



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS -CIEP

**"Evaluación de la actividad antibacteriana de
derivados de naftoquinona, extracto
etanólico y aceite esencial de *Melissa
officinalis* contra *Clavibacter michiganensis*
subsp. *michiganensis* Cmm"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

L.Q. Linda Patricia Monreal Medrano

DIRECTORAS DE TESIS

Dra. DENISSE ATENEA DE LOERA CARRERA

Dra. Erika García Chávez



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P., MÉXICO

AGOSTO DE 2022

El Programa de Maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 000519, en el Nivel Consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 794124, No de CVU.1032099.

Extracción de aceite esencial y extractos de la planta se realizaron en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Síntesis de los compuestos se realizó en el Laboratorio de Fotoquímica y Síntesis perteneciente al Centro de Investigación y Estudios de Posgrado (CIEP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

El trabajo con plantas se realizó en el invernadero de la Facultad de Ingeniería del área Agroindustrial y en el laboratorio de Agrobiotecnología de Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Los análisis de espectroscopía de Infrarrojo se realizaron con colaboración del laboratorio de Fotocatálisis de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Las pruebas *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Enfermería-UASLP. Las mediciones de absorbancia se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la asesoría de la Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera, la Dra. Erika García Chávez y el Dr. Gerson Alonso Soto Peña.

El presente trabajo fue sometido a análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reportó un 15% de similitud.

Evaluación de la actividad antibacteriana de derivados de naftoquinona, extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Cmm”

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

ÍNDICE DE SIMILITUD



Evaluación antibacteriana de derivados de naftoquinona, extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por Monreal Medrano Linda Patricia se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme superarme una vez más.

A mis **Padres** por estar conmigo siempre, brindarme su apoyo incondicional y cuidar de mi cuando más lo necesité. especialmente a mi padre quién nunca ha permitido que el dinero sea una limitante para el cumplimiento de mis sueños.

A **Javier Cervantes**, mi compañero de vida. Gracias por todo el apoyo brindado en esta etapa y por cuidar de mi con mucho amor cuando más los requerí.

A **Cristina Arellano López**, gracias infinitas por estar y por todo lo que has hecho por mí, definitivamente este logro es tan tuyo como mío.

A mi directora, la **Dra. Denisse Atenea de Loera Carrera** por su guía, apoyo y enseñanza durante este proyecto. Y a manera personal, gracias por todo el soporte brindado, así como la amistad y el cariño incondicional otorgados. Gracias por nuevamente volver real lo que parecía inalcanzable.

A mis asesores, la **Dra. Erika García Chávez** y el **Dr. Gerson Alonso Soto Peña** por su guía, apoyo y todas las enseñanzas transmitidas durante este trabajo de investigación.

A la **Dra. Yolanda Terán Figueroa** por ser un rayo de luz en mi vida. Gracias por transmitirme sus valiosos conocimientos personal y profesionalmente.

Al grupo de investigación **IRAACH**, por todo su apoyo brindado en esta etapa. Especialmente a la **Dra. Gabriela Navarro**, por escucharme y brindarme sus valiosos consejos. A **Carely Arjona, Abrham de Loera, Alejandro Briones, Isabel Clark, y Alejandra Guevara** por brindarme apoyo y su valiosa amistad.

Al **M.C. Oswaldo Cárdenas** por el soporte técnico brindado durante este proyecto y por brindarme su amistad.

A **Cesar Corpus, Xitlalick García y Oscar Kasis**, mis hermanos académicos. Gracias por escucharme y guiarme cuando lo requerí y por brindarme su valiosa amistad.

A La **Dra. Bertha Irene Juárez Flores**, por compartir su conocimiento conmigo, guiarme y brindarme sus valiosos consejos.

A la **QFB. María Eugenia Reyna Ortega** por todo el soporte técnico brindado durante mi estancia en el IIZD. Gracias por el tiempo compartido, los consejos otorgados y su valiosa amistad.

A la alumna de servicio social **Andrea Vega** quién ayudo en la parte experimental de este proyecto.

A la **M.E. Perla Cristina Mayorga Colunga** y al Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la FCQ por el apoyo brindado para la elaboración de algunos experimentos.

Al **Dr. Rodolfo González Chávez** por el apoyo con reactivos y el soporte técnico otorgado durante la elaboración de los experimentos.

A mis amigos: **Ana Fraga, Jessica Meléndez, Jacqueline Martínez, Enrique Gómez, Zayra Montante, Fernanda Méndez, Dalia Briones, Johana Aguilar y Lizeth Terán** por apoyarme en esta etapa y seguir siendo parte de mi vida.

A **Belén Castillejos** (mi biché) y a **Diego Zapata** por traer alegría y color a mi vida además de apoyarme personal y profesionalmente, sin importar a donde nos lleve la vida siempre los llevare con agradecimiento y gran cariño en mi corazón.

A **Montserrat Medrano, Liliana Dimas, Hugo Medina, Luis Cervantes, Nancy Sosa y Enrique Hernández**. Por acompañarme en esta etapa y brindarme siempre su apoyo y cariño incondicional.

RESUMEN

Actualmente el jitomate es la hortaliza de mayor relevancia en México debido a la gran derrama económica que representa para los productores y comercializadores. Sin embargo, este cultivo se ve altamente afectado por el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). Hasta nuestro conocimiento no existen tratamientos que sean efectivos, ni cultivares comerciales resistentes. Razón por la cual surge la necesidad de explorar y validar alternativas sustentables para la producción de jitomate. Basados en diversas investigaciones se propusieron como posible solución contra Cmm seis compuestos derivados de naftoquinona y el aceite esencial y extracto etanólico de *Melissa officinalis*, los cuales se evaluaron mediante pruebas *in vitro*.

Los estudios *in vitro* mostraron que tanto los compuestos sintetizados, excepto AF1, al igual que el extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis* tienen actividad inhibitoria contra Cmm.

Palabras clave: naftoquinonas, *Melissa officinalis*, aceite esencial, extracto etanólico, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

ABSTRACT

Nowadays tomato is the most relevant vegetable in Mexico due to the great economic impact it represents for producers and marketers. However, this crop is highly affected by the actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm). To our knowledge, there are no effective treatments or resistant commercial cultivars. Reason why the need arises to explore and validate sustainable alternatives for tomato production. Based on various investigations, six compounds derived from naphthoquinone and the essential oil and ethanolic extract of *Melissa officinalis* were proposed as a possible solution against Cmm, which were evaluated through in vitro tests.

In vitro studies showed that both the synthesized compounds, except AF1, as well as the ethanolic extract and essential oil of *Melissa officinalis*, have inhibitory activity against Cmm.

Keywords: naphthoquinones, *Melissa officinalis*, essential oil, ethanolic extract, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> L)	4
2.1.2. Fitopatógenos que afectan al jitomate	5
2.2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	6
2.2.1. Ciclo de vida de Cmm	6
2.2.2. Cáncer bacteriano	7
2.2.3. Detección y tratamientos	8
2.3. Naftoquinonas	11
2.3.1. Actividad biológica de las naftoquinonas	11
2.3.2. Actividad antibacteriana de las naftoquinonas	12
2.4. <i>Melissa officinalis</i>	15
2.4.1. Actividad antibacteriana de <i>Melissa officinalis</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos específicos	19
5. HIPÓTESIS	20
6. METODOLOGÍA	21
6.1. Reactivos	21
6.2. Materiales y equipos	21
6.3. Síntesis química	22

6.3.1.	Síntesis de derivados aminados de naftoquinona	22
6.3.2.	Síntesis de derivados de aminoácido naftoquinona.....	23
6.4.	Obtención del aceite esencial y el extracto etanólico de MO	24
6.4.1.	Recolección del material vegetal	24
6.4.2.	Preparación del material vegetal	25
6.4.2.1.	Muestra para los extractos	25
6.4.2.2.	Muestra para aceite esencial.....	25
6.4.3.	Extracción etanólica	25
6.4.4.	Extracción del aceite esencial	25
6.4.4.1.	Método de arrastre de vapor	26
6.4.4.2.	Método de arrastre de vapor asistido por destilador	26
6.4.4.3.	Método de hidrodestilación asistida por microondas	27
6.4.5.	Recuperación de aceite esencial	28
6.5.	Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis (Cmm).....	28
6.5.1.	Cultivo bacteriano	28
6.5.2.	Determinación de la fitopatogenicidad de la cepa silvestre Cmm	29
	Diseño experimental	29
	Obtención de plántulas de jitomate	29
	Trasplante	29
	Preparación de solución nutritiva	30
	Preparación del inóculo	30
	Inoculación de la bacteria	30
	Detección de bacteria	31

6.5.3.	Determinación de la actividad antibacteriana por método de difusión en pozo.	32
6.5.3.1.	Tratamientos	32
6.5.3.2.	Preparación del inóculo.....	34
6.5.3.3.	Evaluación del efecto antimicrobiano	34
6.6.	Análisis estadístico.....	35
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1.	Síntesis de derivados de la 1,4-naftoquinona	37
7.1.1.	Caracterización estructural por Espectroscopia Infrarrojo	38
7.1.1.1.	2-((4-fluorofenil)amino))-1,4-naftoquinona, C1.....	39
7.1.1.2.	2-((2,4-difluorofenil)amino))-1,4-naftoquinona, C3.....	40
7.1.1.3.	Ácido 4-amino-2-((3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-4-oxobutanoico, AA1.....	41
7.1.1.3.1.	Ácido 4-amino-2-[(1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino]-4-oxobutanoico, AA2.....	42
7.1.1.3.2.	Ácido 2-((3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-3-fenilpropanoico, AF1	43
7.1.1.3.3.	Ácido 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-3-fenilpropanoico, AF2	44
7.2.	Obtención de aceite esencial	45
7.3.	Determinación de la fitopatogenicidad de Cmm	46
7.3.1.	Detección de Cmm en plantas infectadas	50
7.3.2.	Purificación de Cmm	52
7.4.	Determinación de actividad antibacteriana: método de difusión en pozo	52

7.4.1.	Derivados de naftoquinonas.....	53
7.4.1.1.	Análisis estadístico.....	53
	Compuesto 1	53
	Compuesto 3	55
	Compuesto AA1	57
	Compuesto AA2	59
	Compuesto AF1	61
	Compuesto AF2	63
7.4.2.	Extracto etanólico y aceite esencial de <i>Melissa officinalis</i>	64
7.4.2.1.	Análisis estadístico.....	64
8.	CONCLUSIONES	67
9.	PERSPECTIVAS DEL PROYECTO.....	69
10.	BIBLIOGRAFÍA	70
11.	ANEXOS	77
11.1.	Índice de figuras.....	77
11.2.	Índice de tablas.....	79
11.3.	Índice de gráficas	79
11.4.	Perfil fitoquímico de los extractos acuosos de <i>Melissa officinalis</i>	82
11.5.	Glosario.....	83

1. INTRODUCCIÓN

En México, una de las actividades económicas más importantes es la agricultura, ya que de esta depende la seguridad alimentaria de millones de personas. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), alrededor del 13% de la superficie territorial es utilizada para alguna actividad agrícola, cosechando un volumen de 268.4 millones de toneladas (SIAP, 2022).

Las principales hortalizas cultivadas son chile (149,602.30 ha), maíz (7,310,675.75 ha), papa (61,292.51 ha), cebolla (48,124.38 ha), tomate rojo (48,413.83 ha) y tomate de cáscara (40,856.00 ha) (SIAP, 2022).

Actualmente México es de los principales productores y exportadores a nivel mundial de tomate rojo o jitomate con una producción de alrededor de 3,079 mil toneladas promedio al año, entre los años 2011 y 2020 este hecho posicionó a nuestro país como el principal productor agropecuario de exportación de jitomate a EUA y le da la novena posición como productor a nivel mundial, tras un máximo histórico de producción de 3,370,827 toneladas (SIAP, 2021).

No obstante, existen factores como las enfermedades fitopatógenas que afectan en gran medida la producción, volviendo muy difícil mantener los rendimientos de esta, lo que trae como consecuencia un mercado variable e insostenible.

Uno de los fitopatógenos que más afectan los cultivos de jitomate rojo es el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate. Esta enfermedad fitopatógena limita la producción de jitomate a nivel nacional e internacional desde hace varios años (Guerrero *et al.*, 2017).

El cáncer del jitomate es una enfermedad agrícola cuya principal forma de diseminación es a través de semillas infectadas y por inadecuadas prácticas en el manejo del cultivo y su recolecta; principalmente en proceso del corte del fruto.

Una vez identificada una cosecha infectada, esta es sujeta a cuarentena internacional por parte de la Unión Europea (OEPP/EPPO, 2016), Estados Unidos de América (Mansfield *et al.*, 2012) y México (NOM-007-FITO-1995). Debido a su alta capacidad de diseminación de esta enfermedad, la quema de la cosecha en ocasiones es la única opción para poder controlarla, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas.

Hasta nuestro conocimiento no existen tratamientos que sean efectivos, ni cultivares comerciales resistentes a *Clavibacter*. Las principales medidas preventivas para disminuir la incidencia de la enfermedad incluyen: aplicaciones extensivas de antibióticos estreptomicina y CuSO_4 (con los riesgos ambientales inherentes), prácticas culturales entre los operarios, la desinfección de materiales y equipos, así como el uso de semillas certificadas y plántula sana (Sandoval, 2004), estos últimos representan insumos de alto costo.

Cabe mencionar que la resistencia a ciertos agentes antimicrobianos es ampliamente reconocida, esto se debe al uso indiscriminado y la ausencia de conocimiento sobre los mecanismos de acción de estos compuestos de acuerdo con la naturaleza biológica de la bacteria. En este contexto y a pesar de los métodos de prevención y control existentes, el riesgo de una infección posterior por Cmm es permanente. Es por ello, que surge la necesidad de explorar y validar alternativas sustentables para la producción de jitomate que permitan: a) la reducción/sustitución de agroquímicos, b) la promoción y salvaguarda de la salud de trabajadores y consumidores, c) el incremento en la productividad de los cultivos y d) la restauración/rehabilitación de suelos y ecosistemas.

En este sentido el uso de extractos vegetales y microbianos para el manejo de fitopatógenos representa una alternativa para las estrategias de manejo agroecológico.

Por otra parte, las naftoquinonas son compuestos que han mostrado diversas actividades biológicas, entre ellas antiviral, antifúngica, antibacteriana, e incluso anticancerígena, actividades que se suelen potencializar al adicionarse a otras

moléculas (López *et al.*, 2014). En particular, los derivados aminados incrementan la actividad biológica y disminuyen los efectos tóxicos en humanos, debido a la modulación de sus propiedades redox (Leyva *et al.*, 2017). Sin embargo, tanto para las naftoquinonas naturales como los derivados sintéticos no se ha reportado su acción contra el fitopatógeno Cmm, representando un nicho de oportunidad de estudio. Debido a que estos compuestos se encuentran presentes en plantas como nogal, cedro, plumbago, ébano, tronadora, entre otras, es posible que su uso como tratamiento resulte menos dañino que utilizar los agroquímicos convencionales.

Existen diversas plantas que hoy en día son empleadas en la medicina tradicional para tratar diversos malestares y enfermedades, como lo es *Melissa officinalis* (MO), también conocida como: la melisa, toronjil, limoncillo, hoja de limón, menta melisa, entre otros. Esta planta se destaca por su actividad como sedante, antihipertensivo, anti-alzheimer, antipirético, antiespasmódico, así como también se encuentran usos en tratamientos contra la tos, asma, bronquitis y diversos malestares del sistema gastrointestinal y nervioso (Shakeri *et al.*, 2016).

La actividad antimicrobiana de esta especie es bien reconocida, ya que se ha aplicado en heridas infecciosas, úlceras, llagas en la boca, dolor de garganta, herpes, rabia y diversas infecciones parasitarias (Shakeri *et al.*, 2016; Wölbling & Leonhardt, 1994). Se ha demostrado que la actividad antibacteriana, antihistamínica y antifúngica se debe a componentes como geranial, neral, (*E*) -anetol, (*E*) -cariofileno y citronelal presentes en el aceite esencial de *Melissa officinalis*.

Debido a sus propiedades y que tanto los compuestos derivados de naftoquinona como la planta *Melissa officinalis* no han sido estudiados contra bacterias fitopatógenas como es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) realizar el estudio de su actividad antibacteriana contra Cmm generará una posible solución de un problema importante en la agricultura.

2. ANTECEDENTES

2.1. Jitomate (*Lycopersicon esculentum* L)

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* L) (Figura 1A) es una planta herbácea de tallo largo y grueso. Tiene un sistema radicular axonomorfo profundo y poco ramificado. El tallo principal está formado de tallos secundarios compuestos de epidermis con pelos glandulares, corteza, cilindro vascular y tejido medular, por lo cual la planta no se sostiene por sí sola y es necesario sostenerla mediante tutores.

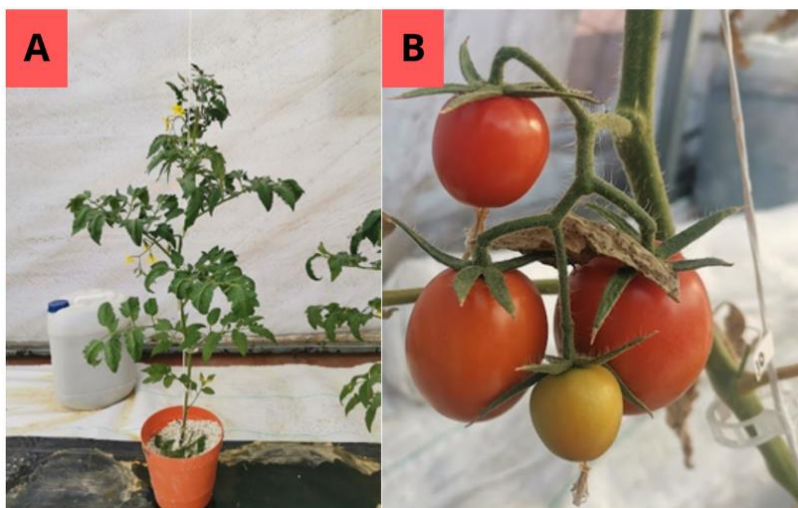


Figura 1. *Lycopersicon esculentum* L. A) Planta de jitomate y B) Fruto de jitomate

El producto (Figura 1B) es considerado la hortaliza número uno y es una baya bilocular, subesférica globosa muy colorida, con tonos que van del amarillento al rojo debido a la presencia de los pigmentos como licopeno y caroteno. Posee un sabor ligeramente ácido. (SIAP, 2021).

2.1.1. Generalidades y relevancia del cultivo de jitomate

Cada vez es mayor la demanda agroalimentaria a nivel mundial, esta hortaliza es fundamental en la dieta en nuestro país y su consumo per cápita ha ido al alza durante los últimos años. China es el principal productor y consumidor mundial. En México es la hortaliza de mayor producción con una producción promedio de 3 millones 371 mil toneladas, obteniendo la novena posición como productor mundial con 3 millones 442 mil toneladas en 2019 (SIAP, 2021).

En 2020, los principales productores fueron Sinaloa (684,333 ton), San Luis Potosí (380,175 ton) y Michoacán (248,499 ton). De las hortalizas que México exporta, el jitomate es la de mayor relevancia debido a la derrama económica que representa para los agricultores y comercializadores por una venta de poco más de 1 millón 650 toneladas por año, siendo Estados Unidos el principal cliente (SIAP, 2021).

2.1.2. Fitopatógenos que afectan al jitomate

Una de las razones por las que la producción de jitomate se ha visto mermada es debido a las enfermedades ocasionadas por diversos fitopatógenos como:

Hongos. Existen diversas especies de hongos entre las que encontramos: *Alternaria*, *Cladosporium* y *Stemphylium*, los cuales generan manchas foliares que pueden llegar hasta defoliación. *Phytophthora infestans* y *Alternaria solani* son causantes de los tizones foliares y posible muerte rápida del follaje de la planta. *Botrytis cinerea* (moho gris o pudrición gris) es un patógeno estimulado por la humedad y genera muerte del tejido foliar (Sandoval, 2004).

Virus. Los virus que se ha encontrado que afectan al jitomate son: Tomato Mosaic tobamovirus (ToMV), Tobacco Mosaic tobamovirus (TMV), Potato X potexvirus (PVX), Potato Y potexvirus (PVY), Cucumber Mosaic bromovirus (CMV), Alfalfa Mosaic bromovirus (AMV), Tomato spotted bonyavirus (TSWV) y Pepino dulce Mosaic potexvirus (PepMV). Los síntomas son variables, desde cambios en coloración normal

de los folíolos (mosaicos, moteados, clorosis, negrosis) y frutos, a alteraciones en el crecimiento (enanismo, acortamiento de entrenudos, filimorfismo, aborto de flores y frutos) (Sandoval, 2004).

Bacterias. Entre las principales bacterias que afectan al jitomate están *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, las cuales son causantes de la peca y mancha bacteriana del tomate. La bacteria que más afecta los cultivos de jitomate es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por lo que se mencionará más a detalle en siguiente subtema (Sandoval, 2014).

2.2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Esta bacteria es un bacilo Gram positivo, aeróbico, no móvil. En agar nutritivo desarrolla colonias con consistencia mucoide y colores que van desde el color amarillo claro hasta el naranja y tiene una temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de 25 a 28°C (Borboa *et al*, 2009).

