración de 225 mg/mL evitó el desarrollo de colonias del microorganismo, por lo que podemos decir que ha eliminado el 99.99% del inóculo original estableciendo así la concentración mínima bactericida (CMB). Para EHTN y ETN no fué posible establecer la CMB ya que a 225 mg/mL eran visibles los desarrollos de las colonias por lo tanto su concentración bactericida debe de ser mayor (>225mg/mL). Cabe mencionar que en todos los casos a medida que se fue aumentando la concentración, disminuye el número de colonias. En un artículo donde se menciona la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos metanólicos de hojas la misma familia que el Nurite (*Lamiacea*): *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium*

y *Teucrium polium* presentaron concentraciones de > 50, 20, 12.2 y 14 mg/mL respectivamente. Estas concentraciones al compararlas con EHN (225 mg/mL) resultan menores, pero cabe destacar que nuestra cepa fue resistente a ampicilina y con los aminoglucósidos tuvo una susceptibilidad intermedia por lo que posiblemente la bacteria desarrolle mecanismos de resistencia que den lugar a aumentar la concentración para lograr su CMB. Cabe resaltar que en el artículo comparado realizan de igual manera las diluciones seriadas con el microorganismo y los extractos de las plantas para después tomar alícuotas y ver su desarrollo en placa y acorde a la ausencia de crecimiento determinaron las concentraciones (Khaled-Khodja *et al.*, 2014).

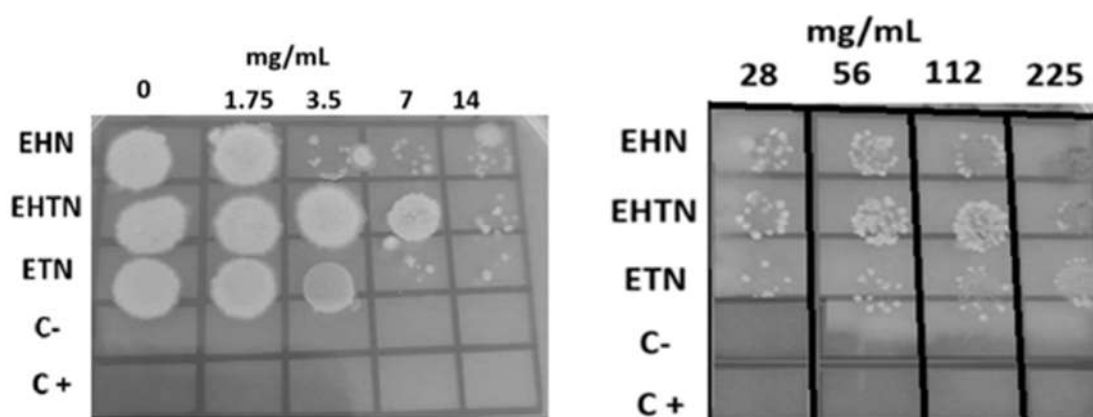


Figura 37. CMB de *Staphylococcus aureus* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Tabla 34. CMB de *Staphylococcus aureus* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Concentración mg/mL	0	1.75	3.5	7	14	28	56	112	225
EHN	+	+	+	+	+	+	+	+	-
EHTN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ETN	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nota. - + (presencia bacteriana), - (ausencia bacteriana).

8.4.3.2 CMB de *Escherichia coli*

En la Tabla 35 y en la Figura 38 se observa el estudio realizado para la CMB de los extractos de Nurite respecto a *Escherichia coli*, donde se aprecia que EHTN a la concentración de 7

mg/mL evitó el desarrollo de colonias del microorganismo. EHN y ETN a la concentración de 14 mg/mL evitó el desarrollo de colonias. Podemos decir que se encontró la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos ya que han eliminado el 99.99% del inóculo original. En un artículo donde se menciona la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos metanólicos de hojas la misma familia que el Nurite (*Lamiacea*): *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium* y *Teucrium polium* presentaron concentraciones de 17.1, 0.9, 1.5 y 13 mg/mL respectivamente. Al comparar las concentraciones de *Marrubium vulgare* y *Mentha pulegium* con los extractos de Nurite se observa que fueron menores. Al comparar con *Teucrium polium* con los extractos se aprecia que EHTN fue menor y con EHN y ETN fue mayor por 1 mg/mL. Al comparar con *Ajuga iva* el EHTN fue menor, así como también fueron menores EHN y ETN, pero solo por 0.1 mg/mL. Cabe resaltar que en el artículo comparado realizan de igual manera las diluciones seriadas con el microorganismo y los extractos de las plantas para después tomar alícuotas y ver el desarrollo y/o ausencia en la placa y acorde a la ausencia de crecimiento determinar las concentraciones (Khaled-Khodja *et al.*, 2014).