2.2.1. Ciclo de vida de Cmm

La Figura 2 muestra las principales fuentes de contaminación con *Clavibacter*. Semillas provenientes de frutos infectados y los restos de plantas infectadas. El vector primario a largas distancias es la semilla (Sen *et al*, 2015). La subsecuente diseminación o infección secundaria ocurre a través de prácticas culturales como: poda, recorte, injertos, contacto entre plantas infectadas y sanas, lluvia, salpicaduras, riego, preparación y aplicación de soluciones nutritivas. Las infecciones secundarias se dan a través de estomas, hidátodos, raíces y tejidos dañados (Chang *et al*, 1991). Una vez que se infecta la planta, Cmm invade los vasos del xilema y a través de estos se desplaza sistemáticamente por todo el huésped. Cuando las infecciones ocurren en plantas maduras, pueden ser asintomáticas (Sharabani *et al*, 2013). No obstante,

siguen siendo fuente de infección ya que los restos de estas plantas serán una fuente de inóculo para los próximos cultivos.

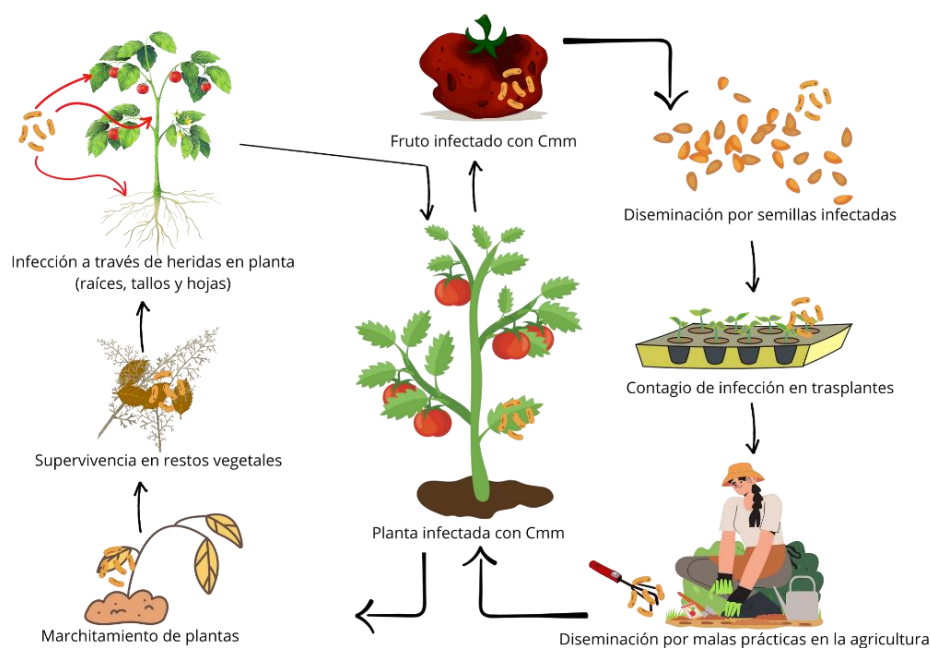


Figura 2. Ciclo de vida de Cmm

2.2.2. Cáncer bacteriano

También conocido como “ojo de pájaro”, chancro o cancro bacteriano, es una enfermedad causada por la bacteria *Cmm*. Es la enfermedad bacteriana más importante para los cultivos de jitomate (Mansfield *et al*, 2012). En especial para los cultivos en invernadero ya que aquí es donde la diseminación mecánica por prácticas culturales favorece la rápida dispersión de la bacteria.

Durante la primera etapa de la enfermedad se puede apreciar el marchitamiento unilateral de los folíolos y las hojas (Figura 3-A), en la siguiente etapa comienza la aparición de los chancros en los tallos y peciolo (Figura 3-B y C). Las características manchas de “ojo de pájaro” aparecen en los frutos en formas redondas oscuras y rodeadas de halos blancos. Otro de los síntomas es la necrosis interna o “decoloración

del tallo” (Figura 3-D y E). Finalmente, cuando la enfermedad está muy avanzada, toda la planta se marchita y muere (Figura 3-F y G) (Sen *et al*, 2015).

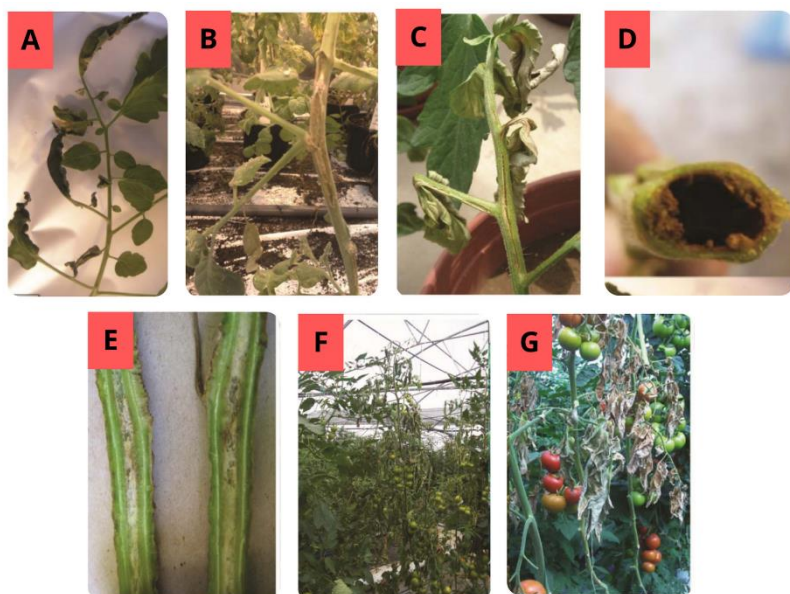


Figura 3. Sintomatología de la enfermedad del cáncer bacteriano en jitomate. Imagen adaptada de Sen *et al*, 2015.

2.2.3. Detección y tratamientos

Es importante mencionar que el problema comienza con la detección, ya que tradicionalmente solo se acude a la observación por parte del técnico o el mismo productor, lo cual resulta poco viable ya que diferentes patógenos generan la misma sintomatología e incluso se confunde con deficiencias o excesos de algún nutriente (Borboa *et al*, 2009). Mientras tanto la sintomatología avanza y el agricultor no maneja de manera eficiente la enfermedad y termina teniendo pérdidas económicas. De lo anterior podemos concluir que el diagnóstico correcto y oportuno del agente causal del problema es punto crítico para el manejo adecuado de enfermedades (Sandoval, 2004). Lo más recomendable es hacer uso técnicas microbiológicas, bioquímicas y moleculares para un diagnóstico preciso (Barnes, 1994).

Actualmente no se puede decir que exista un tratamiento eficiente contra Cmm, en la mayoría de los casos lo que se hace es a manera de medida preventiva. Como medida fundamental para el control de Cmm es asegurarse de la calidad fitosanitaria de la semilla que se vaya a emplear, ya que esta es una de las principales fuentes de inóculo. En caso de no tener certeza de la calidad de la semilla se puede desinfectar sumergiéndola en hipoclorito de sodio [NaClO] al 1% durante 20 o 25 minutos, también se puede dar tratamiento por 30 minutos en agua caliente (56°C) (Sandoval, 2004).

Otra medida fundamental, de acuerdo con Sandoval, es el cuidado en las prácticas culturales, como:

Desinfección del sitio. Esto se realiza en el caso de invernaderos o lugares cerrados, antes de iniciar un cultivo se debe desinfectar con hipoclorito de sodio al 2%, la estructura o cualquier área que pueda ser reservorio de la bacteria.

Higiene dentro del cultivo. Desinfección de herramientas, manos y utensilios de trabajo con lejía al 1%. Se recomienda al final de cada hilera tener un recipiente con una solución de este compuesto para que los operarios introduzcan manos y utensilios empleados.

Eliminación de restos vegetales. Si se ha cultivado jitomate en el mismo sitio y la enfermedad se ha presentado, como medida de prevención se deberá eliminar todos los restos del cultivo y quemarlos ya que estos son otra fuente principal de inóculo para el nuevo cultivo.

Desinfección si se trabajó en otro sitio. Para evitar que la bacteria se introducida desde otra siembra, si el operario estuvo trabajando en otros cultivos de jitomate deberá desinfectar manos y de preferencia se recomienda cambiar su ropa de trabajo antes de iniciar cualquier labor.

Control químico. Se emplea de manera preventiva aplicar productos cúpricos como oxiclورو de cobre [Cu₂(OH)₃Cl], óxido de cobre [CuO] o hidróxido de cobre [Cu(OH)₂] y sulfato de cobre [CuSO₄]. Y si la enfermedad se ha establecido, estos compuestos ayudan a reducir la velocidad de diseminación de la enfermedad (Sandoval, 2004;

Fernández *et al*, 2003). No obstante, se ha estado limitando el uso de estas sustancias debido al impacto que pueden tener en el ambiente (Fernández *et al*, 2003).

Antibióticos. Se han empleado como oxitetraciclina y estreptomicina, este último empleado en los cultivos de jitomate. Sin embargo, su uso se ha puesto en debate por diversas organizaciones debido a que podrían tener un efecto en el aumento y persistencia de los genes de resistencia en otras bacterias patógenas que afectan animales y humanos (McManus, 1999).

Como podemos apreciar ninguna de estas medidas es eficiente y todas incluyen una contraparte negativa, por lo tanto, es de suma importancia la búsqueda de nuevas alternativas de control que a su vez produzcan un menor impacto ambiental.

2.3. Naftoquinonas

Las naftoquinonas son compuestos químicos del tipo α,β -insaturados, se conforman por un anillo de naftaleno (cuya estructura consiste en dos anillos aromáticos fusionados que comparten un par de átomos de carbono) y dos grupos carbonilo en uno de los anillos (Figura 4), los cuales pueden encontrarse en las posiciones 1,4 en el caso de compuestos lineales y 1,2 o 1,3 en angulares (Cantú *et al*, 2012) .

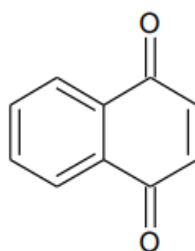


Figura 4. Estructura de la 1,4-Naftoquinona

Las naftoquinonas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han encontrado en hongos, bacterias, artrópodos, plantas, árboles e incluso en algunos animales (Leyva *et al*, 2017).

2.3.1. Actividad biológica de las naftoquinonas

La relevancia de las naftoquinonas proviene de la actividad biológica que estas presentan como antimalárica (Prescott, 1969), antitumoral (Xia *et al*, 2001), fungicida (Tandon *et al*, 2004), anticancerígena (Afrasiabi *et al*, 2004), antiviral (Monreal, 2020), entre otras. Razón por la que son de los principales grupos de compuestos que se encuentran en etapas de investigación tanto preclínica como clínica.

Se ha encontrado que la actividad biológica que presentan las naftoquinonas se debe a las propiedades ácido-base de Lewis, así como su capacidad redox de aceptar hasta dos electrones para formar el radical anión o dianión correspondiente (Figura 5).

Dichas propiedades se ven influenciadas por los grupos presentes en los anillos de la naftoquinona o por la adición de otros núcleos con actividad farmacológica (López *et al*, 2011). En su forma de radiacal anión o dianión es como pueden unirse a iones metálicos, formando complejos de coordinación (Leyva *et al*, 2017).

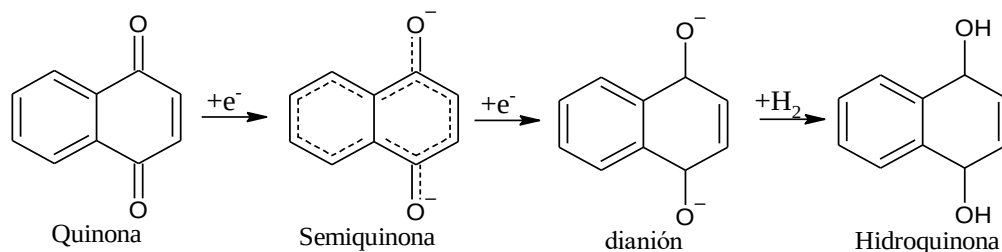


Figura 5. Mecanismo del par redox quinona/hidroquinona

2.3.2. Actividad antibacteriana de las naftoquinonas

Andrade y colaboradores (2011) sintetizaron derivados 2-(amino)-1,4-naftiquinona y probaron su actividad antibacteriana contra una cepa gram negativa (*Proteus* sp.) y una gram positiva (*Enterococcus faecalis*), encontrando que los compuestos si presentan actividad antibacteriana, siendo el compuesto 2-bencilamina-1,4-naftoquinona el que presentó los mejores resultados con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 22.55µg/mL y 31.5µg/mL para *Proteus* sp. y *E. faecalis*, respectivamente.

Se ha reportado que desde el siglo XVI la planta carnívora *Drosera* sp. ha tenido uso medicinal como antitusivo para diversas enfermedades respiratorias, incluyendo a la tuberculosis. Uno de los compuestos principales en los extractos de *Drosera* es la plumbagina, la cual pertenece a la familia de las naftoquinonas (Figura 6). Diversos extractos de diferentes especies de *Drosera* han sido probados como antibacterianos mostrando actividad contra *Staphylococcus aureus* (Ferreira *et al*, 2004).

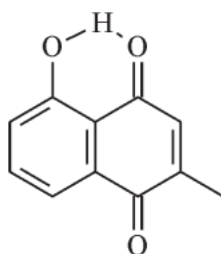


Figura 6. Estructura química de la plumbagina

En un estudio realizado por Rodríguez y colaboradores derivados de 1,4-naftoquinona mostraron actividad como inhibidores del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 y AC 1644), *Klebsiella pneumoniae* (AC 1648 y 1478), *Escherichia coli* (ATCC 25922 y AC 1015) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), mientras que la 1,4-naftoquinona mostró el mayor espectro de acción antibacteriana frente a 11 cepas ensayadas y la mejor actividad fue contra *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 y AC1644). Lo cual demuestra que existe una correlación estructura-actividad (Rodríguez *et al*, 2007).

Se sabe que diversos sustituyentes en las naftoquinonas pueden modificar las propiedades electrónicas y potencializar la actividad biológica. Lo cual fue demostrado por López y colaboradores (2022) en un estudio donde se sintetizaron 13 derivados de 1,4-naftoquinona con aminoácidos, los cuáles fueron probados contra cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Enterococcus faecalis*, y dos cepas clínicas aisladas resistentes a múltiples fármacos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, encontrando que los derivados aminoácido 1,4-naftoquinona tiene buena actividad antibacteriana *in vitro* contra todas las cepas probadas, además determinaron que los compuestos que contenían cloro en su estructura (Figura 7) mostraron mayor eficacia contra los patógenos.

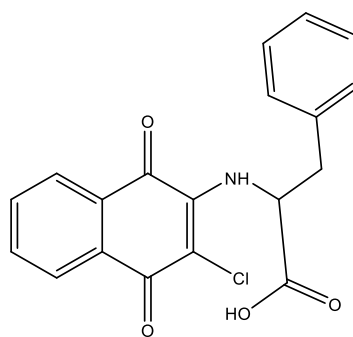


Figura 7. Estructura química de un derivado aminoácido 1,4-naftoquinona sustituido con Cl.

La henna proviene de la planta *Lawsonia inermis* L. y es un colorante ampliamente empleado alrededor del mundo. Se ha probado que extractos de las hojas de *Lawsonia inermis* L tienen actividad antimicrobiana, la cual es atribuida a la lawsona (Figura 8), una naftoquinona presente en esta planta. Además, se ha demostrado que estas presentan potencial actividad antimicrobiana contra bacterias que afectan los alimentos como son *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus epidermidis*, y *S. intermed* (Yang & Lee, 2015).

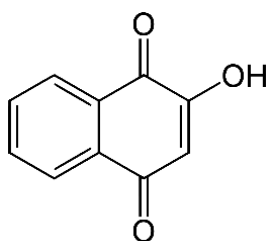


Figura 8. Estructura de la Lawsona

2.4. *Melissa officinalis*

Melissa officinalis (Figura 9) conocida comúnmente como bálsamo de limón, toronjil, limoncillo, la melisa, hoja de limón, menta melisa, por mencionar algunos, es perteneciente a la familia Lamiaceae y proveniente del sur de Europa, la Región Mediterránea y el oeste de Asia (Meftahizade *et al.*, 2010). Es una planta medicinal ampliamente utilizada por sus diversos usos, entre ellos como repelente de mosquitos, saborizante (por su agradable aroma a limón relacionado con menta) (Ashori *et al.*, 2011), para aliviar padecimientos como dolores de cabeza, trastornos gastrointestinales, nerviosismo y traumatismo (Rabbani *et al.*, 2016), e incluso se ha encontrado que pueden tener actividad anticancerígena (Risco *et al.*, 2017).



Figura 9. Planta *Melissa officinalis*

Se ha reportado que el extracto etanólico de las hojas de *Melissa officinalis* presenta buena actividad antioxidante y antiviral las cuales se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos como la cafeína el cual es uno de los componentes más abundantes (Stanojevic' *et al.*, 2010).

2.4.1. Actividad antibacteriana de *Melissa officinalis*

Diversos estudios han demostrado el potencial de *Melissa officinalis* (MO) como agente antibacteriano. Rabbani y colaboradores (2016) probaron extractos hidroalcohólicos de MO contra bacterias que generan infecciones en quemaduras, donde se encontró que tuvieron buena actividad antibacteriana contra *S. aureus* y la regular contra *K. pneumoniae*. Por otra parte, se realizaron estudios para investigar el uso potencial de extractos de MO en etanol, agua y acetato de etilo en la industria alimenticia como antibacterianos y su sinergia con los conservadores como nitrito sódico y sorbato potásico sobre bacterias que afectan los alimentos. Donde la actividad bacteriana más fuerte se reportó en los extractos etanólicos y la mejor sinergia fue con el nitrito de sodio contra *B. subtilis* y *B. mycoides* (Stanojevic' *et al.*, 2010). Naghsh y colaboradores (2013) realizaron un estudio empleando tanto el extracto etanólico como el aceite esencial de MO contra *E. coli*, los resultados mostraron que el extracto no presento actividad antibacteriana, mientras que el aceite esencial si presentó actividad, incluso tuvo mayor inhibición que algunos antibióticos.

Se ha encontrado que la actividad farmacéutica y medicinal de la planta se debe principalmente a los aldehídos monoterpenoides como geranial, neral, (*E*)-anetol, (*E*)-cariofileno y citronelal (Sharopov *et al.*, 2013; Allahverdiyev *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

La producción y el consumo mundial de jitomate, así como el consumo promedio per cápita, registran tendencia al alza durante la década reciente. China es el más importante productor y consumidor mundial, mientras que Estados Unidos es el principal importador, en este contexto México se posiciona como el principal exportador de esta hortaliza hacia EUA. Durante la última década, el valor de las exportaciones mexicanas creció a una tasa promedio anual de 5.5%, mientras que el volumen lo hizo a una tasa promedio anual de 4.5%, para ubicarse en un máximo histórico de 1.6 millones de toneladas.

En general, la productividad del jitomate por unidad de superficie continúa creciendo. Sin embargo, los rendimientos varían en función de las tecnologías empleadas, desde el cultivo a campo abierto, hasta la producción en invernaderos altamente tecnificados con sistemas automatizados de riego, nutrición y control fitosanitario. En el 2016, más del 50% de la producción nacional de jitomate se concentró en seis entidades: Sinaloa, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Baja California y Zacatecas.

Los precios del jitomate en el mercado nacional difieren de acuerdo con el tipo de producto (cultivado a campo abierto o invernadero, orgánico) y de la variedad (saladette, bola y cherry), principalmente. La estacionalidad de la producción, el flujo de las exportaciones, así como posibles afectaciones al cultivo por fenómenos meteorológicos o sanitarios, son factores que repercuten de manera importante en la disponibilidad y el comportamiento de los precios de esta hortaliza en el mercado nacional e internacional.

Adicionalmente, la producción de tomate en México se ha visto limitada por la abundancia de enfermedades, entre ellas el cáncer bacteriano del jitomate producido por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, una enfermedad cuarentenaria en EUA, México y Europa. En los estados de San Luis Potosí, Baja California, Estado de México, Michoacán, Guanajuato, Sinaloa, Morelos, Zacatecas se han reportado desde hace varios años grandes pérdidas en la producción ocasionadas por cáncer

bacteriano. Si esta situación no es atendida puede comprometer en el mediano plazo la actual posición privilegiada de México, como principal proveedor de tomate a EUA. La enfermedad es devastadora y una vez que se ha establecido plenamente, el cultivo queda vulnerable al ataque de otros patógenos. La bacteria es viable en suelo cuando se asocia a restos vegetales, por lo que está presente en diferentes ciclos agrícolas. La posibilidad del control químico, con compuestos derivados de cobre y antibióticos de amplio espectro, no es efectivo y causa estragos en el medio ambiente, en la salud de los trabajadores, en las comunidades de organismos benéficos, e incluso puede afectar el desarrollo y productividad de las plantas.

Por esta razón, la principal medida preventiva recae en prácticas culturales, sin embargo, no reduce el riesgo de infecciones posteriores. De aquí, surge la necesidad de validar alternativas sustentables para el tratamiento de dicha enfermedad y que la producción de jitomate pueda seguir asegurando la posición privilegiada del sector productivo mexicano en el mercado internacional.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana de seis compuestos derivados de naftoquinona, aceite esencial y extracto etanólico de *Melissa officinalis*, contra el actinomiceto *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*, en plantas de jitomate *Lycopersicum esculentum* L.

4.2. Objetivos específicos

- Síntetizar y caracterizar seis derivados de naftoquinona.
- Recolectar material vegetal de *Melissa officinalis*.
- Obtener extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis*.
- Determinar la patogenicidad de la bacteria *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis*.
- Determinar la actividad antibacteriana de los compuestos, extracto y aceite esencial mediante el método de difusión en pozo.

5. HIPÓTESIS

Los compuestos derivados de naftoquinona, el aceite esencial y extracto etanólico de *Melissa officinalis* presentan actividad antimicrobiana contra la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm).

6. METODOLOGÍA

6.1. Reactivos

Los reactivos y solventes utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich® o Merck®, y fueron utilizados sin posterior purificación o tratamiento: 1,4-naftoquinona 97%, 2,3-dicloronaftoquinona 97%, $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 99%, 2,4-difluoroanilina 99%, 4-fluoroanilina 99%, Asparagina 98%, *L*-Fenilalanina 98%, hidróxido de potasio 90%, trietilamina 99%, ácido clorhídrico 37%, etanol 99.9%, dimetilsulfóxido 99.5%, dioxano 99%, cloroformo 99.8%, metanol 99.8% y agua destilada. Se utilizó sustrato perlita marca Multiperl®, nitrato de calcio (Yaraliva®), fosfato monoamónico (MAP), sulfato de magnesio, Ultrasol® NKS, Ultrasol® SOP 52, Medio LB, Agar-Agar.

6.2. Materiales y equipos

- Para las síntesis asistidas por ultrasonido (SAU) se empleó un baño de ultrasonido marca autoscience® modelo AS2060B.
- Para la síntesis asistida por microondas (SAM) se utilizó un microondas de la marca CEM® modelo Mars6.
- La caracterización por infrarrojo se realizó en un espectrofotómetro FT-IR marca PerkinElmer® con dispositivo de ATR GX00, los espectros se obtuvieron con 10 barridos a temperatura ambiente.
- Para el seguimiento de la reacción se empleó la técnica de cromatografía por capa fina (CCF) en cromatoplasas de aluminio con capa de silica F254, las cuáles se revelaron bajo lámpara de UV-Vis Spectroline® CM-10.
- Se utilizó un procesador de alimentos de la marca HamiltonBeach® para pulverizar la planta.
- Para el secado del extracto se utilizó un horno de secado marca Luzern®.
- Para pesar las muestras se utilizó una balanza granataria eléctrica de la marca OAHUS® modelo SCOUT PRO SP401 de 400g.

- Para la medición de los halos de inhibición se empleó un vernier marca SURTEK®.
- Para homogeneizar se empleó una centrifuga marca Thermo scietific®, S1 16R.

6.3. Síntesis química

6.3.1. Síntesis de derivados aminados de naftoquinona

Para la síntesis de derivados aminados de naftoquinona se utilizó una metodología ya reportada por el grupo de investigación (Monreal, 2020). La reacción se llevó a cabo a través de una síntesis asistida por ultrasonido (SAU) y las aminas utilizadas fueron 4-fluoroanilina y 2,4-difluoroanilina.

Mediante una reacción del tipo Adición de Michael el grupo amino de las anilinas se adicionaron al carbono 2 de la 1,4- naftoquinona (Figura 10), obteniéndose dos derivados aminados, que se denominaron compuesto 1 (**C1**) (compuesto sustituido con la 4-fluoroanilina) y compuesto 3 (**C3**) (compuesto sustituido con la 2,4-difluoroanilina).

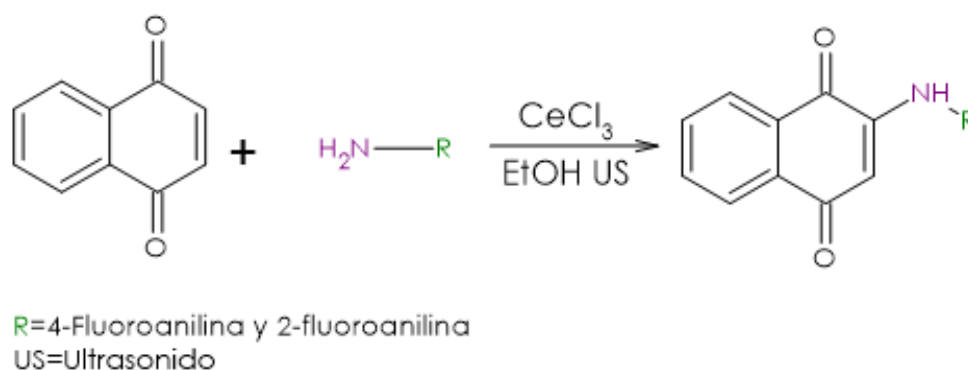


Figura 10. Reacción general para la síntesis de derivados aminados de 1,4-naftoquinona

6.3.2. Síntesis de derivados de aminoácido naftoquinona

Los derivados aminados de naftoquinona sustituidos por aminoácidos se obtuvieron en base a la metodología reportada por Rivera-Avalos y colaboradores (2019), a través de una síntesis asistida por microondas (SAM). Se usó la 1,4-naftoquinona y la 2,3-dicloronaftoquinona, y los aminoácidos fenilalanina y asparagina.

Se adicionó el nitrógeno del grupo amino de los aminoácidos (fenilalanina, Phe, y asparagina, Asn) al carbono 2 de la 1,4-naftoquinona o 2,3-dicloronaftoquinona (Figura 11). Se obtuvieron cuatro compuestos que se denominaron como: **AF1** (2,3-dicloronaftoquinona sustituida por fenilalanina), **AF2** (1,4-naftoquinona sustituida por fenilalanina), **AA1** (2,3-dicloronaftoquinona sustituida por asparagina) y **AA2** (1,4-naftoquinona sustituida por asparagina).

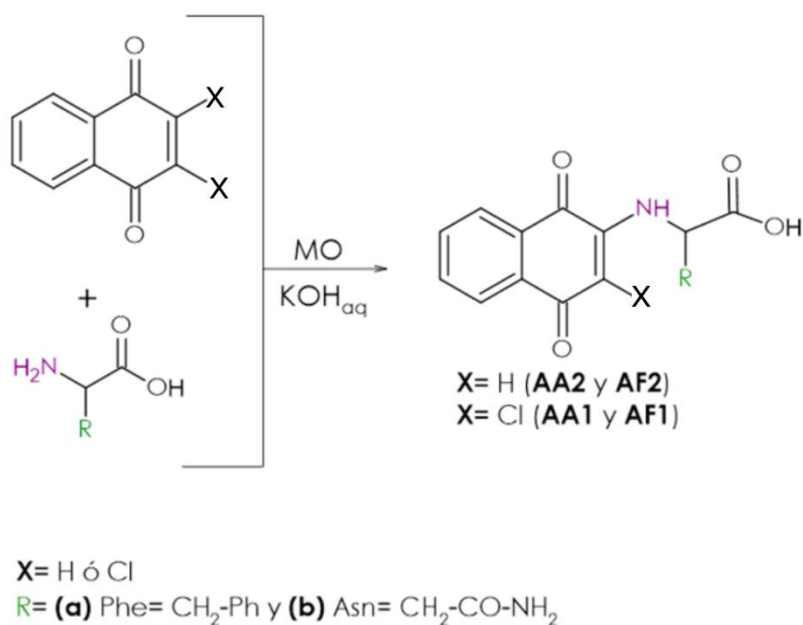


Figura 11. Reacción general para la síntesis de derivados de naftoquinona con aminoácidos

La purificación de los compuestos se realizó por medio de métodos de separación físicos reportados por Rivera-Avalos y colaboradores (2019), y la caracterización estructural se realizó mediante espectroscopia infrarroja.

6.4. Obtención del aceite esencial y el extracto etanólico de MO

6.4.1. Recolección del material vegetal

La obtención de las plantas se llevó de manera directa con el agricultor, el señor Máximo, quién tiene su cultivo ubicado Mexquitic de Carmona del Estado de San Luis Potosí, México, en el ejido de las moras, (Figura 12).

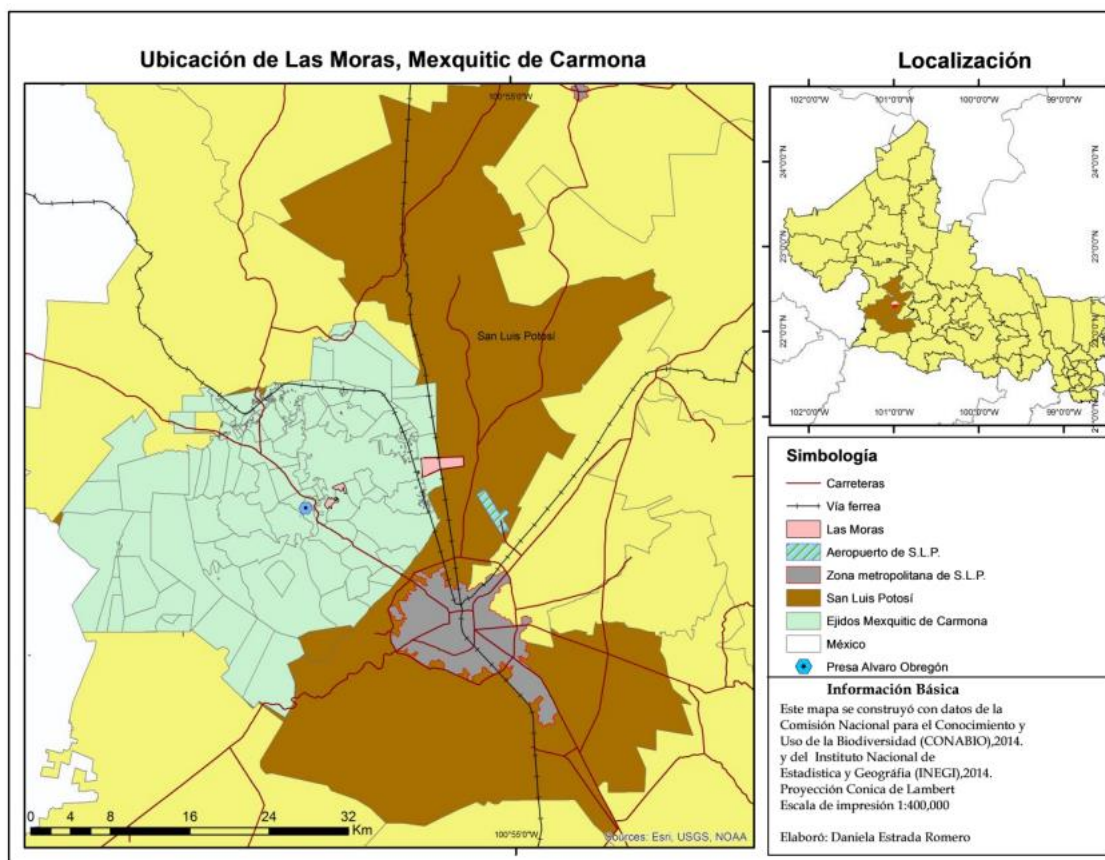


Figura 12. Mapa de ubicación del ejido Las Moras (Estrada, 2017)

6.4.2. Preparación del material vegetal

6.4.2.1. Muestra para los extractos

Parte del material recolectado fue colocado en papel absorbente durante 48h para eliminar humedad. Posteriormente se separaron las partes aéreas como hojas, tallos y raíces, y se pusieron a secar durante 15 días al abrigo de la luz a una temperatura ambiente. Después se molieron con un procesador de alimentos.

6.4.2.2. Muestra para aceite esencial

El material vegetal fresco (generalmente usado a la mañana posterior a su recolección), se deshojó, posteriormente las hojas fueron cortadas en trozos pequeños y se pesaron 3 kg de estas.

6.4.3. Extracción etanólica

Se pesaron aproximadamente 7g de planta, previamente secada y pulverizada, y se le adicionaron 100mL de etanol, se dejó macerar durante 24 h al abrigo de la luz. El etanol se evaporó a presión reducida a 40°C, posteriormente se dejó en el horno de secado durante 8 h para terminar de secar.

6.4.4. Extracción del aceite esencial

La obtención del aceite esencial se llevó a cabo mediante tres metodologías distintas:

- Destilación por arrastre de vapor
- Destilación por arrastre de vapor asistida por destilador
- Hidrodestilación asistida por microondas

6.4.4.1. Método de arrastre de vapor

Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas-UASLP en colaboración con la Dra. Bertha Irene Juárez Flores y la QFB. María Eugenia Reyna Ortega.

En la Figura 13 se muestra el sistema para la destilación utilizado, en el cual se colocó el material vegetal previamente pesado (3Kg) en un matraz balón, se añadieron 250mL de agua y se conectó al matraz de 1L que contenía el agua que estuvo en constante ebullición. Una vez armado el sistema se mantuvo en constante ebullición. Conforme el vapor de agua entró en contacto con el material vegetal, este se calentó y liberó el aceite esencial; la mezcla de vapor saturado y aceite esencial fluyó hacia el condensador, donde se enfrió y finalmente en un matraz Erlenmeyer se recuperó el hidrolato, el cual se vertió en un embudo de separación y se dejó en reposo a 4°C.

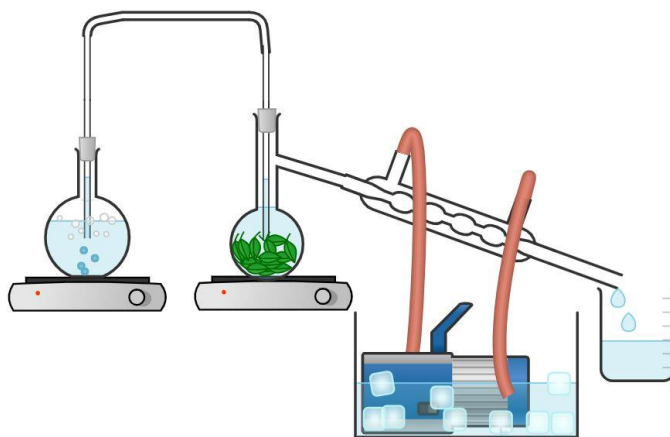


Figura 13. Sistema para destilación por método de arrastre de vapor.

6.4.4.2. Método de arrastre de vapor asistido por destilador

Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Agroprocesos del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas-UASLP en colaboración con la Dra. Bertha Irene Juárez Flores.

Se colocó el material previamente pesado (3Kg) en la canastilla, se llenó con 10 L de agua destilada y se armó y cerró el sistema (Figura 14). Se mantuvo en ebullición, y conforme el vapor de agua entró en contacto con el material vegetal, este se calentó y liberó el aceite esencial; la mezcla de vapor saturado y aceite esencial fluyó hacia el condensador, donde se enfrió y finalmente se recuperó el hidrolato, el cual se vertió en un embudo de separación y se dejó en reposo a 4°C.



Figura 14. Sistema para destilación por método de arrastre de vapor asistido por destilador

6.4.4.3. Método de hidrodestilación asistida por microondas

Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Fotoquímica y Síntesis de la Facultad de Ciencias Químicas-UASLP.

Se colocó el material previamente pesado (3Kg) en un matraz balón, se armó el sistema como se muestra en la Figura 15, y se introdujo al microondas con las siguientes condiciones: 110°C, 450W, durante 2 horas. Se mantuvo en ebullición, conforme el vapor de agua entró en contacto con el material vegetal, este se calentó y liberó el aceite esencial; la mezcla de vapor saturado y aceite esencial fluyó hacia el condensador, donde se enfrió y finalmente se recuperó el hidrolato en un embudo de separación y se dejó en reposo a 4°C.

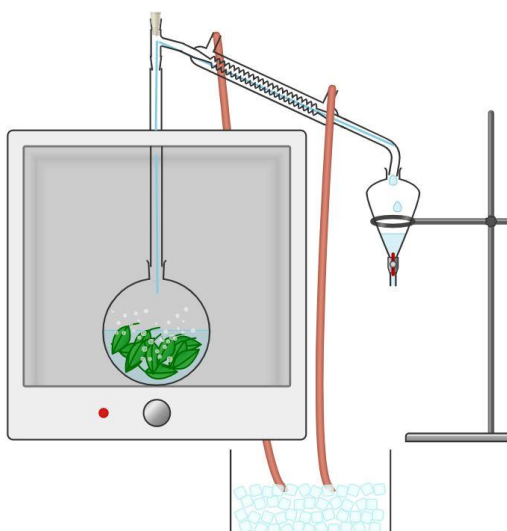


Figura 15. Sistema para destilación por método de hidrodestilación asistida por microondas

6.4.5. Recuperación de aceite esencial

Para la separación del hidrolato se realizó una extracción líquido-líquido empleando éter etílico en una proporción 2:1 (éter etílico-hidrolato), de este se obtuvieron dos fases (orgánica y acuosa). La fase orgánica fue la responsable de arrastrar el aceite esencial. Finalmente, esta fase se colocó en la campana de extracción hasta completa evaporación del éter etílico. El aceite esencial obtenido se midió y almacenó en un frasco ámbar y se dejó en refrigeración a 4°C para su posterior uso y así evitar su oxidación.

6.5. *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (Cmm)

6.5.1. Cultivo bacteriano

La cepa bacteriana que se empleó fue *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), la cual se aisló de campos de tomate con presencia de la enfermedad. Una vez cultivada y resembrada la cepa fue mantenida en congelación para su conservación.

6.5.2. Determinación de la fitopatogenicidad de la cepa silvestre Cmm

Este procedimiento se realizó en plantas de tomate con el fin de verificar si la cepa era viable para el estudio. Esto se llevó a cabo en el invernadero de la Facultad de Ingeniería del área Agroindustrial y en el laboratorio de Agrobiotecnología de Facultad de Ingeniería-UASLP en colaboración del Dr. Gerson Alonso Soto Peña.

Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue el de bloques completos al azar con cinco bloques y 5 repeticiones. Con lo que el total de unidades experimentales fue de 25.

Obtención de plántulas de jitomate

Las plántulas se obtuvieron de un invernadero (Figura 16-A).

Trasplante

El trasplante se realizó cuando las plántulas de jitomate tuvieron ~7 hojas. Se colocaron en macetas de 5 litros de capacidad que contenían perlita como sustrato. Las plantas se ordenaron en cinco bloques de cinco plantas cada uno (Figura 16-B).



Figura 16. Determinación de fitopatogenicidad en Cmm: A) plántulas, B) Trasplante

Preparación de solución nutritiva

Se prepararon seis soluciones distintas: ácido fosfórico [H_2PO_4], nitrato de calcio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$], sulfato de potasio [K_2SO_4], sulfato de magnesio [Mg_2SO_4], nitrato de potasio [KNO_3] y solución micro comb de la marca Haifa®. Con las que se realizaba la mezcla con las que se regó el cultivo durante todo el experimento.

Preparación del inóculo

Las bacterias se descongelaron y sembraron en cajas de Petri con agar LB (Luria-Bertani), una vez que creció se realizó una caracterización macroscópica (Borboa et al., 2009). Posteriormente se realizó un ajuste de bacterias a 50 mil por medio de conteo en cámara de Neubauer. Se colocaron las bacterias en un tubo eppendorf que contenía 1mL de agua estéril.

Inoculación de la bacteria

Una vez que tenían una altura de aproximadamente 50 cm se realizó el establecimiento de tutores para dar soporte a la planta (Figura 17-A). Al mes después del trasplante comenzaron a aparecer los primeros frutos (Figura 17-B) y fue entonces que se realizó la inoculación en todas las plantas.



Figura 17. Determinación de fitopatogenicidad en Cmm: A) Crecimiento y tutoreo de plantas, B) Plantas y fruto al tiempo de la inoculación

La inoculación de Cmm se realizó mecánicamente en las plantas al mes después del trasplante para garantizar que todas las plantas porten la bacteria, ya que si bien algunas ya la portaban al haberse transmitido por semilla no todas lo portaban o el grado de infección no era igual. Posterior a la herida se inoculó la hoja con una suspensión bacteriana que contenía 50 mil bacterias y se monitorearon las plantas hasta la aparición de los síntomas de la infección (Figura 18), lo cual sucedió a los quince días después de la inoculación (ddi).

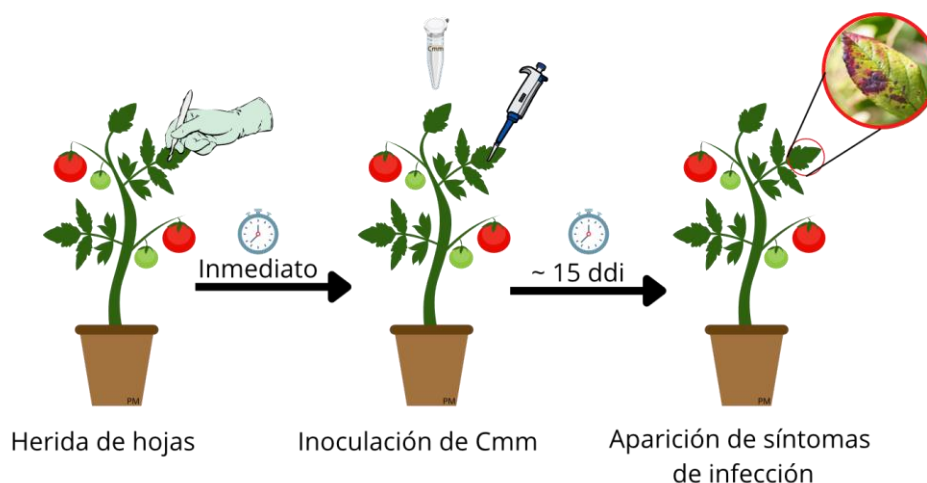


Figura 18. Esquema de inoculación con Cmm

Detección de bacteria

Se realizó un seguimiento del crecimiento de las plantas para detectar los síntomas de la enfermedad y corroborar la fitopatogenicidad de la bacteria. Las variables medidas fueron altura y número de hojas, esto ya que uno de los principales síntomas es el marchitamiento de hojas y daños en el tallo.