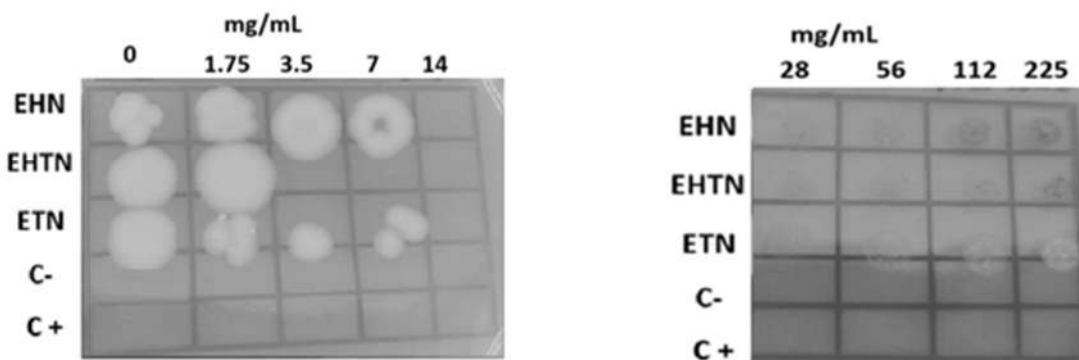


Figura 38. CMB de *Escherichia coli* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Concentración mg	0	1.75	3.5	7	14	28	56	112	225
EHN	+	+	+	+	-	-	-	-	-
EHTN	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ETN	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 35. CMB de *Escherichia coli* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Nota. - + (presencia bacteriana), - (ausencia bacteriana).

8.4.3.3 *Discusión general de la Evaluación de la inhibición de Staphylococcus aureus y Escherichia coli*

En la Tabla 36 se muestra la comparación de los resultados de las dos técnicas utilizadas para medir la sensibilidad bacteriana de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con extractos de nurite. Con la técnica de *kirby bouer* se aprecia que *Staphylococcus aureus* era más sensible a los extractos que *Escherichia coli*, pero al hacer la prueba de CMB fue más sensible esta que *S. aureus*. Este efecto se aprecia con los extractos de las hojas de *lamiáceas* de *Ajuga iva*, *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium* y *Teucrium polium* los cuales tuvieron mayor sensibilidad respecto a *Escherichia coli* en sus resultados al notar la ausencia de crecimiento en placa, presentando valores de 17.1, 0.9, 1.5 y 13 mg/mL respectivamente y para *Staphylococcus aureus* >50, 20, 12.2 y 14 mg/mL. Cabe resaltar que en la prueba de *kirby bouer* las plantas *Marrubium vulgare*, *Mentha pulegium* y *Teucrium polium* tuvieron mayor sensibilidad de igual manera para la cepa Gram-negativa (Khaled-Khodja *et al.*, 2014). Esto no era esperado ya que se sabe que generalmente las bacterias Gram-positivas son más susceptibles a los antimicrobianos que las Gram-negativas que son más resistentes, esto se debe a que las bacterias gram- negativas además de su pared celular de peptidoglicano tienen una membrana externa conformada de fosfolípidos los cuales permanecen unidos por lipopolisacáridos (LPS) haciendo de esto el “quid” lo que define, por qué este tipo de bacterias son menos susceptibles a los antimicrobianos (Nazzaro *et al.*, 2013). En esta investigación al conocer que *S. aureus* fue resistente a ampicilina nos da una idea de que la cepa pudiera tener algún mecanismo de defensa haciéndola más resistente que la cepa de *E. coli* evidenciando esto, con la cantidad de extracto necesario para su inhibición.

En *Staphylococcus aureus* al observar dicha inhibición en las dos técnicas se puede inferir que la sepa fue más susceptible a los compuestos del EHN el cual acorde a las pruebas antioxidantes pudiera contener más compuestos hidrofílicos capaces de atravesar la pared celular de peptidoglicano de la bacteria Gram positiva.

En *Escherichia coli* El EHN al contener mayor contenido de compuestos hidrofílicos pudiera difundir mejor sus metabolitos en medio sólido y el EHTN en la prueba de macrodilución

pudo haber presentado sinergismos con los metabolitos de la hoja y el tallo. Cabe resaltar que el ETN a 7 mg/mL presenta menor desarrollo del MO que EHN por lo que se puede inferir que los compuestos lipofílicos del tallo de nurite fueron más susceptibles que los compuestos de hoja hidrofílicos.

Tabla 36. Resultados de la Prueba Kirby-Bouer y CMB de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con extractos de *Clinopodium macrostemum*.

Extracto	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	mm del halo de inhibición a 8mg/disco	CMB (mg/mL)	mm del halo de inhibición a 8mg/disco	CMB (mg/mL)
EHN	17.43 ± 0.25	225	13.43 ± 0.25	14
EHTN	16.63 ± 0.15	>225	12.07 ± 0.21	7
ETN	14.17 ± 0.31	>225	11.63 ± 0.15	14

9. Conclusiones

- Los extractos de nurite contienen compuestos con capacidad antioxidante, el extracto de hoja de nurite (EHN) presentó mayor contenido de fenoles, flavonoides y terpenos totales, así como la mejor respuesta antioxidante respecto a ABTS y FRAP. También, el mismo tratamiento en la concentración mínima bactericida (CMB) mostró mayor y mejor inhibición antimicrobiana sobre la cepa de *S. aureus*, mientras que con el extracto de hoja y tallo de nurite (EHTN) se observó mayor inhibición ante *E. Coli*.
- Se sugiere realizar un ensayo biodirigido, realizando una serie de fraccionamientos con diferentes solventes para determinar que compuestos bioactivos del nurite (*Clinopodium macrostemum*) son los responsables de la capacidad antioxidante e inhibición antimicrobiana.
- Los resultados de esta investigación sugieren como alternativa el uso de esta planta en la industria alimentaria y farmacéutica.

10. Referencias

1. Aguilar, J. (2002). Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* var. *Laevigata*. Tesis de doctorado. Área de Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Colima. Tecomán Colima, México. 140 p.
2. Aguilar, J. (2015). Estudios básicos sobre el te nurite (*satureja macrostema*). https://www.academia.edu/11901621/Estudios_Basicos_sobre_el_Te_Nurite_Satureja_macrostema
3. Aiache, J., Aiache, S., y Renoux R. (1996). Introducción al estudio del medicamento. 2da edición Grupo Editorial: Masson. Barcelona España.
4. Alonso, N. (2009). *Actividad antioxidante de Satureja macrostema*. Tesis de maestría en ciencias en alimentos. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México D.F.
5. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S y Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. (1):183-98. Doi: 10.1039/b009171p.
6. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. 15th Edition The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Method: 920.39C
7. AOAC. (2000). Official Methods of Analysis. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods: 934.01 y 923.03.
8. Arnao, M., Cano, A., Acosta, M., (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry* 73, 239-244. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)
9. Aziz, N.A., Bux, H., Amir, Z.M., Zulfiqar, A.M., Iqbal, A., Roomi, S., Muhammad, I. y Hussain, S.S. (2012). Antimicrobial and antioxidant activities of Mimosaceae plants; *Acacia modesta* Wall (Phulai), *Prosopis cineraria* (Linn.) and *Prosopis juliflora* (Swartz). *Journal of Medicinal Plants Research*. 15: 2962- 2970. Doi: 10.5897/JMPR11.1349
10. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475. Doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
11. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. Doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106

12. Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud* 10, 2, 41-53. ISSN: 1136-4815.
13. Barbieri, N., Costamagna, M., y Gilabert, M. (2016). “Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from la Rioja province,” *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 1, pp. 168–173. Doi: 10.3109/13880209.2015.1028077
14. Basavegowda, N. (2021). Synergistic antioxidant and antibacterial advantages of essential oils for food packaging applications. *Biomolecules*, 11(9), 1267. Doi: 10.3390/biom11091267
15. Beghdad, M. C., Benammar, C., Bensalah, F., Sabri, F.-Z., Belarbi, M., y Chemat, F. (2014). Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content in leaves, flowers, stems and seeds of mallow (*Malva sylvestris L.*) from Northwestern of Algeria. *Revista Africana de Biotecnología*, 13 (3), 486-491. Doi: 10.5897/AJB2013.12833.
16. Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A. y Alghooneh, A. (2018). Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 114: 225-232. Doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.004
17. Belkhir, M., Rebai, O., Dhaouadi, K., Sioud, B., Amri, M. y Sami, F. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian azarole (*Crataegus azarolus L.*) leaves and fruit pulp/ peel polyphenolic extracts. *International Journal of Food Properties*. 16: 1380-1393. Doi: 10.1080/10942912.2011.586080
18. Bello, G. (1993). Plantas útiles no maderables de la Sierra Purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México. Folleto Técnico No 10. 115
19. Bello, G., Molina T., Calderón M., García Ch., Salgado R. (2006). Propiedades antimicrobianas y análisis fitoquímicos de seis plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. 2º congreso de investigación científica. UMSNH, Morelia, Michoacán, México
20. Benzie I., y Strain J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *J. Anal. Biochem.* 239, 70-76. Doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

21. Beuchat, L. y Golden, D. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43(1): 134-142
22. Bilia, A., Scalise, L., Bergonzi, M., y Vincieri, F. (2004). Analysis of kavalactones from piper methysticum (kava-kava). *Journal of Chromatography B.* 812: p. 213-214. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.07.038>
23. Boligon, A., Machado, M., y Athayde, M. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Revista Medicinal chemistry*, 4(7), 517-522. Doi:10.4172/21610444.1000188
24. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
25. C, akir, A., Mavi, A., Kazaz, C., Yildirim, A., Küfrevio~glu, O. I., (2006). Antioxidant activities of the extracts and components of *Teucrium orientale* L. var. *orientale*. *Turk. J.Chem.* 30, 483–494. <https://journals.tubitak.gov.tr/chem/vol30/iss4/9>
26. Calvo, J. y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 27(1):44–52. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
27. Camina, J., Dambolena, J., Zygadlo, J., y Ashworth, L. (2018). Composición química del aceite esencial de tricomas glandulares peltados en hojas y flores de *Lepechinia floribunda* (Lamiaceae). *Boletín De La Sociedad Argentina De Botánica*, 53(3), 375-384. doi: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v53.n3.21312>
28. Canosa, M. (2009). Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Tesis. Universidad Santiago de Compostela, España.
29. Cantino, P. y Wagstaff, S. (1998). A reexamination of North American *Satureja* s.l. (Lamiaceae) in light of molecular evidence. *Brittonia* 50: 63-70. Doi: <https://doi.org/10.2307/2807719>.
30. Carbajal, J., Salmerón, B., Gama M., & Galindo, G. (2023). Actividad antioxidante y antimicrobiana del Nurite (*Satureja Macrostema* (Benth), Briq). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(1), 425-444. Doi: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i1.4402.