Esto se realizó una vez por semana durante las siete semanas que duró el experimento y en la octava semana se contaron los frutos cosechados.

Para verificar que los síntomas pertenecían a la infección causada por Cmm, se tomaron tres hojas de tres partes de la planta (alto, medio y bajo), se maceraron en un mortero de porcelana añadiendo 3mL de agua estéril, y finalmente se tomaron 500μL de la extracción obtenida y se colocaron en discos de papel filtro que se colocaron en cajas Petri con medio LB con agar y se dejaron en incubación a 29°C por 24 h. Posteriormente se realizó la caracterización macroscópica de la morfología de la bacteria, la cual se presenta en la Tabla 1 (Borboa *et al.*, 2009).

Tabla 1. Características macroscópicas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm)

Característica	Observación
Color	Amarillo claro a naranja
Movilidad	No móvil
Consistencia	Mucoide
Tipo de bacteria	Gram positivo
Forma	Bacilo

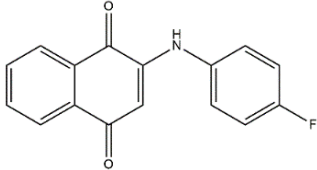
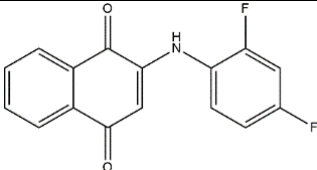
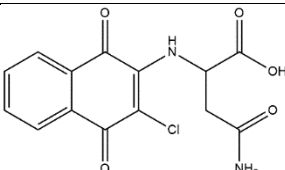
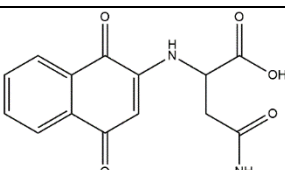
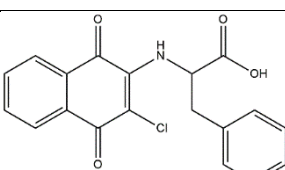
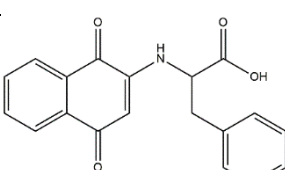
6.5.3. Determinación de la actividad antibacteriana por método de difusión en pozo.

6.5.3.1. Tratamientos

Los tratamientos empleados fueron los seis compuestos derivados de naftoquinona, el extracto etanólico y aceite esencial de MO (Tabla 2).

Preparación de los tratamientos. Se pesaron las cantidades correspondientes para la concentración deseada y se disolvieron (los compuestos sintetizados se disolvieron en dimetilsulfóxido [DMSO] y el extracto etanólico en etanol), finalmente se pasaron por una membrana de 0.22μm de poro para su esterilización.

Tabla 2. Tratamientos y concentraciones empleados para la evaluación de la actividad antibacteriana

Compuesto	Estructura	Concentración
C1		250µg/mL
		500µg/mL
		1000µg/mL
C3		250µg/mL
		500µg/mL
		1000µg/mL
AA1		250µg/mL
		500µg/mL
		1000µg/mL
AA2		250µg/mL
		500µg/mL
		1000µg/mL
AF1		250µg/mL
		500µg/mL
		1000µg/mL
AF2		250µg/mL
		500µg/mL
		1000µg/mL
Ext	Extracto etanólico de <i>Melissa Officinalis</i>	10 mg/mL
		15 mg/mL
		20 mg/mL
		25 mg/mL
AE	Aceite esencial de <i>Melissa Officinalis</i>	100%

6.5.3.2. Preparación del inóculo.

La cepa bacteriana se desarrolló en un cultivo de 24 h a 29 ° C, en medio LB y se ajustó a una concentración de 10^5 UFC/mL con agua peptonada.

6.5.3.3. Evaluación del efecto antimicrobiano

En cajas Petri con medio LB sólido con un grosor de 5 mm, se hicieron 4 pozos de 10 mm de diámetro y se sellaron del fondo con 40 μ L de medio LB para la formación del pozo. Con una suspensión de 0.5 en escala de McFarland de Cmm, se hizo una siembra de forma masiva con hisopo estéril, sin tocar el fondo del pozo. A tres de los pozos se le adicionaron 250 μ L del tratamiento correspondiente (Tabla 2), al cuarto pozo se le añadió el solvente utilizado (DMSO para compuestos sintetizados y etanol para extractos de MO) como control, esto para verificar que no hubiera error por vehículo utilizado (Figura 19).



Figura 19. Distribución de muestras en las cajas Petri

También se colocaron cajas control: control de bacteria Cmm sin estímulo, esto con el fin de eliminar las posibles fuentes de sesgo (control negativo), control de H₂O₂ al 30%, esto debido que se conoce que a tal concentración tiene alto potencial bactericida (control positivo). Todas las cajas se incubaron a temperatura de 29 °C por 24 h, se

tomaron fotos a las 24, 48 y 72 h para ver el efecto antimicrobiano y se midieron los halos de inhibición con el vernier. Esto se realizó en 2 experimentos aislados con 6 repeticiones cada uno.

Los diámetros de inhibición se determinaron con la formula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\Phi_{\text{halo de tratamiento}} - \Phi_{\text{halo blanco}})}{(\Phi_{\text{halo control positivo}} - \Phi_{\text{blanco}})} \times 100$$

Los porcentajes de inhibición se determinaron con la siguiente formula:

$$\text{Diámetro} = \Phi_{\text{halo tratamiento}} - \Phi_{\text{halo vehículo}}$$

Para el caso de los derivados de naftoquinona el vehículo fue DMSO, para el extracto etanólico de MO fue etanol y el aceite esencial se utilizó directamente.

6.6. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos se realizó estadística descriptiva, pruebas de normalidad y comparación múltiple de medias. Para establecer las diferencias entre los tratamientos se realizó la ANOVA de dos vías y comparación de medias por prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$). Esto con el software estadístico Minitab 19® 2020. Se empleó el análisis de ANOVA de dos vías ya que se consideran dos fuentes de variación: los tratamientos y las concentraciones.

Para la comparación entre las diferentes concentraciones y tiempos de cada tratamiento se elaboró un análisis de ANOVA de dos vías de comparación múltiple de

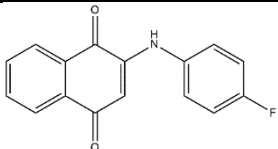
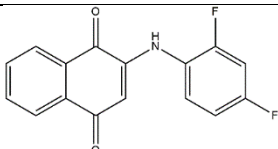
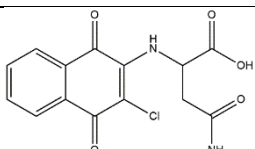
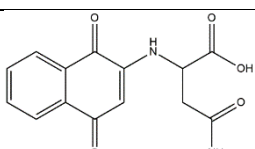
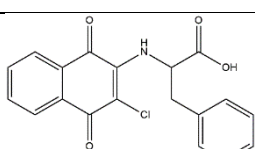
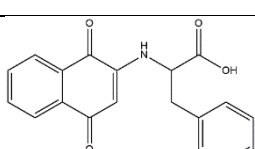
medias usando la prueba post hoc de Bonferroni ($\alpha=0.05$). Este análisis de ANOVA se realizó con el software estadístico Graphpad Prism® 5.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Síntesis de derivados de la 1,4-naftoquinona

La Tabla 3 muestra las estructuras químicas y los rendimientos obtenidos para los 6 compuestos sintetizados.

Tabla 3. Rendimientos de reacción de los derivados aminados de naftoquinona.

Compuesto	Estructura	Método	Rendimiento (%)
C1		SAU	85
C3		SAU	70
AA1		SAM	80
AA2		SAM	85
AF1		SAM	85
AF2		SAM	91

SAU: Síntesis asistida por ultrasonido, y SAM: Síntesis asistida por microondas.

7.1.1. Caracterización estructural por Espectroscopia Infrarrojo

Debido a que los compuestos ya han sido sintetizados por el grupo de investigación (Rivera-Avalos *et al.*, 2019; Monreal, 2020), la identificación estructural se realizó por comparación del análisis de infrarrojo con los compuestos ya reportados en el grupo de investigación, así como por las características físicas.

Para todos los casos el espectro IR del producto de síntesis fue comparado con el de la materia prima para observar la adición de las bandas esperadas por los sustituyentes. En la Tabla 4 se indican las bandas características para la 1,4-naftoquinona, las cuales siguieron presentes en los productos con la adición de las vibraciones correspondientes a los sustituyentes.

Tabla 4. Bandas IR características para la 1,4-naftoquinona.

Grupo	Nº de onda (cm ⁻¹)	Modo vibracional	Intensidad
=C-H	3150	Tensión	Baja
C=O	1656	Tensión	Alta
C=C Aromático	1595	Tensión	Alta
=C-H	780	Flexión	Media

7.1.1.1. 2-((4-fluorofenil)amino))-1,4-naftoquinona, C1

En la Figura 20 se muestra la comparativa del espectro IR de **C1**. Además de las bandas características a la 1,4-naftoquinona se observa la presencia de las bandas características de la amina secundaria tensión del N-H en 3178 cm^{-1} , flexión N-H 1507 cm^{-1} , tensión C-N en 1274 cm^{-1} ; además de la tensión C-F en 1220 cm^{-1} y la sustitución *para* en 823 cm^{-1} lo que confirmó la sustitución en el núcleo de la 1,4-naftoquinona.

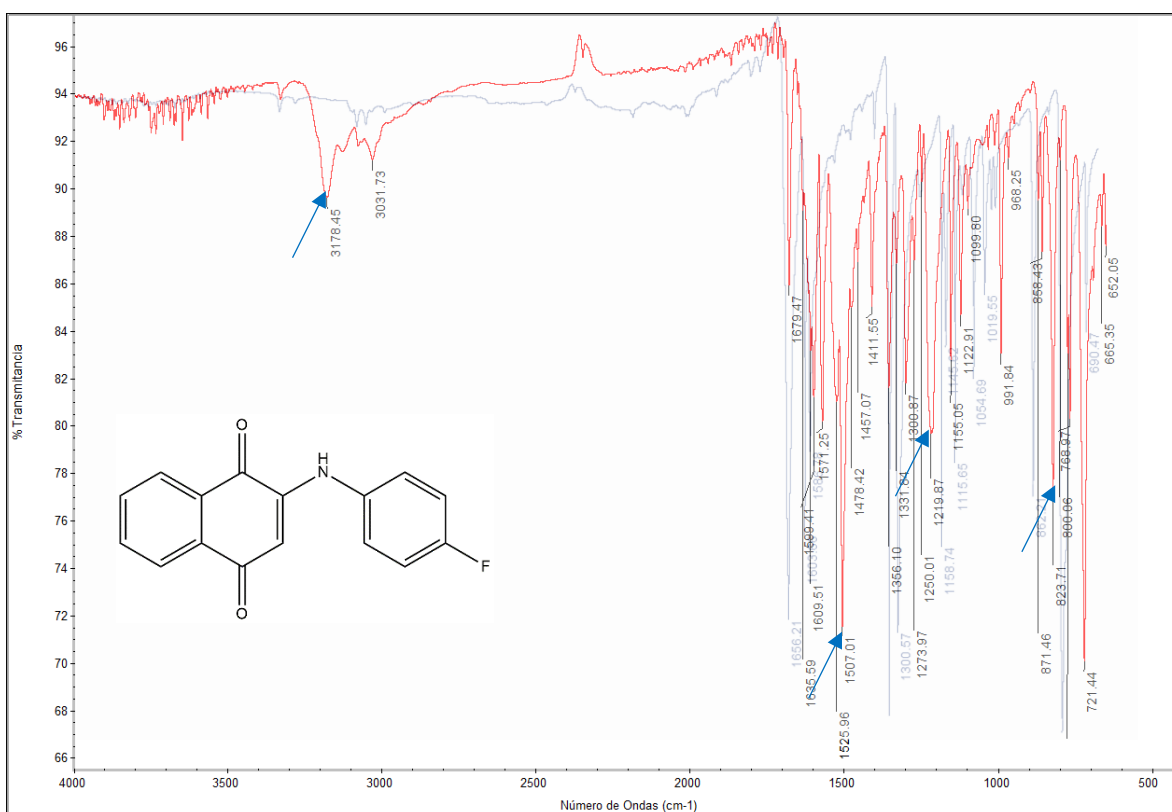


Figura 20. Espectro IR de C1

7.1.1.2. 2-((2,4-difluorofenil)amino))-1,4-naftoquinona, C3

En la Figura 21 se muestra el espectro IR de **C3**. En este caso se observan bandas similares al **C1**, tensión del N-H en 3312 cm^{-1} , flexión N-H 1508 cm^{-1} , tensión C-N en 1305 cm^{-1} , tensión C-F en 1148 cm^{-1} y la sustitución *para* en 806 cm^{-1} , con la adición de la sustitución *orto* en 793 cm^{-1} confirmando la sustitución.

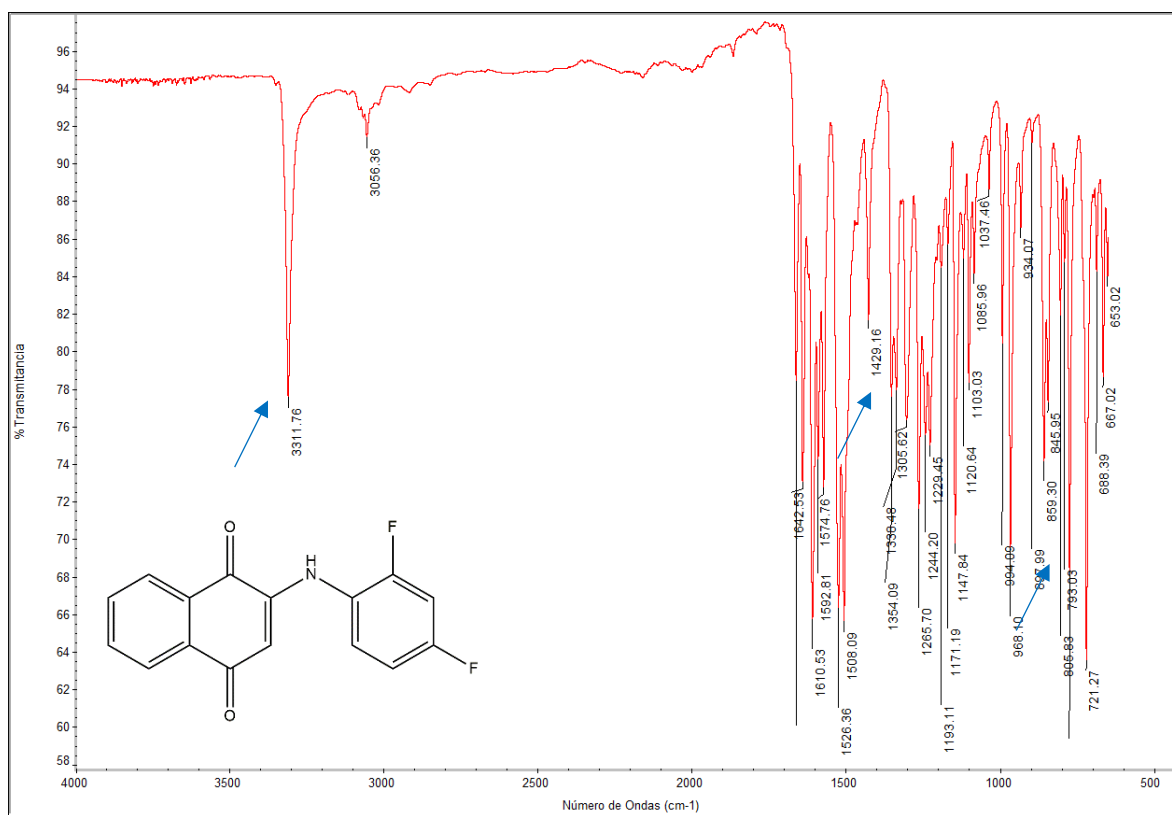


Figura 21. Espectro IR de C3

7.1.1.3. Ácido 4-amino-2-((3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-4-oxobutanoíco, AA1

En la Figura 22 se muestra el espectro IR del compuesto **AA1**. Se comprobó la formación del producto deseado ya que además de las bandas de la 1,4-naftoquinona se observaron las bandas traslapadas de la amina secundaria, amida y OH del ácido carboxílico en 3339 cm^{-1} , tensión C-N en 1302 cm^{-1} , tensión C=O de amida a 1671 cm^{-1} y tensión C-Cl en 778 cm^{-1} .

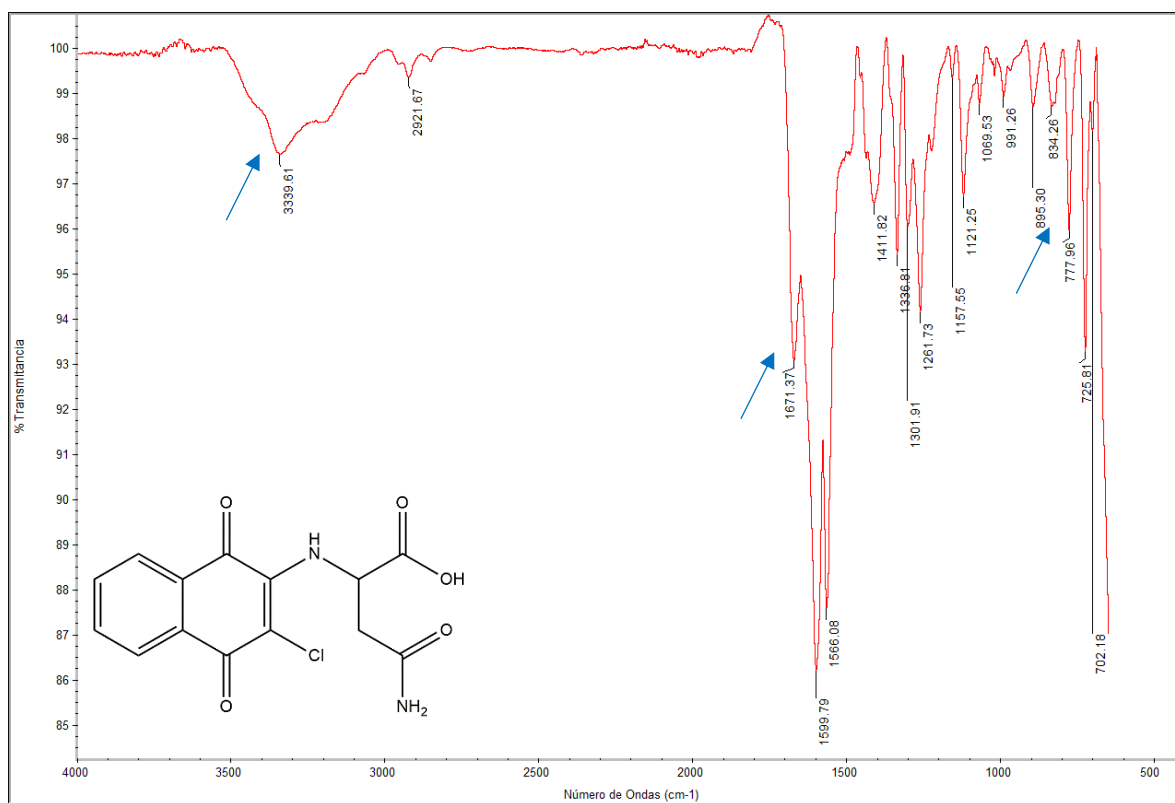


Figura 22. Espectro IR del compuesto AA1

7.1.1.3.1. Ácido 4-amino-2-[(1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino]-4-oxobutanoíco, AA2

En la figura 23 se muestra el espectro IR del compuesto **AA2**. Este compuesto presenta las mismas bandas que el compuesto **AA1**, solo que sin la vibración de tensión del C-Cl.