31. Carreón-Abud, Y., Torres-Martínez, R., Farfán-Soto, B., Hernández-García, A., Ríos-Chávez, P., Bello-González, M. Á., Martínez-Trujillo, M., & Salgado-Garciglia, R. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases the content of volatile terpenes and plant performance in *Satureja macrostema* (Benth.) Briq. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(4), 273-279. ISSN 0717 7917.
32. Chambers, H., DeLeo, F. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7, 629–641 (2009). Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>.
33. Chamnanthongpiwan, M. (2020). PHARMACOGNOSTIC SPECIFICATION AND ROSMARINIC ACID CONTENT OF MENTHA CORDIFOLIA LEAVES AND STEMS IN THAILAND. (Tesis de maestría en Salud Pública, Universidad de Chulalongkorn). <https://pharmacognostic-specification-and-rosmarinic-acid-content-of-2sdtcu9k.pdf>.
34. Chang, C., y San Lin. C. (2012) Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and Neuroprotective Effect of *Terminalia chebula* Retzius Extracts. Hindawi Publishing Corporation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(4),1-7. Doi:10.1155/2012/125247.
35. Chang, Ch-Ch., Yang, M-H., When, H-M., Chern, J-Ch. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and drug Analysis*. 10:178-182. Doi: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.
36. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, et al. (2002). Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci*. 63: 1161-1168. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00332-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00332-1).
37. CLSI. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M 100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
38. Córdova-Zea, S., Marcillo-Indacochea, X., y Lucas-Parrales, E. (2023). Infecciones del tracto genitourinario asociadas a *Escherichia coli*: epidemiología en Latinoamérica. *MQR Investig*, 7(1),309–329. Doi: <https://doi.org/10.56048/MQR20225.7.1.2023.309-329>

39. Crombie, W. (1958). Fatty Acids in Chloroplasts and Leaves. *Journal of Experimental Botany*, 9(2):254-261. Doi: 10.1093/JXB/9.2.254
40. Dai, J., Mumper, R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15, 7313–7352. Doi: 10.3390/molecules15107313
41. Delfin, M. (2015). Nurite una planta medicinal michoacana.historiacocina. <https://www.historiacocina.com/es/nurite>
42. Draughon, F. (2004). Use of botanical as bio preservatives in food. *Food Technology*. 58(2): 20-28.
43. Duda-Chodak, A. (2012). The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 63(5), 497–503. Doi: <https://www.jpp.krakow.pl/>
44. Escasos, F., Martínez, J. y Planelló, M. (2010). Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal. Pearson. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosbasicosdeFisiologiavegetalyanimal.pdf>.
45. Fernández, D. y Ordóñez, L. (2021). Detección de escherichia coli y salmonella spp en carne de res distribuida en diferentes expendios del municipio de Piendamó, Cauca. Tesis de Licenciatura. Universidad Antonio Nariño. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/6121>.
46. Fulgencio. 2013. Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (Nurite, Santa María y Toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis en Ciencias Biológicas en Biotecnología alimentaria. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de químico fármaco biología. Morelia Michoacán, México. 27-33.
47. García, L (2024). *Obtención del extracto de jícama (Smallanthus Sonchifolius) para la elaboración de confites tipo masticable*. (Tesis de licenciatura Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba, Ecuador).
48. García, M.R. (2013). *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:117596>.

49. García-Reyes, E., Rojas-Olivos, A., Toral-Sánchez, E., y Cruz-García, G. (2023). Estudio etnobotánico y evaluación de la capacidad antioxidante de dos especies del género *Clinopodium* localizadas en el estado de Oaxaca, México. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 26, 577. Doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.577>
50. Gazzani, G., Papetti, A., Massolini, G., y Daglia, M., (1998). Antioxidant and Prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*46:4118. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf980300o>
51. González-Avilés, M., Álvarez, S. y Servín-Campuzano, H. (2014). Bases tecnológicas para el aprovechamiento de *Satureja macrostema* en la meseta purépecha, Michoacán. SSRN. <https://ssrn.com/abstract=2375407>.
52. Guadarrama-Flores, B., Buendía-González, L., Orozco Villafuerte, J., Estrada Zúñiga, M., y Cruz-Sosa, F. (2012). Producción en cultivos in vitro de los componentes principales del aceite esencial de *Lavandula Angustifolia*. *Revista latinoamericana de química*, 40(2), 65-74. Doi:http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037059432012000200002&lng=es&tlng=es.
53. Guitton, Y., Nicolè, F., Moja, S., Benabdelkader, T., Valot, N., Legrand, S., y Legendre, L. (2010). Lavender inflorescence: A model to study regulation of terpenes synthesis. *Plant Signaling & Behavior*, 5(6), 749–751. Doi: <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11704>
54. Günther, E. (1948). *The Essential Oils*. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA.
55. Gupta, D., (2015). “Methods for determination of antioxidant capacity: a review,” *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 6, no. 2, pp. 546–566. Doi: <http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232>.
56. Hari Om, S., Samiksha, P., Naseer, M., Ganesh, P. (2021). Variation for caffeic acid and phenolic content in different plant parts of *Solanum xanthocarpum* Schrad. and Wendl. – a commercially important dashmool species. *Clinical Phytoscience*, 7(1):1-8. Doi: 10.1186/S40816-021-00286-0.

57. Hillbay, R., Chamorro, S., González, M. y Palacios, T. (2016), Reingeniería en los procesos de secado, molienda y tamizado de plantas aromáticas para mejorar la calidad de los derivados, caso: Empresa JAMBI KIWA. FIGEMPA: Investigación y Desarrollo, 1(6). Doi: <https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.47>.
58. Himeno, S., Azuma, W., Gyokusen, K., Roaki-Ishii, H. (2017) Leaf water maintains daytime transpiration in young *Cryptomeria japonica* trees, *Tree Physiology*, 37, (10), 1394–1403. Doi: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx056>
59. Ifeanacho, M., Ikewuchi, C. y Ikewuchi, J. (2017). Investigation of the profile of phenolic compounds in the leaves and stems of *Pandiaka heudelotii* using gas chromatography coupled with flame ionization detector. *Food Sci Nutr*, 5:646–652. Doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.443>
60. Karamac, M., Kósinska, A., Pegg, R.B. (2005), Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition sciences*. 14/55:165-170. ISSN: 1230-0322.
61. Katalinic, V., Smole, M.S., Generalic, I., Skroza, D., Ljubenkovic, I. y Klančnik, A. (2013). Phenolic profile, antioxidant capacity and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties*. 1: 45-60. Doi: <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.526274>.
62. Khaled-Khodja, N., Boulekbache-Makhlouf, L., Madani, K. (2014) Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61, 41-48. Doi: [10.1016/j.indcrop.2014.06.037](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.037).
63. Khled, N., Boulekbache-Makhlouf, L. y Madani, K. (2013). Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae, *Industrial Crops and Products*; 52: 177-182. Doi: [10.1016/j.indcrop.2013.10.004](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.004).
64. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B. y Možina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts; *Journal of Microbiological Methods* 81:121-126. Doi: [10.1016/j.mimet.2010.02.004](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004).
65. Kong, A. S. Y., Maran, S., Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., Yang, S. K., Cheng, W. H., ... & Lai, K. S. (2022). Anti- and Pro-Oxidant Properties of Essential Oils against Antimicrobial Resistance. *Antioxidants*, 11(9), 1819. Doi: [10.3390/antiox11091819](https://doi.org/10.3390/antiox11091819).

66. López, M. (2008). Los aceites esenciales: Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 23(7), 88-91. ISSN 0212-0427X
67. Magalhães, L., Segundo, A., Reis, S., Lima, J. (2006). Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. *Analytica Chimica Acta* 558: 310-318. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.013>.
68. Marchal, A., Pons, A., Lavigne, V., & Dubourdieu, D. (2013). Contribution of oak wood ageing to the sweet perception of dry wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), 11–19. Doi: <https://doi.org/10.1111/ajgw.12013>.
69. Marler, T. E. (2023). Stem Carbohydrate Richness in Two Cycad Species. *Hortscience*, 58(7), 808–809. Doi: <https://doi.org/10.21273/hortsci17153-23>
70. Martín, G. (2018), Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9:1: 81-104. Doi: <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>.
71. Martines, E y Lira, L. (2010). *Análisis y aplicación de las expresiones del contenido de humedad en sólidos*. Simposio de Metrología (pp. 1- 4). Centro Nacional de Metrología.
72. Martínez, A. (1996). *Aceites esenciales*. *J. Nat. Prod*, 59(1), 77-79. https://www.medinformatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf.
73. Martínez, L., Ros, G, y Nieto, G. 2015. Situación actual del empleo de aditivos sintéticos en preparados cárnicos y nuevas tendencias para la sustitución de los mismos. *Eurocarne*. N°241. 49-55. ISSN: 1132-2675.
74. Martínez-Gordillo M; Fragoso-Martínez I.; García-Peña M.R.; Montiel O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo; *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 30-86. Doi: <https://doi.org/10.7550/rmb.30158>.
75. Martínez-Gordillo M; Martínez-Ambriz E.; García-Peña M.R.; Morón-Cantú E.A.; Fragoso-Martínez I., (2019). *Lamiaceae, Flora del Valle de Tehuacán Cuicatlán*. Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México; 233 pp. Doi:10.22201/ib.9786073017909e.2019.
76. Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M., González- Gallegos, J., Lara-Cabrera, S. y Zamudio, S. (2017).

Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806.
Doi: <https://doi.org/10.17129/botsci.1871>

77. Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M., González- Gallegos, J., Lara-Cabrera, S. y Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806. Doi: <https://doi.org/10.17129/botsci.1871>.

78. Masats. J. (2021). *Familia de las labiadas*. Botanical-Online. <https://www.botanical-online.com/botanica/familia-labiadas>.