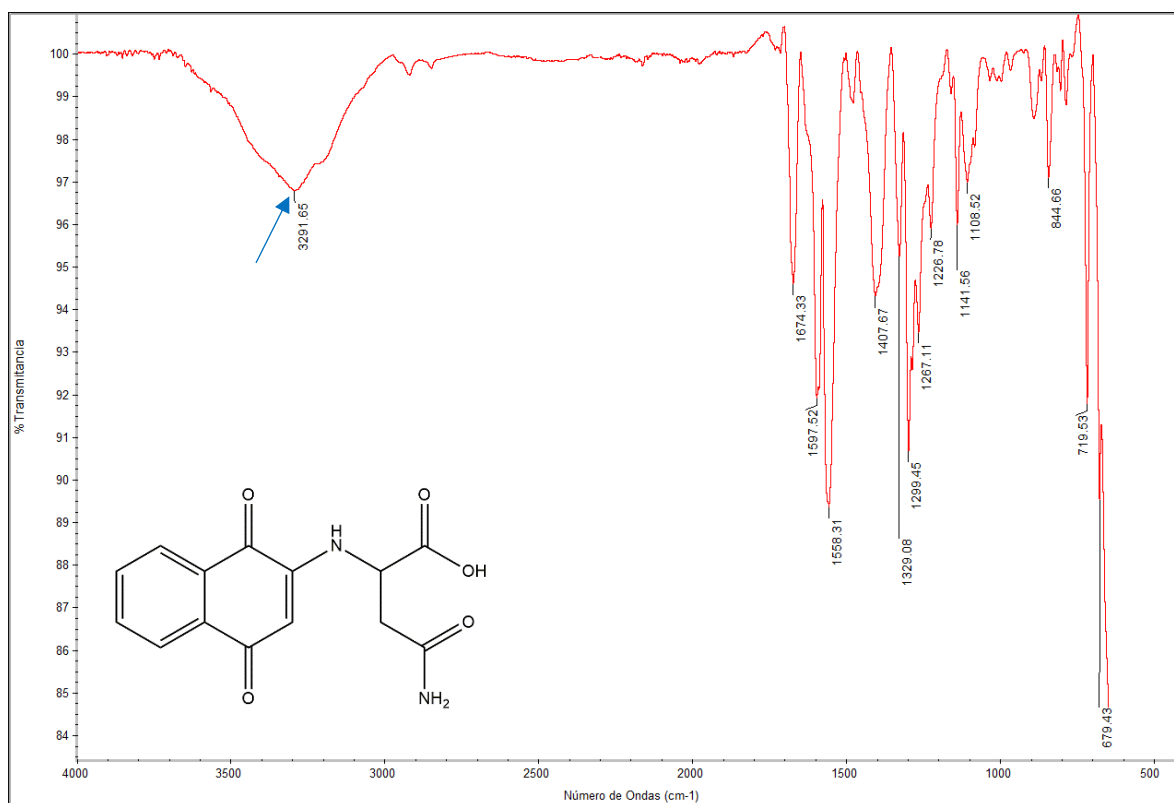


Figura 23. Espectro IR del compuesto AA2

7.1.1.3.2. Ácido 2-((3-cloro-1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-3-fenilpropanoico, AF1

En la Figura 24 se muestra el espectro IR del compuesto **AF1**. Se comprobó la formación del producto deseado ya que además de las bandas de la 1,4-naftoquinona se observaron la banda de tensión de amina secundaria en 3345 cm^{-1} , flexión N-H en 1509 cm^{-1} , tensión C-N en 1305 cm^{-1} , tensión C=O de amida a 1671 cm^{-1} y tensión C-Cl en 778 cm^{-1} .

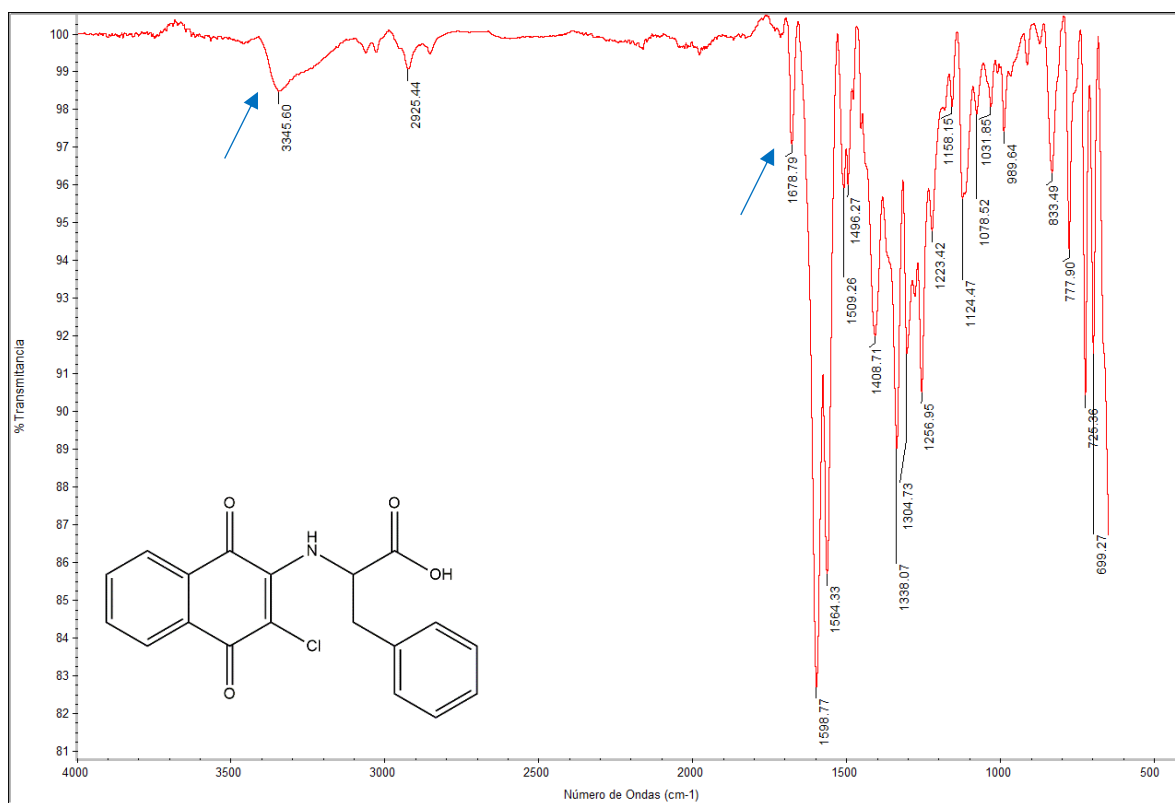


Figura 24. Espectro IR del compuesto AF1

7.1.1.3.3. Ácido 2-((1,4-dioxo-1,4-dihidronaftalen-2-il)amino)-3-fenilpropanoico, AF2

Para el compuesto **AF2** se observaron las mismas bandas que el compuesto **AF1** con la ausencia de la vibración de tensión del C-Cl, Figura 25.

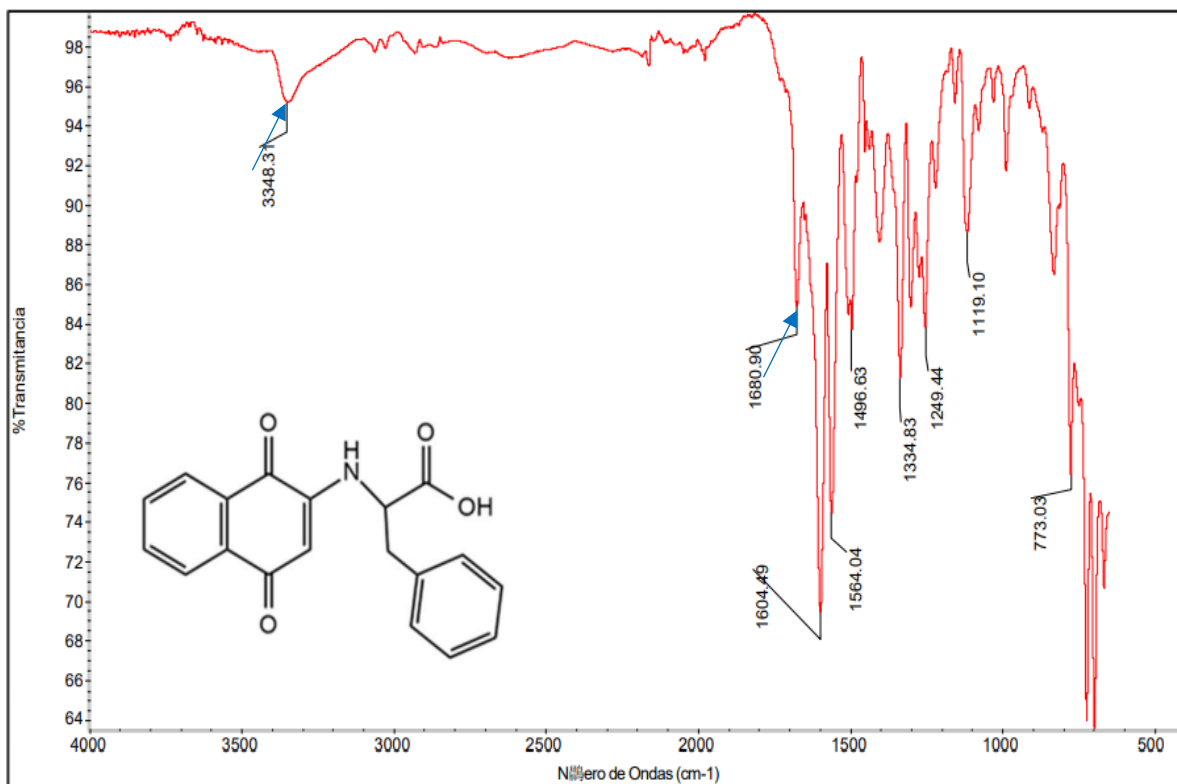


Figura 25. Espectro IR del compuesto AF2

7.2. Obtención de aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial se probaron y compararon diferentes condiciones y metodologías con el fin de optimizar el método de extracción de aceite esencial en el grupo de investigación. En la Tabla 5 se muestran los diferentes métodos y las condiciones utilizadas, así como la cantidad de aceite recuperado.

Tabla 5. Condiciones de trabajo para las diferentes metodologías de obtención de aceite esencial.

Método	Tiempo de trabajo	Cantidad de planta	Condiciones	Cantidad de aceite recuperada
DAV	5 ciclos de 12h	3Kg	T ebullición	3mL
DAPVAD	2 ciclos de 12h	3Kg	T= 93°C	~1mL
HAMW	1 ciclo de 2h	3Kg	T ebullición Potencia: 450W	5mL

DAV: Destilación por arrastre de vapor

DAPVAD: Destilación por arrastre de vapor asistida por destilador

HAMW: Hidrodestilación asistida por microondas

El método óptimo para extraer el aceite esencial fue por el método de hidrodestilación asistida por microondas, donde además de disminuir el tiempo de trabajo considerablemente, de 60 a 2 h respecto a la destilación por arrastre de vapor y de 24 a 2 h con la destilación por arrastre de vapor asistida por destilador, también se obtuvo mayor cantidad de aceite esencial recuperado. Además, representa una metodología más amigable con el ambiente tanto por el ahorro en el gasto energético ya mencionado, como por la reducción en la cantidad de éter etílico necesario para la recuperación del aceite esencial lo que evita manipular

mayor cantidad del solvente inflamable, muy volátil y que puede formar peróxidos explosivos, evitando así el riesgo de fuego o explosión.

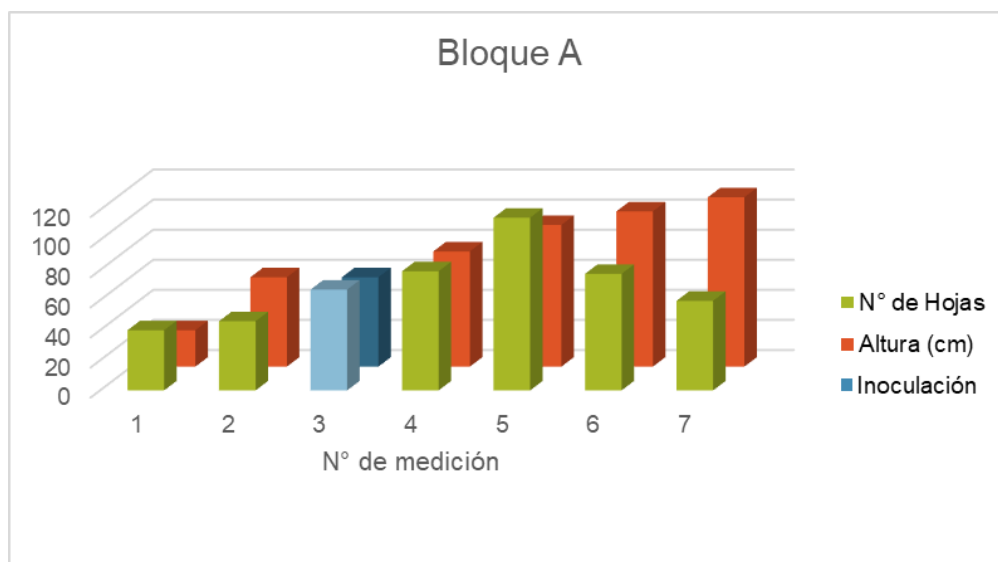
7.3. Determinación de la fitopatogenicidad de Cmm

Dos semanas después de la inoculación comenzaron a aparecer los síntomas de la enfermedad del cáncer bacteriano, algunos de los síntomas detectados fueron: deformidad y marchitamiento en hojas, daños en tallo, aparición de manchas en frutos y aborto de flores (Figura 26-A). Fue en este punto donde se tomó la muestra para la detección de Cmm en las plantas infectadas. Finalmente, al mes después de la inoculación la enfermedad ya estaba muy avanzada y las plantas comenzaron a marchitarse y morir (Figura 26-B).

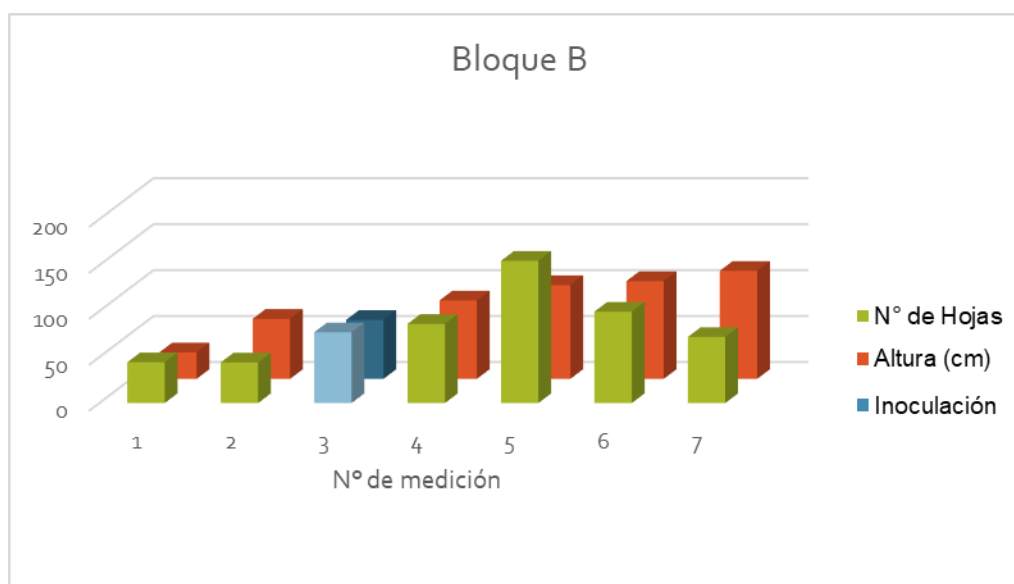


Figura 26. Determinación de la fitopatogenicidad: A) Aparición de síntomas de la enfermedad y B) Marchitamiento de plantas.

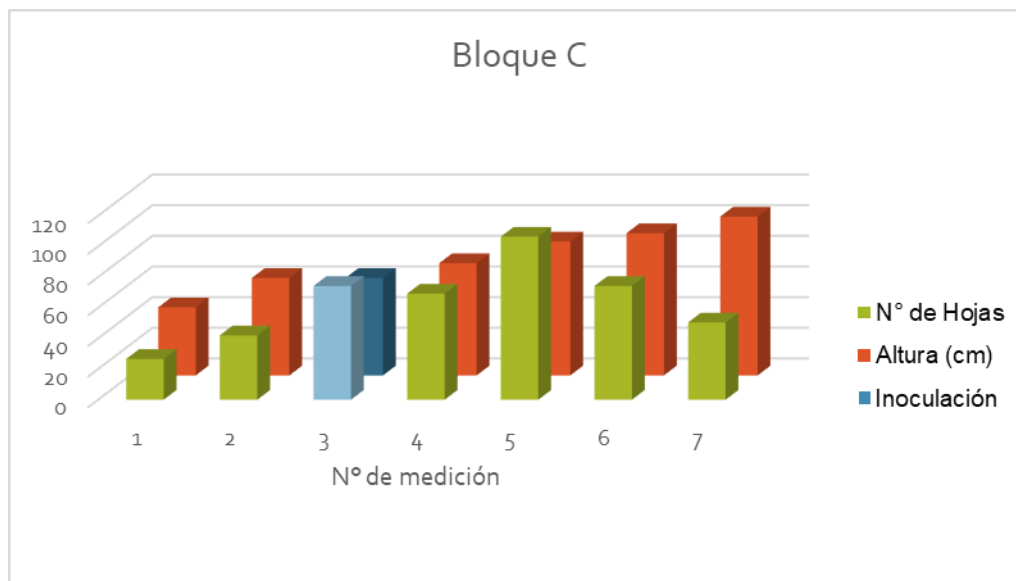
Las medias de las mediciones realizadas para el seguimiento del crecimiento de las plantas se muestran en las siguientes gráficas (1-5):



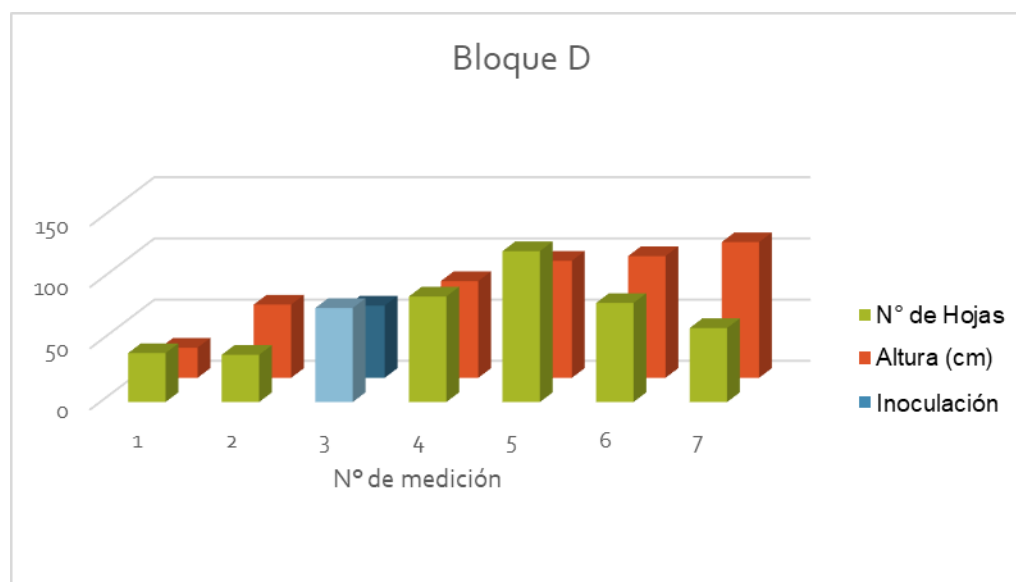
Gráfica 1. Datos del crecimiento de las plantas del bloque A



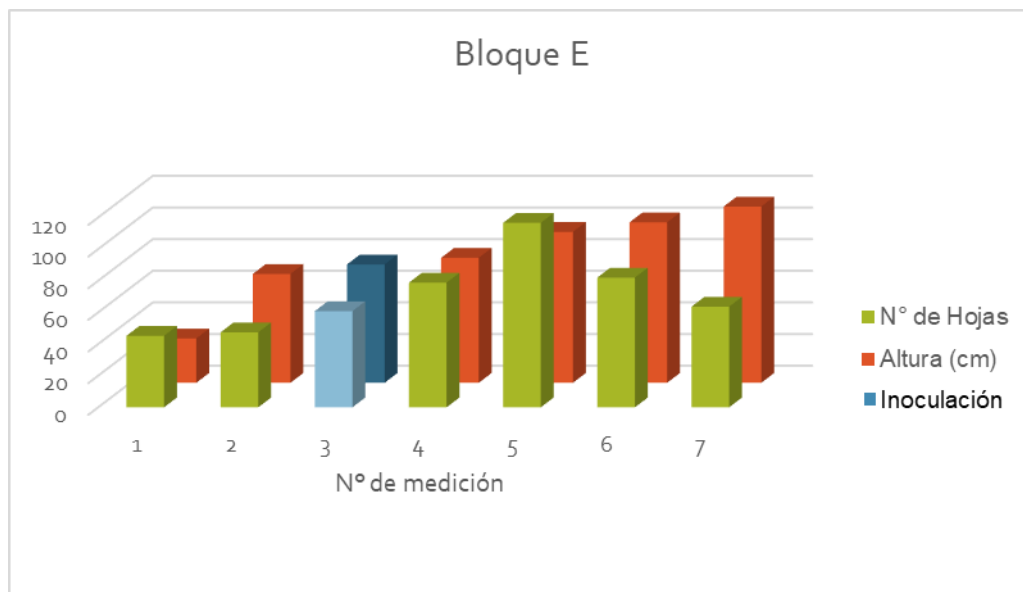
Gráfica 2. Datos del crecimiento de las plantas del bloque B



Gráfica 3. Datos del crecimiento de las plantas del bloque C

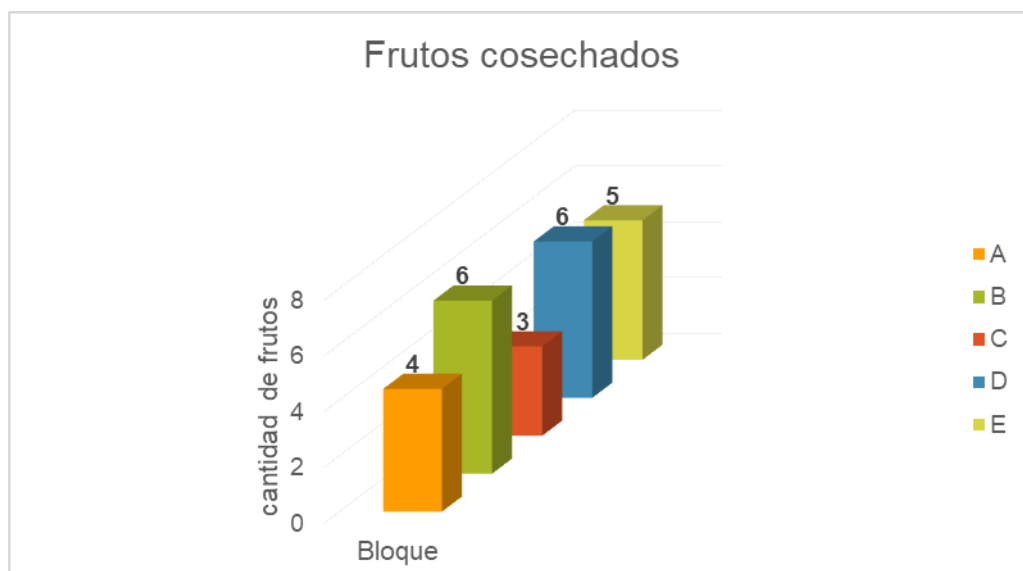


Gráfica 4. Datos del crecimiento de las plantas del bloque D



Gráfica 5. Datos del crecimiento de las plantas del bloque E

En las gráficas 1-5 se muestra que posterior a la inoculación hubo una disminución en el número de hojas de las plantas de todos los bloques, lo que nos indica que la enfermedad comenzó a desarrollarse. Por otra parte, el aumento en la altura de la planta no se vio afectado por la bacteria.



Gráfica 6. Frutos cosechados en la semana ocho del experimento

En la gráfica 6 se muestra la cantidad de frutos cosechados en promedio fue 5, lo cual es un valor muy bajo comparado con rendimientos habituales en las plantas de jitomate que son de aproximadamente 30 frutos/planta (Villegas *et al*, 2004). Por lo tanto, se determina que si se vio afectado el rendimiento del cultivo. Respecto al aspecto del fruto, estos presentaban un tamaño regular y la mayoría presentaba las manchas o “chancros” características de la enfermedad del cáncer bacteriano (Figura 27).



Figura 27. Fruto infectado con Cmm, manchas conocidas como “chancros” u “ojo de pájaro”

Como se puede apreciar las plantas fueron inoculadas exitosamente ya que el 100% de estas se vieron dañadas por Cmm y se corroboró que la bacteria conservaba su fitopatogenicidad.

7.3.1. Detección de Cmm en plantas infectadas

Posteriormente a la infección de la planta y la extracción por maceración de las bacterias del material vegetal. Se llevo a cabo la siembra en medio LB sólido (Figura 28).

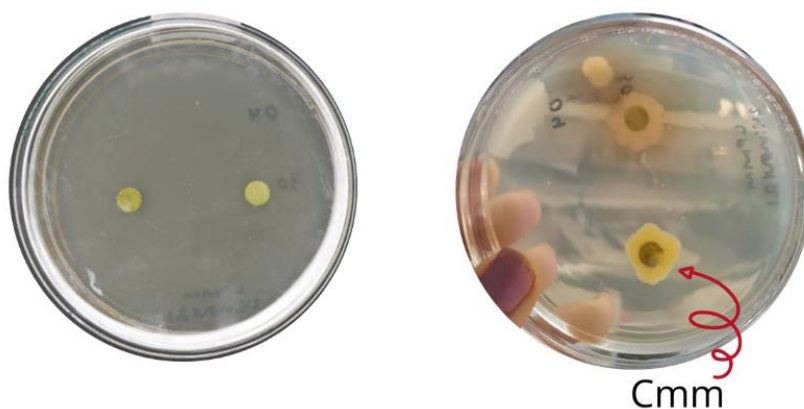


Figura 28. A) Muestra colocada y B) Muestra a las 48 h.

En la Tabla 6 se muestran las características macroscópicas observadas en la bacteria (Cmm) aislada, las cuales concuerdan con las descritas por Borboa y colaboradores (2009).

Tabla 6. características macroscópicas detectadas en la bacteria (Cmm) aislado

Característica	Observación literatura	Observación experimental
Color	Amarillo claro a naranja	Naranja
Movilidad	No móvil	No móvil
Consistencia	Mucoide	Mucoide
Tipo de bacteria	Gram positivo	Gram positivo
Forma	Bacilo	Bacilo

Estos resultados indicaron que la bacteria aislada de las plantas correspondía a Cmm y como se mencionó anteriormente conservaba su fitopatogeneicidad por lo cual pudo ser utilizada para el estudio microbiológico después de ser purificada.

7.3.2. Purificación de Cmm

Para llevar a cabo la purificación de la bacteria de interés se tomó con un asa calibrada los microorganismos que habían crecido y se sembraron en diferentes cajitas Petri con medio LB y se incubaron a 29°C. Pasadas 48 h se observó el crecimiento de los microorganismos, donde pudimos apreciar por sus características, lo que parecía un hongo (Figura 29-A), en otra caja se apreció a Cmm pero no estaba completamente puro aún (Figura 29-B) por lo que de esta se tomó nuevamente una muestra con asa calibrada y se incubó a 29°C por 48 h. En esta ocasión se observó el crecimiento de Cmm puro (Figura 29-C).

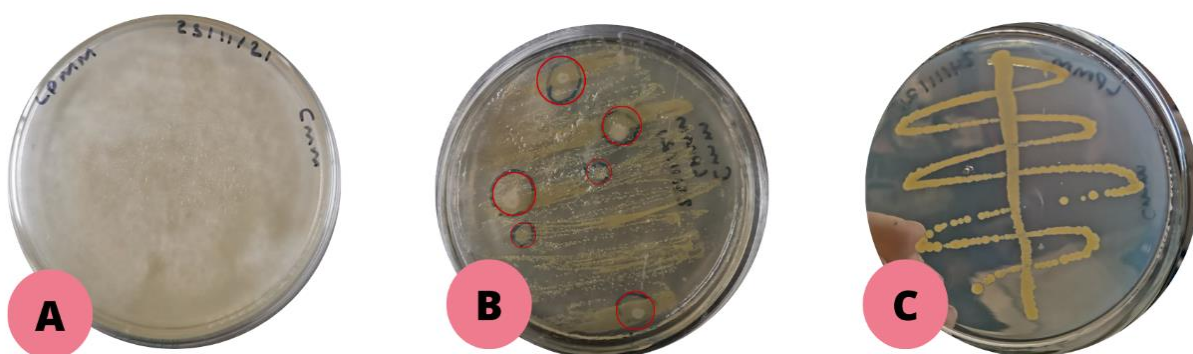


Figura 29. Purificación de la bacteria: A) Crecimiento de hongo, B) Crecimiento de Cmm no puro, C) Crecimiento de Cmm puro.

7.4. Determinación de actividad antibacteriana: método de difusión en pozo

Como se mencionó en la metodología (sección 6.5.3.3), en cajas de Petri se realizaron pozos y se sembró con Cmm puro, para posteriormente adicionar al pozo cada tratamiento y concentración por triplicado. Las cajas se incubaron a 29°C y se fueron midiendo los halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas.

7.4.1. Derivados de naftoquinonas

7.4.1.1. Análisis estadístico

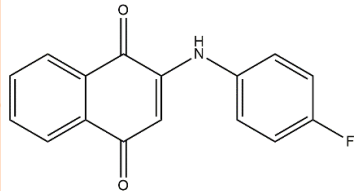
Los resultados de análisis estadístico se muestran en la Tabla 7 e indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) tanto para los compuestos como para las concentraciones.

Tabla 7. Análisis de varianza de las variables evaluadas en las pruebas in vitro de inhibición de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

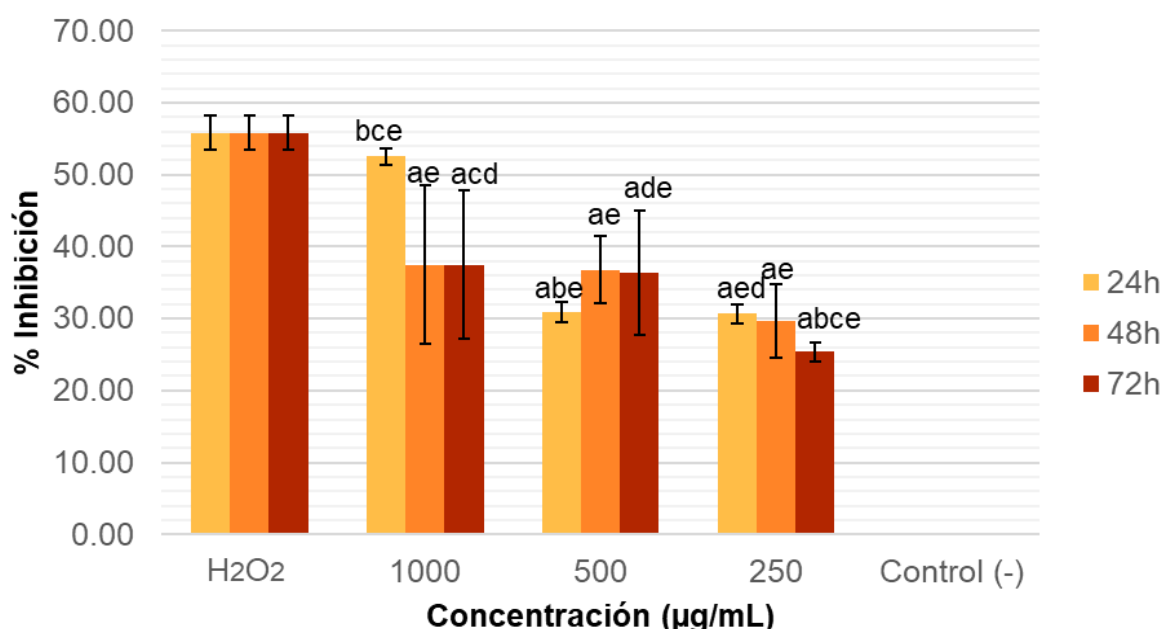
Análisis de varianza de diámetro (Cm)					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	4	3.186	0.7965	3.74	0.008
Concentración	2	2.759	1.3797	6.47	0.003
Tratamiento*Concentración	8	3.357	0.4196	1.97	0.062
Error	75	15.993	0.2132		
Total	89	25.295			

Compuesto 1

Tabla 8. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto 1

C \ t	24h	48h	72h	
250 µg/mL	30.67±1.35	29.66±5.05	25.38±1.37	
500 µg/mL	30.86±1.39	36.79±4.69	36.39±8.58	
1000 µg/mL	52.53±1.13	37.46±11.02	37.46±10.33	

La gráfica 7 muestra que el compuesto **1** fue eficaz ($P<0.05$) independientemente de la concentración (250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) y el tiempo de exposición (24, 48 y 72h) comparado con el control negativo. Sin embargo, no mostró ser eficiente, frente al control positivo que obtuvo mayor porcentaje de inhibición. Se observó una diferencia significativa entre control positivo (H_2O_2) a todas las concentraciones (250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) y tiempos de exposición (24, 48 y 72h), excepto para la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h, donde a esta concentración el tratamiento presentó un porcentaje de inhibición de 52.53% muy cercano al control positivo 55.83% (tabla 8). No obstante, disminuyó su eficacia a las 48 y 72h mostrando un comportamiento similar a las concentraciones 250 y 500 $\mu\text{g/mL}$ en todos los tiempos, lo cual podría deberse a que el compuesto C1 fue metabolizado por la bacteria.



Gráfica 7. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto **1** a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: $[\text{X}] \neq \text{H}_2\text{O}_2$, b: $[1000] \neq [500]$, c: $[1000] \neq [250]$, d: $[500] \neq [250]$ y e: $\text{Concentración} \neq \text{Control (-)}$. El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.

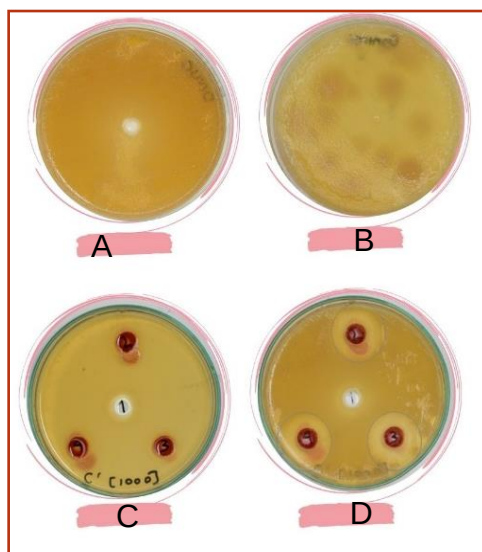


Figura 30. Inhibición de C1: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con C1 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con C1 [1000] al t= 72 h.

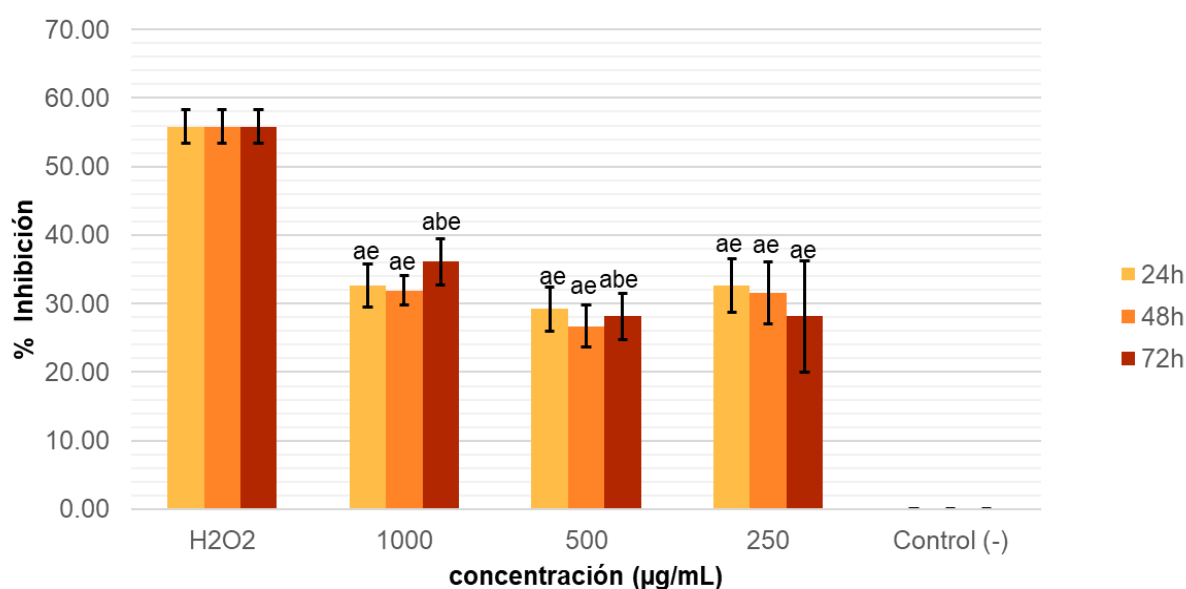
Por otra parte, como se puede observar en la Figura 30-A, el DMSO utilizado como vehículo no presentó inhibición.

Compuesto 3

Tabla 9. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto 3

C \ t	24h	48h	72h	
250 µg/mL	32.66±3.95	31.56±4.52	28.13±3.42	
500 µg/mL	29.24±3.19	26.7±3.06	28.13±3.42	
1000 µg/mL	32.63±3.12	31.93±2.09	36.09±3.42	

La gráfica 8 muestra que el compuesto **3** fue eficaz ($P<0.05$) independientemente de la concentración (250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) y el tiempo de exposición (24, 48 y 72h) comparado con el control negativo. Sin embargo, no mostró ser eficiente, frente al control positivo que obtuvo mayor porcentaje de inhibición. Se aprecia una diferencia significativa en la concentración 1000 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$ a las 72h de 36.09% a 28.13% respectivamente (tabla 9).



Gráfica 8. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto **3** a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: $[X]\neq\text{H}_2\text{O}_2$, b: $[1000]\neq[500]$, c: $[1000]\neq[250]$, d: $[500]\neq[250]$ y e: Concentración $\neq$ Control (-). El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.

La diferencia entre **C1** y **C3** es la presencia de un átomo de F en la posición *orto*, como se observa en los resultados obtenidos un átomo de flúor adicional no presenta una mejora en la actividad antibacteriana contra Cmm, siendo mejor el **C1** al presentar mayor inhibición.

Se observó que a una mayor concentración se obtiene una mayor inhibición. De igual manera el DMSO no presentó inhibición (Figura 31-A).

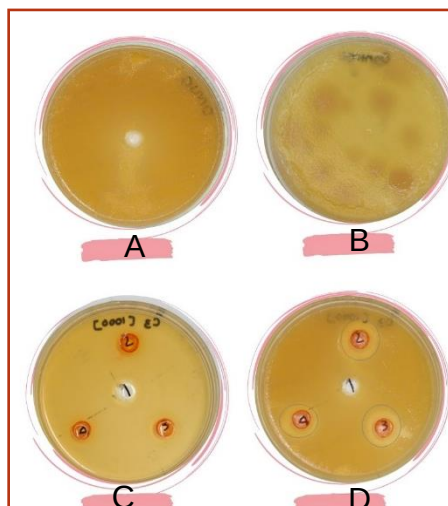
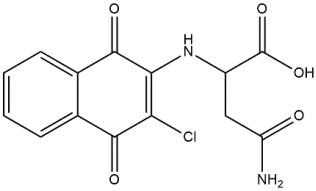


Figura 31. Inhibición de C3: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con C3 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con C3 [1000] al t= 72 h.

Compuesto AA1

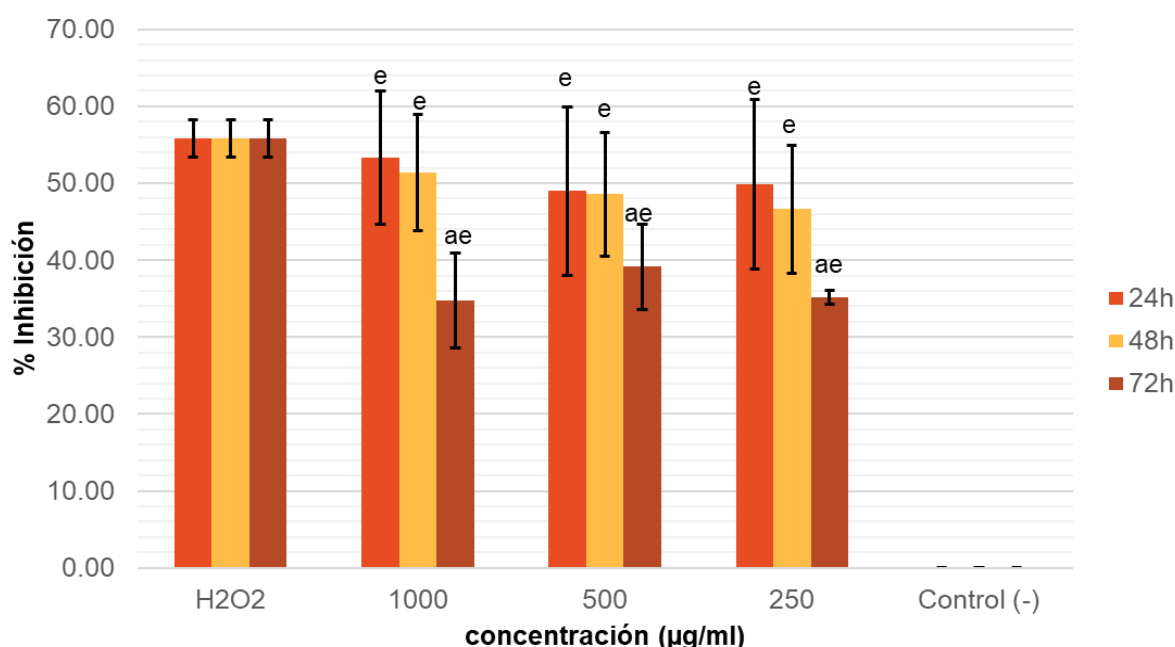
Tabla 10. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto AA1

C \ t	24h	48h	72h	
250 µg/mL	49.85±11	46.61±8.36	35.32±7.82	
500 µg/mL	48.96±10.94	48.56±8	35.17±0.86	
1000 µg/mL	53.33±8.68	51.41±7.53	46.02±8.11	

La gráfica 9 muestra que el compuesto **AA1** fue eficaz ($P<0.05$) independientemente de la concentración (250, 500 y 1000µg/mL) y el tiempo de exposición (24, 48 y 72h) comparado con el control negativo. Sin embargo, no mostró ser eficiente, frente al

control positivo (H_2O_2) que obtuvo mayor porcentaje de inhibición. El compuesto AA1 resultó ser el que mostró los mejores resultados de todos los compuestos sintetizados.