79. Molyneux P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211-219.

80. Moncayo de Freitas, T. L. (2019). Calidad bacteriológica de carne molida que se comercializan en los mercados del distrito de Iquitos [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana]. Archivo digital. <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/6345>

81. Moraes, A., Victor, W., Fonseca, A y Duarte-Almeida, M. (2020). Validated spectrophotometric method for quantification of total triterpenes in plant matrices. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1),281-286. doi: 10.1007/s40199-020-00342-z.

82. Mouradov, A. y Spangenberg, G. (2014). Flavonoids: a metabolic network mediating plants adaptation to their real estate. *Frontiers in Plant Science*, 5:620-620. doi: 10.3389/FPLS.2014.00620

83. Muñoz R. (2012). *Diccionario Enciclopédico de la Gastronomía Mexicana. Nurite*. Ediciones Larousse S.A de C.V.

84. Navarrete, N., Pita-Ospina, E., Sánchez, R., Giraldo, S. y Bernal, M. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas, *NOVA*; 18 (33): 53-71. Doi 10.22490/24629448.3700.

85. Nazzaro, F., Fratianni, F., Martino., L, Coppola, R y Feo, V. (2013) Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* (6), 1451-1474; Doi:10.3390/ph6121451

86. NCCLS (2012). National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. M02-A11. 11th ed. Wayne, USA: NCCLS. 76 p.
87. Nielsen, S. (2003). Food Analysis Laboratory Manual; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.
88. NMX-F-083-1986 Norma Mexicana que establece el método para determinar la humedad en productos alimenticios.
89. NMX-Y-098-SCFI-2001 método de prueba para la determinación de la fibra cruda presente en ingredientes y alimentos terminados para animales.
90. NOM-F-68-S-1980 método de prueba para la determinación de Proteínas en alimentos.
91. OKDIARIO, (2019) Cómo hacer aceite esencial de menta. <https://okdiario.com/howto/como-hacer-aceite-esencial-menta-3605342>.
92. Ordoñez, M y Peñafiel, M. (2022) *Staphylococcus aureus* en cárnicos expendidos en el mercado 10 de agosto de la ciudad de cuenca, período septiembre 2022-enero 2023 [Tesis de Licenciatura, Universidad Católica de Cuenca]. <https://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/ucacue/14089/1/1.%20ANEXO%201.%20TESIS%20PDF.pdf>
93. Ortega-Ortega, T. y Vázquez-García, V. (2014). *Satureja macrostema*: situación ambiental, conocimiento local y roles de género. *Madera y Bosques*. Scielo. 20(2):71-86. Turner, B.L. (2008).
94. Taxonomic status of *Clinopodium macrostemum* (lamiaceae). *Phytologia* 411-413. ISSN 0031-9430.
95. Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA (2001) Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1161-1168. Doi: 10.1006/bbrc.2001.4705.
96. Pedrozo, J, 2004. Productos Naturales Vegetales: Generalidades Químicas, Papel Biológico, Importancia Industrial y Métodos de uso común en fitoquímica en cuadernillos No 1 y No 3. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá

97. Peredo, H., Palou, E. y López, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, Universidad de las Américas Puebla, México.
98. Perez R y Gallardo Y (2010). Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacognosy Magazine*, 22(6), 125-131. DOI: 10.4103/0973-1296.62901
99. Pérez, M. y Galiana, C. (2020). Manual de prácticas de microbiología (3^o edición). PSYLICOM.
100. Perez, R. y Gallardo, Y. (2010). Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacognosy Magazine*, 22(6), 125-131. Doi: 10.4103/0973-1296.62901
101. Plesiat, P.; Nikaido, H. Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* 1992, 6, 1323–1333. Doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb00853.x
102. Popović, S., Stjepanović, M., Grljušić, S., Čupić, T., y Tucak, M. (2001). *Protein and fiber contents in alfalfa leaves and stems*. 215–218. Doi: <https://www.bib.irb.hr/73097>
103. Pratyusha, S. (2022). Phenolic Compounds in the Plant Development and Defense: An Overview. 10.5772/intechopen. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.10287>.
104. Pripdeevech, P., Chumpolsri, W., Suttiarporn, P., Wongpornchai. (2010), The chemical composition and antioxidant activities of basil from Thailand using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of the Serbian Chemical society* 75: 1503-1513. Doi: 10.2298/JSC100203125P
105. Pullido R., Bravo L., Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay J. *Agric. Food Chem.* 48, 3396-3402. Doi: 10.1021/jf9913458.
106. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89. ISSN 1699-5198.

107. Ramírez LS, Díaz HE. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*. 2007; 1 (33): 397-400. ISSN: 0122-1701.
108. Ramírez-Rojo, M., Vargas-Sánchez, R., Torres-Martínez, B., Torrescano-Urrutia, G. y Sánchez-Escalante, A. (2018). Extractos de hojas de plantas para conservar la calidad de la carne y los productos cárnicos Frescos. Revisión. *Biotecnia*, 20 (3):155-164. ISSN: 1665-1456.
109. Reddy, N., y Yang, Y. (2015). *Fibers from Banana Pseudo-Stems* 25–27. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-662-45136-6_7
110. Riva, A. y Pérez, E. (2020). Evaluación de la actividad bactericida de un antimicrobiano de origen natural. Departamento de Tecnología de los Alimentos Centro de la Universidad Politécnica de Valencia. [https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/167484/P%C3%A9rez%3BRvas%20%20Evaluac%C3%B3n%20de%20la%20activdad%20bactercda%20de%20un%20antmcrobano%20de%20origen%20natural.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20Concentraci%C3%B3n%20M%C3%ADnima%20Bactericida%20\(CMB\)%20se%20define%20como%20la%20menor,habitualmente%20mediante%20t%C3%A9cnicas%20de%20cultivo.](https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/167484/P%C3%A9rez%3BRvas%20%20Evaluac%C3%B3n%20de%20la%20activdad%20bactercda%20de%20un%20antmcrobano%20de%20origen%20natural.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20Concentraci%C3%B3n%20M%C3%ADnima%20Bactericida%20(CMB)%20se%20define%20como%20la%20menor,habitualmente%20mediante%20t%C3%A9cnicas%20de%20cultivo.)
111. Rivas, B., Leal, I., Loaiza, L., Morillo, Y. y Colina, J. (2017). Phenolic Compounds and antioxidant activity in extracts of four Oregano species, *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 40(3), 134-142. ISSN 0254-0770.
112. Rivas, B., Leal, I., Loaiza, L., Morillo, Y., y Colina, J. (2017). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante en extractos de cuatro especies de orégano. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 40(3), 134-142. ISSN 0254-0770
113. Rodríguez PA, Arenas R. Hans. (2018). Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*;16(2):166-167. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=80715>.
114. Rodríguez, E. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170, ISSN 1665-0441.

115. Rodríguez, M., Alcaraz, L. y Real, S (2012). *Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas*. Edit. Centro de investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. La paz Baja California Sur, México. 38p.
116. Rojas E. (1996). *Vitaminas y acción antioxidante*. Ed por Merck.
117. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., 1a reimp.
118. Rzedowski, G. y Rzedowski, J. (2010). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. Edición digital: INECOL 2010
119. Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*. SAGE Publications. 8(3) Doi: <http://doi.org/10.1106/108201302026770>.
120. Shao-Wei, Hu., Kun-rui, Zhong., Yang, Jiaying., Lei, Su., Yan-Yan, Jiang., Bin, Liu. (2018). Study on difference of flavonoids content in stems and leaves of *Mentha Haplocalycis* Herba in different harvest periods. *China journal of Chinese materia medica*, 43(3):544-550. Doi: 10.19540/J.CNKI.CJCM.20180104.015.
121. Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem.* 112, 885–888. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.064>.
122. Sierra M, Barros R, Gómez P, Mejía A y Suarez D. (2018). *Productos Naturales: Metabolismo secundaria y aceites esenciales*. Edit. Fundación Universitaria Agraria de Colombia (UNIAGRARIA). Bogotá, Colombia.
123. Silva, L., Raposo, J., y Campos, L. (2018). “Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β -caroteno/ácido linoleico),” *Review Fitos*, vol. 12, no. 2, pp. 117–126. Doi: 10.5935/2446-4775.20180011.
124. Simões, C.B., Mendes, dC.S. y Guedes, A. (2010). Actividad antibacteriana in vitro de extractos brutos de especies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. *Revista Pan AmazSaude*. 1(2) 33-39. Doi: <https://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000200003>.

125. Simonetti, P., Pietta, P., & Testolin, G. (1997). Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1152–1155. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf960705d>.
126. Solati, Z., Jørgensen, U., Eriksen, J., y Søegaard, K. (2018). Estimation of extractable protein in botanical fractions of legume and grass species. *Grass and Forage Science*, 73(2), 572–581. Doi: <https://doi.org/10.1111/GFS.12325>
127. Steven L. Voelker, Frederick C. Meinzer, Where and when does stem cellulose $\delta^{18}\text{O}$ reflect a leaf water enrichment signal, *Tree Physiology*, 37 (5), 551–553. Doi: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx029>
128. Taiz, L y Zeiger, E (2006), *Fisiología Vegetal: La relajación de la tensión de la pared celular promueve la absorción de agua y la elongación celular*. (III). <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FisiologiaVegetalVolumenII%20espanhol.pdf>.
129. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins, B. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis* 19, 669-675. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
130. Thongsong, C., Davidson, P.M., Mahakarnchanakul, W. y Weiss, J. (2004). Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent- extracted spices. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 401- 406. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01605.x.
131. Torres – Martínez, R., García – Rodríguez, Y.M., Ríos – Chávez P., Saavedra – Molina A., López – Meza, J.E., Ochoa – Zarzosa, A. y Salgado – Garciglia, R (2018). Antioxidant Activity of the Essential Oil and its Major Terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.) Briq. *Pharmacogn. Mag* 13 (52), S875-S880. Doi: 10.4103/pm.pm_316_17
132. Tran, K. y Green, E. (2019). Assessing Yeast Cell Survival Following Hydrogen Peroxide Exposure, *Bio-protocol* 9:2. Doi 10.21769/BioProtoc.3149.
133. Turner, B. (2008). Taxonomic status of *Clinopodium macrostemun* (Lamiaceae). *Phytologia* 90(3):411-413. <https://dn720003.ca.archive.org/0/items/biostor-208564/biostor-208564.pdf>