Se aprecia que a todas las concentraciones (250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) disminuye el porcentaje de inhibición conforme aumenta el tiempo, siendo las 72h el tiempo con los valores más bajos, llegando hasta 35.17% (tabla 10), demostrando incluso una diferencia significativa contra el control positivo (H_2O_2). Por otra parte, al aumentar la concentración aumentaba la actividad inhibitoria contra Cmm.



Gráfica 9. Comparación de los porcentajes de inhibición para el compuesto AA1 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: $[X]\neq\text{H}_2\text{O}_2$, b: $[1000]\neq[500]$, c: $[1000]\neq[250]$, d: $[500]\neq[250]$ y e: Concentración $\neq$ Control (-). El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.

En este caso el DSMO tampoco presentó inhibición (Figura 32-A)

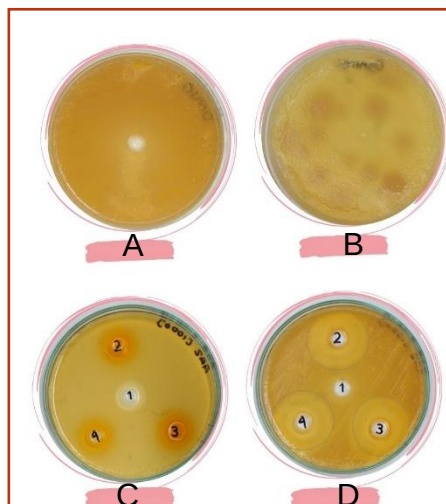
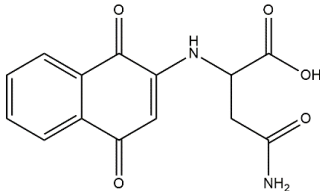


Figura 32. Inhibición de AA1: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con AA1 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con AA1 [1000] al t= 72 h.

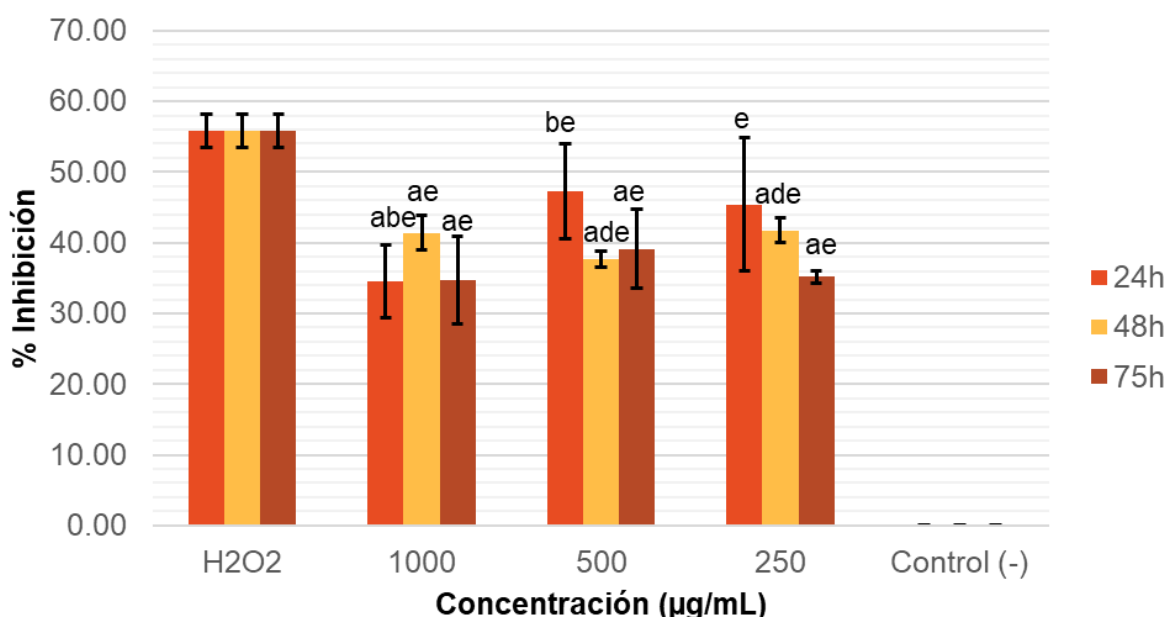
Compuesto AA2

Tabla 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto AA2

C \ t	24h	48h	72h	
250 µg/mL	45.38±9.42	41.77±1.75	35.17±0.86	
500 µg/mL	47.28±6.76	37.68±1.13	39.14±5.55	
1000 µg/mL	34.54±5.13	41.38±2.48	34.71±6.16	

La gráfica 10 muestra que el compuesto **AA2** fue eficaz ($P < 0.05$) independientemente de la concentración (250, 500 y 1000 µg/mL) y el tiempo de exposición (24, 48 y 72h)

comparado con el control negativo. Sin embargo, no mostró ser eficiente, frente al control positivo (H₂O₂) que obtuvo mayor % inhibición. También presenta una relación



Gráfica 10. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto AA2 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: [X] $\neq$ H₂O₂, b: [1000] $\neq$ [500], c: [1000] $\neq$ [250], d:[500] $\neq$ [250] y e:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.

Se apreció que la tendencia a disminuir su actividad conforme pasa el tiempo de exposición, lo cual se puede deber a que a esa concentración existió una saturación del compuesto, lo que pudo generar conglomerados que impidieron la entrada en la bacteria por la posible formación de mayor número de puentes de hidrógeno. Por lo tanto, en este caso la concentración con mejor actividad fue a 500 µg/mL al tiempo 24h con un 47.28% (tabla 11), Figura 33-D. De igual manera que en los tratamientos anteriores el DMSO no presentó inhibición (Figura 33-A).

Los resultados muestran que la presencia del átomo de cloro en la molécula, **AA1**, aumenta la inhibición ya que se obtuvieron mejores resultados con la molécula clorada, que con la que no tiene átomo de cloro **AA2**. En cuanto a la presencia del aminoácido asparagina en el núcleo de la naftoquinona los resultados indican que favorece la

actividad antibacteriana frente a Cmm ya que **AA1** y **AA2** presentaron mejor inhibición que **C1** y **C3**.

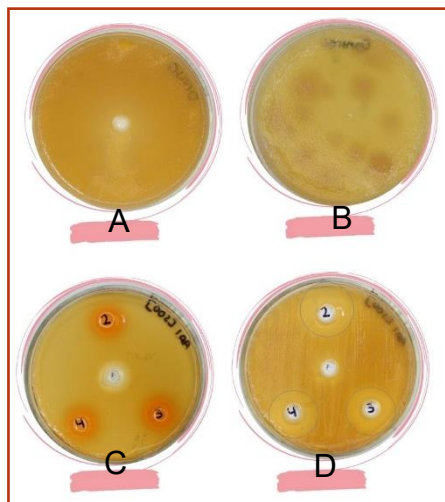
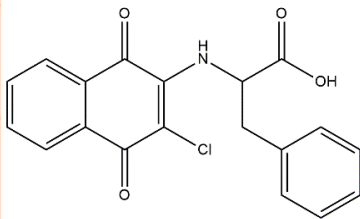


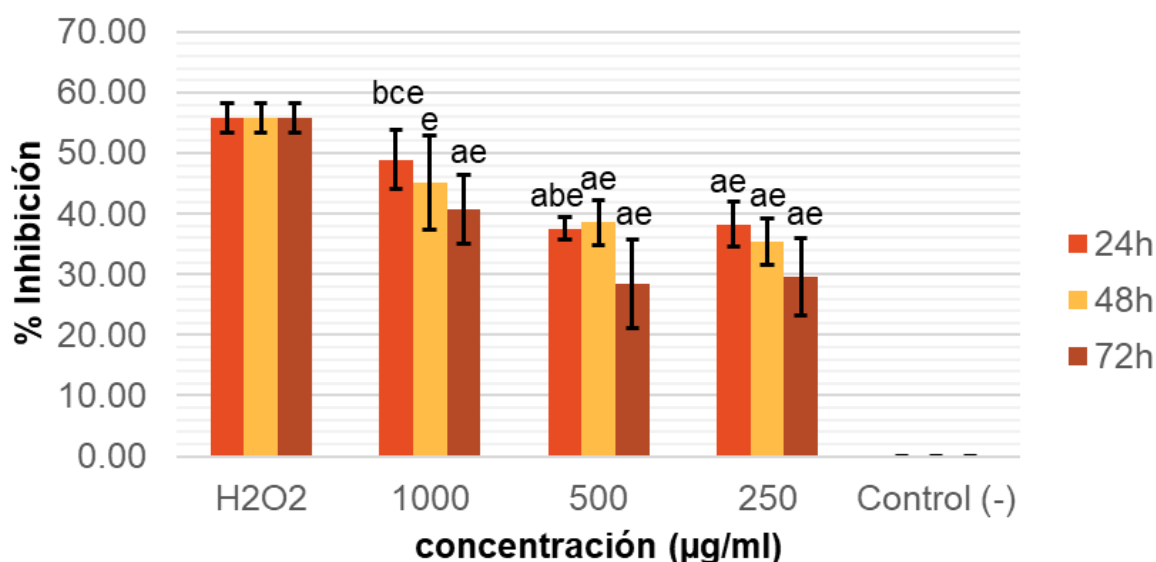
Figura 33. Inhibición de AA2: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con AA2 [500] al t= 0 h, D) Cmm con AA2 [500] al t= 24 h.

Compuesto AF1

Tabla 12. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto AF1

C \ t	24h	48h	72h	
250 µg/mL	38.23±3.67	35.38±3.88	29.66±6.33	
500 µg/mL	37.58±1.95	38.59±3.72	28.44±7.34	
1000 µg/mL	48.93±4.95	45.14±7.68	40.67±5.67	

La gráfica 11 muestra que el compuesto **AF1** fue eficaz ($P<0.05$) independientemente de la concentración (250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) y el tiempo de exposición (24, 48 y 72h) comparado con el control negativo. Sin embargo, no mostró ser eficiente, frente al control positivo que obtuvo mayor porcentaje de inhibición siendo a la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h el valor más cercano al control positivo con un valor de 41.38% (tabla 12). Se observó una diferencia significativa entre control positivo (H_2O_2) a todas las concentraciones (250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) y tiempos de exposición (24, 48 y 72h).



Gráfica 11. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto AF1 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: $[\text{X}] \neq \text{H}_2\text{O}_2$, b: $[1000] \neq [500]$, c: $[1000] \neq [250]$, d: $[500] \neq [250]$ y e: Concentración $\neq$ Control (-). El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.

En este tratamiento de igual manera no se observó inhibición por parte del DMSO, Figura 34-A.

Estos resultados corroboran que la adición de aminoácidos al núcleo de la naftoquinona mejora la inhibición del crecimiento de Cmm ya que presentó mejor inhibición que **C1** y **C3**.

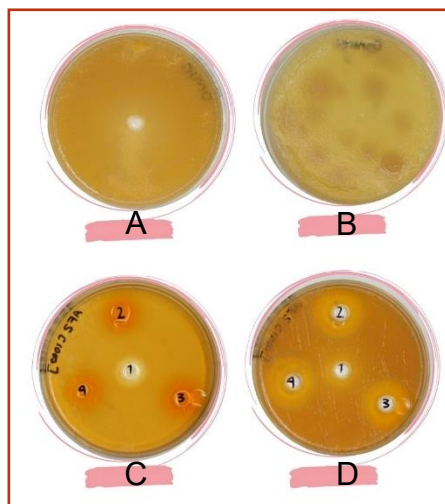
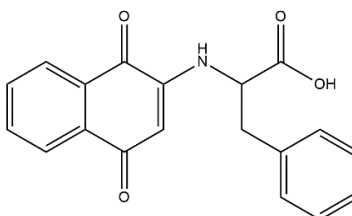


Figura 34. Inhibición de AF1: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con AF1 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con AF1 [1000] al t= 72 h.

Compuesto AF2



En este caso, el compuesto **AF2** no se presentó inhibición en ninguna de las concentraciones a las 72 horas indicando que la ausencia del átomo de cloro y el aminoácido fenilalanina disminuyen la actividad antibacteriana frente a Cmm.

De manera general, excepto por el compuesto **AF2**, se puede decir que los compuestos conservan su actividad inhibitoria por 48 horas ya que es hasta las 72 horas donde esta disminuye. El control positivo empleado es altamente potente contra Cmm y al tener valores muy cercanos se puede apreciar la potencia que presentan los derivados de naftoquinona, ya que comparando con halos de inhibición obtenidos para antibióticos empleados actualmente como estreptomicina (~20mm) y ácido nalidíxico (~2mm) (Borboa, 2010), siguen siendo mayores los valores obtenidos.

7.4.2. Extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis*

7.4.2.1. Análisis estadístico

Los resultados de análisis estadístico se muestran en la Tabla 13 e indican que existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de extracto etanólico y el aceite esencial.

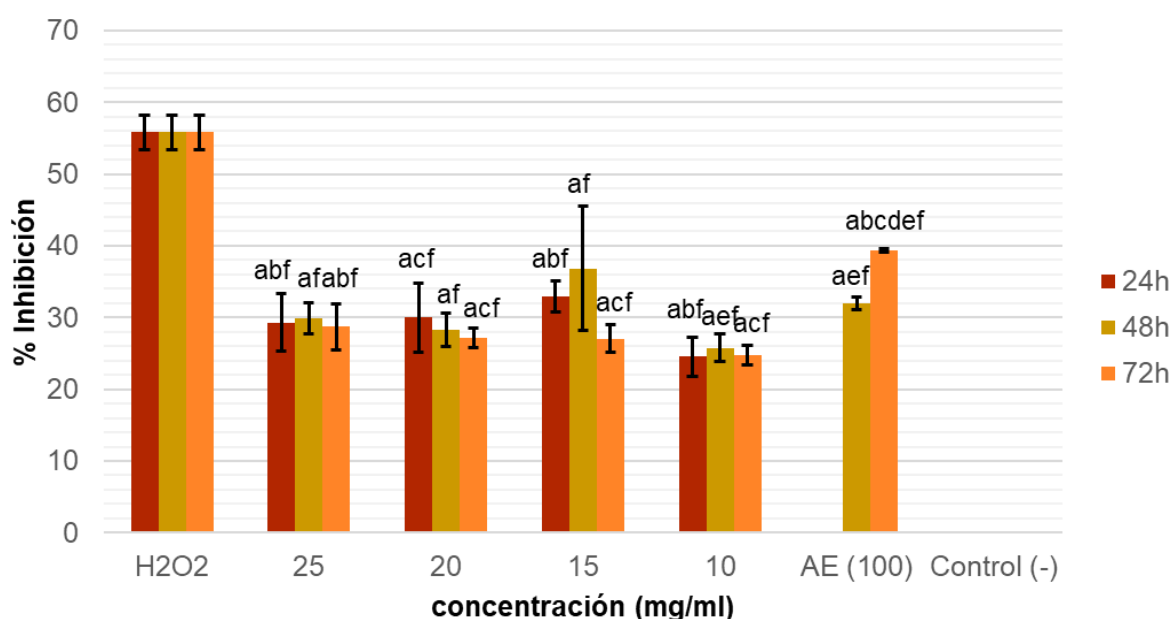
Tabla 13. Análisis de varianza de las variables evaluadas en las pruebas in vitro de inhibición de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Análisis de varianza de Halo de inhibición (Cm)					
Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	4	1.9153	0.47881	38.46	0.000
Error	25	0.3113	0.01245		
Total	29	2.2265			

Tabla 14. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm para el extracto etanólico y el aceite esencial de MO

C \ t	24h	48h	72h
10 mg/mL	24.57±2.73	25.77±1.90	24.69±1.38
15 mg/mL	32.90±2.20	36.82±8.63	27.04±1.91
20 mg/mL	29.97±4.83	28.27±2.34	27.16±1.38
25 mg/mL	29.32±4.04	29.91±2.13	28.70±3.16
100%	0±0	31.99±0.94	39.35±0.26

La Gráfica 12 se muestra que tanto el extracto etanólico como el aceite esencial de MO fueron eficaces ($P < 0.05$) independientemente de la concentración (10, 15, 20, 25 y 100mg/mL) y el tiempo de exposición (24, 48 y 72h) comparado con el control negativo. Sin embargo, no mostró ser eficiente, frente al control positivo que obtuvo mayor porcentaje de inhibición. Se observó una diferencia significativa entre control positivo (H_2O_2) a todas las concentraciones (10, 15, 20, 25 y 100mg/mL) y tiempos de exposición (24, 48 y 72h).



Gráfica 12. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el extracto etanólico y el aceite esencial de MO a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P < 0.05$ donde a: Concentración $\neq$ H₂O₂, b: [25] $\neq$ [100], c: [20] $\neq$ [100], d: [15] $\neq$ [100], e: [10] $\neq$ [100], y f: Concentración $\neq$ Control (-). El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.

No se aprecia diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del extracto (10, 15, 20, 25mg/mL), pero si entre todas las concentraciones y tiempos contra el aceite esencial a las 72h, excepto por el extracto a una concentración de 15mg/mL a las 48h.

Para los estudios de MO el aceite esencial mostró mejor actividad antibacteriana frente a Cmm con un 39.45%. En el caso del extracto etanólico la inhibición se incrementó ligeramente con el aumento de la concentración, aunque no llegó a ser mejor que la presentada por el aceite esencial (Tabla 14). Para el caso del etanol, al igual que el DMSO, no mostró inhibición como se puede observar en la Figura 30-B. En la Figura 30-D y A se aprecia la inhibición del extracto etanólico a 25 mg/mL y del aceite esencial, respectivamente.

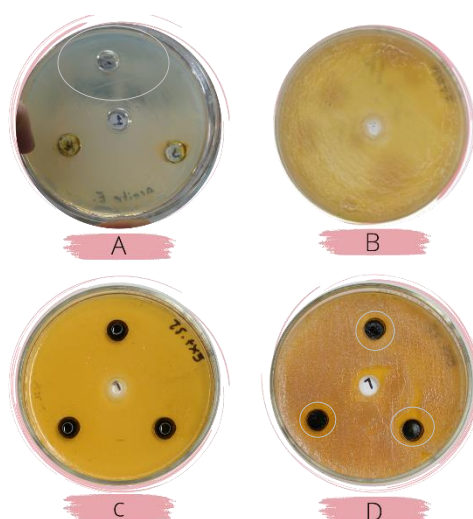


Figura 35. Inhibición de productos de MO: A) Aceite esencial a las 72h, B) EtOH, C) Cmm con extracto etanólico [25] al t= 0 h, D) Cmm con extracto etanólico [25] al t=72 h.

8. CONCLUSIONES

- La cepa de Cmm utilizada en el estudio conservaba su viabilidad y fitopatogenicidad ya que generó la enfermedad en las plantas inoculadas llegando a marchitarla e incluso morir, lo que evidencia la importancia de encontrar soluciones a este problema que afecta la agricultura de nuestro país.
- Los estudios *in vitro* muestran que tanto los compuestos sintetizados, excepto AF1, al igual que el extracto etanólico y aceite esencial de *Melissa officinalis* tienen actividad inhibitoria contra Cmm.
-
- De los compuestos sintetizados el que presentó mejor actividad inhibitoria contra Cmm fue el AA2 a 1000 µg/mL con 46.02% de inhibición.
- La comparación de los resultados de los compuestos sintetizados indica que la presencia de aminoácidos mejora la actividad antibacteriana contra Cmm. Así como la presencia del halogeno en la 1,4-naftoquinona presenta mejor actividad, lo cual también fue observado en el trabajo de Rivera-Avalos y colaboradores (2019).
- El aminoácido con mejor actividad antibacteriana fue asparagina, en comparación con fenilalanina, lo cual coincide con el estudio *in vitro* por Janeczko y colaboradores (2016), donde fenilalanina fue uno de los aminoácidos con menor actividad antibacteriana.
- En investigaciones previas ya se había probado la actividad antibacteriana de extractos y el aceite esencial de *Melissa officinalis* contra otras bacterias patógenas humanas, sin embargo, no contra bacterias fitopatógenas. Esta investigación confirma la actividad antibacteriana de MO contra la bacteria fitopatógena Cmm, lo cual contribuye de manera significativa a los efectos biológicos de la especie.

- De los estudios con la planta se concluye que la mejor metodología para la obtención del aceite esencial fue la hidrodestilación asistida por microondas. Sobre su efecto antimicrobiano, fue el aceite esencial fue el que presentó mayor actividad inhibitoria contra Cmm, con una inhibición del 39.45% comparada con el extracto etanólico que tuvo 28.70% de inhibición a una concentración de 20 mg/mL.
- Respecto a los extractos etanólicos de MO se encontró también que la actividad antibacteriana aumenta a una mayor concentración, lo cual coincide con el estudio de Rabbani y colaboradores (2016), donde a 25mg/mL se obtiene un mayor halo de inhibición.
- De los 6 tratamientos estudiados se infiere que el aceite esencial o el compuesto AA2 a 1000 µg/mL son alternativas para generar una solución al problema del cáncer bacteriano en los cultivos de jitomate, ya que presentan un halo de inhibición mayor al reportado para antibióticos como estreptomina y ácido nalidíxico, empleados actualmente (Borboa, 2010). El aceite esencial al ser obtenido de la planta de *Melissa officinalis* puede presentar una alternativa para el tratamiento, por otro lado, el compuesto AA2 pudiera no presentar fitotoxicidad debido a que en un estudio anterior (Monreal, 2020) el derivado de naftoquinona con metionina fue estudiado en cultivos de tomate verde y las plantas no presentaron señales de daño, aunque es necesario realizar estudios posteriores para confirmar la seguridad de estos tratamientos contra Cmm.
-
- La alta fitopatogenicidad de Cmm resultó ser una de las limitantes para el presente trabajo, ya que mató el cultivo establecido y debido al tiempo que requiere el manejo los residuos y la desinfección del invernadero, fue imposible volver a establecer el cultivo para realizar pruebas *in vivo*.

9. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

- ✓ Realizar un estudio en invernadero para garantizar la efectividad de los mejores tratamientos en la planta infectada.
- ✓ Hacer un estudio de la fitotoxicidad de los tratamientos, así como verificar su permanencia en el fruto o en el sustrato, y garantizar el uso seguro de estos tratamientos.
- ✓ Determinar si la actividad del extracto etanólico y el aceite esencial de MO es bacteriostática o bactericida.
- ✓ Probar otros derivados de 1,4-naftoquinona aminoácidos.
- ✓ Determinar la composición del aceite esencial y los extractos etanólicos, para poder determinar cuáles son los metabolitos secundarios que presentan actividad antibacteriana.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Afrasiabi, Z., Sinn, E., Chen, J., Ma, Y., Rehingold, A. L., Zakharov, L. N., Rath, N. & Padhye S. (2004). Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of *ortho*-naphthaquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. *Inorgánica Chimica Acta*, 357 (1), 271-278. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(03\)00484-5](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(03)00484-5)
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., & Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, 11, 657-661. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.07.014>
- Andrade, G. M. L., López, L. Ll. I., & Sáenz, G.A. (2011). Estudio sintético y caracterización por infrarrojo de derivados 2-(amino)-1,4-naftoquinona y su evaluación antibacteriana preliminar. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14 (2), 75-82.
- Ashori, A., Hamzeh, Y., & Amani, F. (2011). Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Stalk: Chemical Composition and Fiber Morphology. *Journal of Environmental Polymer Degradation*. 19, 297-300. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-010-0279-8>
- Barnes, L. W. (1994). The role of plant clinics in disease diagnosis and education. A North American Perspective. *Annual Review of Phytopathology*. 32, 601-609. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.003125>
- Borboa, F. J., Rueda, P. E., Acedo, F. E., Ponce, M. J. F., Cruz, M., Grimaldo, J. O. & García, O. A. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecies *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32 (4), 319-326.
- Cantú, G. R. N., Palomo, L. L., Nery, F. S. D., López, L. Ll. I., & Bermúdez, B. L. (2012). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*, 14(2), 48-56.

- Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81, 1276-1281.
- EPPO. (2016). *PM 3/80 (1) Consignment inspection of seed of Solanum lycopersicum*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 46 (1), 68-72. <https://doi.org/10.1111/epp.12272>
- Estrada, R. D. (2017). *La gestión del agua en el ejido Las Moras, Mexquitic de Carmona, San Luis Potosí*. [Tesis de maestría, El Colegio de San Luis, A.C.]. <https://biblio.colsan.edu.mx/tesis/EstradaRomeroDaniela.pdf>
- Fernández, N., Viciano, V. & Drovandi, A. (2003). Valoración del impacto ambiental total por agroquímicos en la cuenca del río Mendoza. Proyecto OEI/DGI Barcala y Av. España (5500). Mendoza, Argentina. <https://www.ina.gob.ar/archivos/pdf/CRA-IIIFERTI/CRA-RYD-6-Fernandez.pdf>
- Ferreira D.T., Andrei C.C., Ostrensky H., Saridakis Faria, T.J., Vinhato E., Carvalho K.E., Feijó J., Daniel S., Machado S.L., Saridakis D.P., & Braz-Filho, R. (2004). Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian Drosera. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 99 (7), 753-755. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000700016>
- Guerrero, R., Mónaco, C., Stocco, M., Rolleri, J., & Guerrero, N. (2017). Selección de asilamientos de trichoderma spp. Para el control del cáncer bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) del tomate (*Lycopersicum esculentum* mil.). *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 6 (1), 9-20.
- Janeczko, M., Demchuk, O. M., Strzelecka, D., Kubiński, K., & Masłyk, M. (2016). New family of antimicrobial agents derived from 1,4-naphthoquinone. *European Journal of Medical Chemistry*, 29 (124), 1019-1025. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.034>
- Leyva, E., Loredó-Carrillo, S. E., López, L. I., Escobedo-Avellaneda, E. G., & Navarro-Tovar, G. (2017). Importancia química y biológica de naftoquinonas. Revisión

- bibliográfica. *Afinidad. Journal of Chemical Engineering Theoretical and Applied Chemistry*, 74 (577). <https://raco.cat/index.phttps://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320755.hp/afinidad/article/view/320755>
- Leyva, E., López, L. I., de la Cruz, R. F. G., & Espinosa, G. C. G. (2017). Synthesis and studies of the antifungal activity of 2-anilino-/2,3-dianilino-/2-phenoxy- and 2,3-diphenoxy-1,4-naphthoquinones. *Research on Chemical Intermediates*, 43(3), 1813–1827. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2732-3>
- López, L. L. I., Nery, F. S. D., Silva, B. S. Y., & Sáenz, G. A. (2014). Naphthoquinones: Biological properties and synthesis of lawsone and derivatives — a structured review. *Vitae*, 21(3), 248–258.
- López, L. L. I., Leyva, E., & García, C. R. F. (2011). Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. *Revista Mexicana de ciencias Farmacéuticas*, 42 (1), 6-17.
- López-López, L. I., Rivera-Ávalos, E., Villarreal-Reyes, C., Martínez-Gutiérrez, F., & de Loera, D. (2022). Synthesis and Antimicrobial Evaluation of Amino Acid Naphtoquinone Derivates as Potential Antibacterial Agents. *Chemotheraphy*, 67, 102-109. <https://doi.org/10.1159/000521098>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(6), 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- McManus, P. S. (1999). Uso de antibióticos en el control de enfermedades de las plantas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 19 (4), 192-196.

- Meftahizade, H., Lotfi, M. & Moradkhani, H. (2010). Optimization of micropropagation and establishment of cell suspension culture in *Melissa officinalis* L. *African Journal of Biotechnology*, 9 (28), 4314- 4321.
- Monreal, M. L. P. (2020). *Actividad Antiviral de Naftoquinonas en Cultivo Hidropónico de Tomate de Cáscara (Physalis ixocarpa Brot)*. [Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí].
- Naghsh, N., Doudi, M., & Nikbakht, Z. (2013). Investigation between Alcoholic Extract and Essential Oil *Melissa Officinalis* L. New in Growth Inhibition of *E. coli*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 15 (8), 42-45.
- NOM-007-FITO-1995, Diario Oficial de la Federación. (1998). Norma oficial mexicana, por la que se establecen los requisitos fitosanitarios y especificaciones para la importación de material vegetal propagativo. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4901141&fecha=30/11/1998#gsc.tab=0.
- Prescott, B. (1969). Potential antimalarial agents. Derivates of 2-chloro-1,4-naphthoquinone. *Journal of Medicinal Chemistry*, 12 (1), 181-182. <https://doi.org/10.1021/jm00301a053>
- Rabbani, M., Etemadifar, Z., Karamifard, F. & Sadat, B. R. (2016). Assessment of the antimicrobial activity of *Melissa officinalis* and *Lawsonia inermis* extracts against some bacterial pathogens. *Comparative Clinical Pathology*, 25, 59-65. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2140-x>
- Risco, G. M. R., Mouhid, L., Salas, P. L., López, P. A., Santoyo, S., Jaime, L., Ramirez, M. A., Reglero, G., & Fornari, T. (2017). Biological Activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lemiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) Plant Extracts. *Plants Foods for Human Nutrition*, 72, 96-102. <https://doi.org/10.1007/s11130-016-0596-8>

- Rivera-Avalos, E., de Loera, D., Araujo, H. J. G., Escalante, G. I. L., Muñoz, S. M. A., Hernández, H., López, J.A. & López, L.I. (2019). Synthesis of Amino Acid-Naftoquinones and In Vitro Studies on Cervical and Breast Cell Lines. *Molecules*, 24, 4285. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24234285>
- Rodríguez, C. E., Gaitán, I. R., Méndez, C. D., Martelo, J., & Zambrano, R. (2007). Análogos de quinonas naturales con actividad antibacteriana. *Scientia Et Technica*, XIII (33),281-283. ISSN: 0122-1701.
- Sandoval, B. C. (2004). *Manual Técnico: Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación*. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. <http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/2931/1/Sandoval.pdf>
- Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2022). *Expectativas Agroalimentarias 2022*. Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. <https://www.gob.mx/siap/documentos/expectativas-agroalimentarias-2022>
- Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2022). *Avance de siembras y cosechas*. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/
- Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. (2022). *Panorama Agroalimentario 2021*. Secretaría de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP]. https://nube.siap.gob.mx/panorama_siap/pag/2021/Panorama-Agroalimentario-2021
- Sen, Y., van der Wolf, J., Visser, R. F. G., & van Heusden, S. (2015). Bacterial Canker of Tomato Current Knowledge of Detection, Management, Resistance and Interactions. *Plant disease*. 99 (1), 4-13. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-14-0499-fe>

- Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. - A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204–228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
- Sharopov, S. F., Wink, M., Khalifaev, R. V., Zhang, H., Dosoky, S. N., & Setzer, N. S. (2013) Composition and bioactivity of the essential oil of *Melissa officinalis* L. growing wild in Tajikistan. *International Journal of Traditional and Natural Medicines*, 2(2), 86–96.
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., Chalupowicz, L., Barel, V., & Manulis-Sasson, S. (2013). Effects of plant age on disease development and virulence of *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*. 62, 1114-1122. <https://doi.org/10.1111/ppa.12160>
- Stanojević, D., Comić, Lj., Stefanović, O., & Solujić, S. S. (2010). In vitro synergistic antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. and some preservatives. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(1), 109–115.
- Tandon, V.K., Chhor, R.B., Singh, R.V., Raib, S. & Yadava, D.B. (2004). Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14 (5), 1079-1083. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.01.002>
- Villegas, C. J. R., González, H. V. A., Carrillo, S. J. A., Livera, M. M., Sánchez, C. F., & Osuna, E. T. (2004). crecimiento y rendimiento de tomate en respuesta a densidades de población en dos sistemas de producción. *Revista de fitotecnia Mexicana*, 27(4), 333-338.
- Wölbling, R. H., & Leonhardt, K. (1994). Local therapy of herpes simplex with dried extract from *Melissa officinalis*. *Phytomedicine*, 1(1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(11\)80019-X](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(11)80019-X)
- Xia, Y., Yang, Z.Y., Xia, P., Hackl, T., Hamel, E., Mauger, A., Wu, J.H., & Lee, K.H. (2001) Fluorinated 2-phenyl-4-quinolone Derivates as Antimitotic Antitumor

Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44 (23), 3932- 3936.
<https://doi.org/10.1021/jm0101085>

Yang, JY., & Lee, HS. (2015). Antimicrobial activities of active component isolated from *Lawsonia inermis* leaves and structure-activity relationships of its analogues against food-borne bacteria. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2446–2451 <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1245-y>

11. ANEXOS

11.1. Índice de figuras

Figura 1. <i>Lycopersicum esculentum</i> L. A) Planta de jitomate y B) Fruto de jitomate ..	4
Figura 2. Ciclo de vida de Cmm	7
Figura 3. Sintomatología de la enfermedad del cáncer bacteriano en jitomate. Imagen adaptada de Sen <i>et al</i> , 2015.	8
Figura 4. Estructura de la 1,4-Naftoquinona.....	11
Figura 5. Mecanismo del par redox quinona/hidroquinona	12
Figura 6. Estructura química de la plumbagina	13
Figura 7. Estructura química de un derivado aminoácido 1,4-naftoquinona sustituido con Cl.....	14
Figura 8. Estructura de la Lawsona.....	14
Figura 9. Planta <i>Melissa officinalis</i>	15
Figura 10. Reacción general para la síntesis de derivados aminados de 1,4-natoquinona	22
Figura 11. Reacción general para la síntesis de derivados de naftoquinona con aminoácidos.....	23
Figura 12. Mapa de ubicación del ejido Las Moras (Estrada, 2017)	24
Figura 13. Sistema para destilación por método de arrastre de vapor.....	26
Figura 14. Sistema para destilación por método de arrastre de vapor asistido por destilador	27
Figura 15. Sistema para destilación por método de hidrodestilación asistida por microondas	28
Figura 16. Determinación de fitopatogenicidad en Cmm: A) plántulas, B) Trasplante	29
Figura 17. Determinación de fitopatogenicidad en Cmm: A) Crecimiento y tutorio de plantas, B) Plantas y fruto al tiempo de la inoculación.....	30

Figura 18. Esquema de inoculación con Cmm	31
Figura 19. Distribución de muestras en las cajas Petri	34
Figura 20. Espectro IR de C1	39
Figura 21. Espectro IR de C3	40
Figura 22. Espectro IR del compuesto AA1	41
Figura 23. Espectro IR del compuesto AA2	42
Figura 24. Espectro IR del compuesto AF1	43
Figura 25. Espectro IR del compuesto AF2	44
Figura 26. Determinación de la fitopatogenicidad: A) Aparición de síntomas de la enfermedad y B) Marchitamiento de plantas.	46
Figura 27. Fruto infectado con Cmm, manchas conocidas como “chancros” u “ojo de pájaro”	50
Figura 28. A) Muestra colocada y B) Muestra a las 48 h.	51
Figura 29. Purificación de la bacteria: A) Crecimiento de hongo, B) Crecimiento de Cmm no puro, C) Crecimiento de Cmm puro.	52
Figura 30. Inhibición de C1: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con C1 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con C1 [1000] al t= 72 h.	55
Figura 31. Inhibición de C3: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con C3 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con C3 [1000] al t= 72 h.	57
Figura 32. Inhibición de AA1: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con AA1 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con AA1 [1000] al t= 72 h.	59
Figura 33. Inhibición de AA2: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con AA2 [500] al t= 0 h, D) Cmm con AA2 [500] al t= 24 h.	61
Figura 34. Inhibición de AF1: A) DMSO B) Control negativo, C) Cmm con AF1 [1000] al t= 0 h, D) Cmm con AF1 [1000] al t= 72 h.	63
Figura 35. Inhibición de productos de MO: A) Aceite esencial a las 72h, B) EtOH, C) Cmm con extracto etanólico [25] al t= 0 h, D) Cmm con extracto etanólico [25] al t=72 h.....	66

11.2. Índice de tablas

Tabla 1. Características macroscópicas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)	32
Tabla 2. Tratamientos y concentraciones empleados para la evaluación de la actividad antibacteriana	33
Tabla 3. Rendimientos de reacción de los derivados aminados de naftoquinona.	37
Tabla 4. Bandas IR características para la 1,4-naftoquinona.	38
Tabla 5. Condiciones de trabajo para las diferentes metodologías de obtención de aceite esencial.	45
Tabla 6. características macroscópicas detectadas en la bacteria (Cmm) aislado	51
Tabla 7. Análisis de varianza de las variables evaluadas en las pruebas in vitro de inhibición de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	53
Tabla 8. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto 1	53
Tabla 9. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto 3	55
Tabla 10. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto AA1.....	57
Tabla 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto AA2.....	59
Tabla 12. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm del compuesto AF1.....	61
Tabla 13. Análisis de varianza de las variables evaluadas en las pruebas in vitro de inhibición de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	64
Tabla 14. Porcentaje de Inhibición del crecimiento de Cmm para el extracto etanólico y el aceite esencial de MO	64

11.3. Índice de gráficas

Gráfica 1. Datos del crecimiento de las plantas del bloque A	47
Gráfica 2. Datos del crecimiento de las plantas del bloque B	47
Gráfica 3. Datos del crecimiento de las plantas del bloque C	48
Gráfica 4. Datos del crecimiento de las plantas del bloque D	48
Gráfica 5. Datos del crecimiento de las plantas del bloque E	49

Gráfica 6. Frutos cosechados en la semana ocho del experimento.....	49
Gráfica 7. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto 1 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: [X] $\neq$ H ₂ O ₂ , b: [1000] $\neq$ [500], c: [1000] $\neq$ [250], d:[500] $\neq$ [250] y e:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.	54
Gráfica 8. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto 3 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: [X] $\neq$ H ₂ O ₂ , b: [1000] $\neq$ [500], c: [1000] $\neq$ [250], d:[500] $\neq$ [250] y e:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.	56
Gráfica 9. Comparación de los porcentajes de inhibición para el compuesto AA1 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: [X] $\neq$ H ₂ O ₂ , b: [1000] $\neq$ [500], c: [1000] $\neq$ [250], d:[500] $\neq$ [250] y e:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.	58
Gráfica 10. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto AA2 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: [X] $\neq$ H ₂ O ₂ , b: [1000] $\neq$ [500], c: [1000] $\neq$ [250], d:[500] $\neq$ [250] y e:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.	60
Gráfica 11. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el compuesto AF1 a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, $n=6$, $P<0.05$ donde a: [X] $\neq$ H ₂ O ₂ , b: [1000] $\neq$ [500], c: [1000] $\neq$ [250], d:[500] $\neq$ [250] y e:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis	

estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.62

Gráfica 12. Comparación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de Cmm para el extracto etanólico y el aceite esencial de MO a las concentraciones y tiempos de exposición. Todos los resultados en la gráfica se presentan como la media $\pm$ DE, n=6, P<0.05 donde a: Concentración $\neq$ H₂O, b: [25] $\neq$ [100], c: [20] $\neq$ [100], d:[15] $\neq$ [100], e: [10] $\neq$ [100], y f:Concentración $\neq$ Control (-) . El análisis estadístico fue un ANOVA de dos vías de comparación múltiple de medias usando la prueba de Bonferroni.65

11.4. Perfil fitoquímico de los extractos acuosos de *Melissa officinalis*

Metabolito	Decocción	Infusión
Carbohidratos	+	+
Azucares reductores	-	+
Nafto/antraquinonas		
Flavonoides	+ (F, Fl y A)	+ (F y A)
Esteroides y/o triterpenoides libres		
Leucoantocianinas	-	-
Taninos	+	+
Saponinas/saponinas triterpenicas	+	+
5-hidroxi flavonas	-	-
Cumarinas	+	+
Lactonas sesquiterpénicas		

+ Presente

- No detectado

F= Flavonas, A=Antocianinas, Ch_=Chalconas,
I=Isoflavonas y Fl=Flavonoles

11.5. Glosario

Antitusivo. Fármacos utilizados habitualmente para el tratamiento de la tos y otros síntomas a menudo asociados al resfriado o la gripe, como el exceso de mucosidad o la congestión.

Artrópodos. Conjunto de animales invertebrados de organización compleja, provistos de un esqueleto externo, cuerpos segmentados y patas articuladas. Por ejemplo: los insectos, arácnidos, crustáceos y miriápodos, entre otros.

Axonomorfo. Raíces que están formadas por una raíz principal más gruesa y otras que salen de la principal más delgadas.

Baya bilocular. Fruto que contiene dos lóculos, los cuáles son las cavidades donde se alojan las semillas.

Defoliación. Caída prematura de las hojas de los árboles y plantas, producida por enfermedad, contaminación ambiental o acción humana.

Entrenudos. Parte del tallo de la planta comprendida entre dos nudos, los cuales son el lugar donde se insertan las hojas y las ramas laterales.

Estomas. Son poros o aberturas regulables del tejido epidérmico de las plantas que están formados por células oclusivas, es decir, células epidérmicas que provocan que estos poros en cuestión se abran o cierren.

Filimorfismo. Deformaciones en las hojas de la planta.

Folíolos. cada una de las piezas separadas en que a veces se encuentra dividido el limbo de una hoja, el cual es lámina que comúnmente forma parte de la anatomía de una hoja.

Fitopatógeno. Microorganismo, que genera enfermedades en las plantas, como: hongos, bacterias, virus, protozoarios, moluscos y nematodos (gusanos).

Fitotoxicidad. Término que se emplea para describir el grado de efecto tóxico producido por un agroquímico o compuesto determinado que causa desordenes fisiológicos en las plantas y que se traduce en alteraciones del aspecto, crecimiento, vigor, desarrollo y productividad de las plantas.

Hidátodos. Tipo de estoma inmóvil que secreta agua líquida por el proceso de gutación, el cuál es un fenómeno observable como pequeñas gotas de agua en la epidermis foliar.

Lejía. Cloro en solución acuosa, empleado generalmente como desinfectante.

Manchas foliares. También conocidas como tizones foliares o turcicum, enfermedad causada generalmente por hongos y se presenta como lesiones en las hojas que generalmente se presentan como manchas color marrón.

Pecíolos. Es el rabillo que une la lámina de una hoja a su base foliar o al tallo.

Radicular. Referente a las raíces vegetales o relacionado con ellas.

Tejido foliar. Hojas de la planta.

Tejido medular. En botánica, es el tejido blando que constituye el interior de algunos tallos y talos.

Xilema. Tejido vegetal cuya función principal es transportar agua, sales minerales y otros nutrientes desde la raíz hasta las hojas de las plantas. Asimismo, la función secundaria del xilema es la reserva de minerales y sostén o soporte.