134. Umafor (Unidad de Manejo Forestal Regional). (2009). Estudio Regional Forestal. Unidad de Manejo Forestal Regional No. 2012, Sierra Sur, Zimatlán, Sola de Vega, Valles Centrales, A.C. Oaxaca. 453 p.
135. Usanmaz, A., Kordali, S., Gûnes, A., Beyzi, E., Turan, M. y Ersoy, N. (2022). Variation in phenolic, antioxidant and vitamin amounts among some medicinal plants and investigation by PCA analysis: Lamiaceae family. 21(4):446-454. doi: 10.37360/blacpma.22.21.4.27.
136. Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol.* 56(3): 395–411. Doi: 10.1128/mr.56.3.395-411.1992.
137. Valencia, E., Martínez, H., García, M., Meléndez, E. y García M. (2019) Investigation of the Antibacterial Activity and Subacute Toxicity of a *Quercus crassifolia* Polyphenolic Bark Extract for its Potential Use in Functional Foods. *Journal of Food Science*. Vol. 84, Iss. 7, 1692- 1702. doi: 10.1111/1750-3841.14652.
138. Valladares, F. (2006). La disponibilidad de luz bajo el dosel de los bosques y matorrales ibéricos estimada mediante fotografía hemisférica. *Ecología* 20(1):11-30. ISSN. 0214-0896
139. Van Soest PJ. (1963). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J Offi Agric Chem*; 46: 829 - 835. Doi: <https://doi.org/10.1093/jaoac/73.4.491>
140. Vieitez, I., Maceiras, L., Jachmanián, I. y Alborés, S. (2018). Antioxidant and antibacterial activity of different extracts from herbs obtained by maceration or supercritical technology. *The Journal of Supercritical Fluids*. 133(1): 58-64. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.025>.
141. Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Cruz-Durán, R., y Lozoya-Gloria, E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 77(1): 741–747. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.050>.
142. Zheng, Y., Zhou, Y., Liang, Q., Chen, D., Guo, R., Xiong, C., Xu, X., Zhang, Z. y Huang, Z. (2017). Solvent effects on the intramolecular hydrogen-bond and antioxidative properties of apigenin: A DFT approach. *Dyes and Pigments*. 141(1): 179-187. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.02.021>.

29% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Fuentes principales

- 29%  Fuentes de Internet
- 17%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Anexo 2. Formato de declaración de originalidad y uso de inteligencia artificial

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas Área Temática: Biotecnología alimentaria.	
Título del trabajo	Determinación químico proximal, perfil fitoquímico, capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de nurite (<i>Clinopodium macrostemum</i> , Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze de Paracho de Verduzco, Michoacán, México	
	Nombre	Correo electrónico
Autores	Carlos Alberto Zomoza Caro	2251427a@umich.mx
Director	Rafael Zamora Vega	rafael.zamora@umich.mx
Codirector	Eréndira Valencia Avilés	erendira.valencia@umich.mx
Coordinador del programa	Martha Elena Pedraza Santos	martha.elena.pedraza@umich.mx

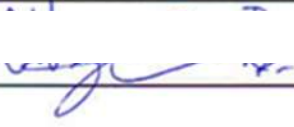
Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	Todo lo redacte yo conforme iba leyendo.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	No	Mi lengua nativa es el español.
Traducción a otra lengua	Si	Utilicé el traductor de google para textos donde no sabía cómo redactarlos en inglés.
Revisión y corrección de estilo	No	No lo utilice.
Análisis de datos	No	Los datos los analicé en excel y JMP
Búsqueda y organización de información	No	Utilice los buscadores básicos de Google, Google Scholar, pubmed y science direct.
Formateo de las referencias bibliográficas	No	Todas las Referencias las hice a mano acorde al formato APA 7ª edición.
Generación de contenido multimedia	No	Las tablas yo las traduje con Paint
Otro	No	No se aún utilizar las herramientas IA pero sería una buena opción para mejorar mi trabajo.

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Carlos Alberto Zornoza Caro 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán. 18/02/2025

Anexo 3. Determinación taxonómica



C. Carlos Alberto Zornoza Caro

Estudiante de Maestría
Programa Institucional de Ciencias Biológicas
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Por medio de la presente se CERTIFICA la determinación taxonómica de un ejemplar botánico herborizado, constituido por hojas y flores, el cual fue entregado por Usted al personal del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, el ejemplar cuenta con las características necesarias para formar parte de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM.

Después del análisis morfológico se cuenta con la documentación digital necesaria para registrar que el ejemplar pertenece a la especie: *Clinopodium macrostemum* (Moc. & Sessé ex Benth.) Kuntze

Cuyo nombre está tipificado correctamente y aceptado con dicha nomenclatura en la literatura y bases de datos científicas reconocidas actualmente.

Sin otro asunto más en particular me despido de Usted, reiterando nuestro compromiso de vinculación del Herbario EBUM con diversas dependencias que requieran nuestros servicios.

Morelia, Michoacán a 5 diciembre del 2022

ATENTAMENTE



Biól. Rosa Isabel Fuentes Chávez
Curadora de la Colección de Plantas Vasculares, Herbario EBUM
Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo