



Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Eugenol como sensibilizador de resistencia.

Tesis:

Para obtener el Título de Biólogo.

Presenta:

Carlos Castillo Hernández

Directora de tesis:

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado México.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A Leonor Hernández Lozano y Leobardo Castillo Rojas mis padres, que siempre han previsto desde mi concepción, mi desarrollo personal y profesional haciendo todo lo posible para otorgarme las herramientas necesarias.

A mi honorable casa la UNAM que me ha dado el camino y apoyo en mi paso por la universidad, permitiéndome adquirir conocimientos para mi desarrollo profesional y personal.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado por brindarme la oportunidad, el apoyo y tiempo para la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Bioactividad de Productos Naturales, que me brindo el espacio y apoyo para la elaboración de este proyecto.

A Isabel Godínez, Dra. Yessica Cruz, Dra. Julieta Orozco, Dr. Israel Valencia, M. en C. Viridiana Escartín, al profesor Ángel Duran, Dr. Erick Nolasco, a mis compañeros Axel Rodrigo Molina y Fernanda Mata por brindarme consejos y apoyo en la realización del proyecto.

Dedicatorias

A Leonor Hernández Lozano y Leobardo Castillo Rojas, mis padres, porque sin ellos no podría ser la persona que soy y estar en donde me encuentro, porque han luchado tanto tiempo para poder brindarme la mayor herencia que podría recibir, una educación.

A Aylín Castillo Hernández mi hermana, que me ha acompañado durante todo este caminar, siempre ha estado ahí y es un ejemplo para mí de persistencia y superación.

A Fernanda Castillo Hernández mi hermana menor, que me inspira y en ella veo el reflejo del niño pequeño que fui y que muchas veces me recuerda todos los sueños que ese pequeño tenía.

A mi amigo Roberto y mi amiga Angelica, dos personas muy importantes en mi vida.

A mi pasado y mi futuro yo, porque cada uno tendrá y tuvo una perspectiva diferente de mí y cada uno pensó y pensará cada cosa y paso que demos, logramos llegar lejos, más lejos de lo que siempre hemos imaginado.

Índice

○ Resumen	8
○ Introducción.....	11
○ Antecedentes.....	16
○ Justificación	18
○ Hipótesis.....	18
○ Objetivos	
- Objetivo General.....	18
- Objetivos particulares.....	19
○ Metodología	
1.- Obtención de compuestos.....	19
2.- Bioensayos.....	20
3.- Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.....	20
4.- Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.....	20
5.- Evaluación de la inhibición de Biofilm.....	21
6.- Evaluación de la capacidad sensibilizadora de resistencia en cepas bacterianas.....	21
7.- Efecto del compuesto Eugenol sobre la curva de crecimiento en cepas bacterianas.....	21
8.- Docking molecular.....	22
9.- Análisis estadístico.....	22
○ Resultados	
1. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.....	23
2. Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.....	24
3. Evaluación de la inhibición de Biofilm.....	25
4. Evaluación de la capacidad sensibilizadora de resistencia	26
5. Efecto del compuesto Eugenol y sus combinaciones sobre la curva de crecimiento en cepas bacterianas	28
6. Docking Molecular.....	32
7. Análisis Estadístico	40
○ Discusión	41

○ Conclusiones.....	45
○ Bibliografía.....	46
○ Apéndices	
1.- Estructura química de los compuestos utilizados en el presente estudio.....	50
2.- Método de difusión de agar de Kirby- Baüer.	52
3.- Técnica de microdilución en caldo.....	53
4.- Método de cristal violeta.....	54
5.- Método de Sensibilización.....	55
6.- Curva letal.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Evaluación cualitativa del Eugenol y los compuestos resultados de los halos de inhibición.	23
Tabla 2. CMI y CMB del Eugenol por cepa bacteriana.....	24
Tabla 3. CMI y CMB de sensibilización con el antibiótico Cefuroxima.	26
Tabla 4. CMI y CMB de sensibilización con el antibiótico Cefepima.	26
Tabla 5. Valores de afinidad y poses del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> con el antibiótico Cefuroxima y el compuesto Eugenol.	32
Tabla 6. Valores de afinidad y poses del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> con el antibiótico Cefuroxima.	32
Tabla 7. Valores de afinidad y poses del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> con el compuesto Eugenol.	33

Índice de figuras

Figura 1. Resultados porcentuales de la inhibición de la formación de biofilm del Eugenol contra cepas bacterianas.	25
Figura 2. Curva de crecimiento para la CMI de la cepa <i>S. aureus</i> 23 MR.	28
Figura 3. Curva de crecimiento para la CMI de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 292113....	29
Figura 4. Curva de crecimiento para la CMB de la cepa <i>S. aureus</i> 23 MR	30
Figura 5. Curva de crecimiento para la CMB de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213....	31
Figura 6. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> y el compuesto Eugenol.	34
Figura 7. Acoplamiento Molecular de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> y el compuesto Eugenol	35
Figura 8. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> y el antibiótico Cefuroxima.	36
Figura 9. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i> con el antibiótico Cefuroxima y el compuesto Eugenol.	37
Figura 10. Esquema 2D de la interacción del Eugenol con los aminoácidos de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i>	38
Figura 11. Esquema 2D de la interacción del antibiótico Cefuroxima con los aminoácidos de la proteína β -Lactamasa de <i>S. aureus</i>	38

Resumen

El Eugenol es un derivado fenólico comúnmente extraído de la esencia del clavo, que también puede extraerse de la pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otras especias. Es utilizado desde hace varios siglos en la práctica odontológica. Su consistencia es líquida y aceitosa de color amarillo claro con un aroma característico, poco soluble en agua y soluble en alcohol. En los últimos años se ha visto un incremento considerable en la resistencia a los antibióticos de cepas bacterianas, y como el Eugenol presenta actividad antibacteriana podría funcionar como un sensibilizador de resistencia ante cepas bacterianas permitiendo así la efectividad de los antibióticos.

El objetivo del presente trabajo fue: Evaluar al Eugenol como sensibilizador de resistencia.

El Eugenol 99% (# cat. E51791), fue obtenido en Sigma-Aldrich (Toluca, México). Para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer, en dos cepas gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* 82 MR y dos gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Staphylococcus aureus* 23 MR en presencia de los antibióticos Cefuroxima y Cefepima en los cuales se presentan resistencia. Como control positivo se utilizó el Cloranfenicol y para el control negativo se utilizaron las cepas sin ningún compuesto.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y prueba de sensibilidad se empleó el método de dilución en caldo con diferentes concentraciones de Eugenol en combinación con los antibióticos. La actividad de inhibición de biofilm se evaluó mediante el método de cristal violeta con concentraciones subinhibitorias de Eugenol (1/2 CMI).

El Eugenol presentó actividad antimicrobiana en todas las cepas desafiadas. Se obtuvo que la CMI para el Eugenol es de 1000 µg/mL y la CMB es de 3000 µg/mL para la cepa *S. aureus* 23 MR como la multirresistente, así como una CMI de 125 µg/mL y la CMB de 3000 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC 29213, estos resultados contrastan con otras investigaciones en donde se obtuvieron CMIs frente *S. aureus* de 100 a 150 µg/mL. La cepa de catálogo mostraría una congruencia con

los resultados en investigaciones previas, así mismo se entendería el aumento considerable para la cepa multirresistente. Para la cepa de *E. coli* multirresistente se obtuvo una CMI de 250 µg/mL, así como una CMB de 3000 µg/mL, para la cepa de referencia *E. coli* se obtuvo una CMI de 500 µg/mL, así como una CMB de 3000 µg/mL. Los valores de CMI para la cepa de referencia fueron 4 veces mayores comparados con otras investigaciones.

Para la prueba de sensibilidad se obtuvo una CMI menor a 0.23 µg/mL al igual que una CMB menor a 0.23 µg/mL para la combinación del Eugenol con el antibiótico Cefuroxima contra la cepa *S. aureus* ATCC 29213. Así como una CMI de 15 µg/mL y CMB de 30 µg/mL para la cepa *S. aureus* 23MR. Para la cepa *E. coli* 82MR se obtuvo una CMI de 120 µg/mL y una CMB 240 µg/mL para la referencia una CMI de 7.5 µg/mL y una CMB 15 µg/mL. Considerando que la CMI del antibiótico para las cepas gram-positivas es de 15 µg/mL y de 120 µg/mL para las cepas gram-negativas. La Cefepima mostró una CMI de 900 µg/mL para los dos tipos de cepas gram-positivas y gram-negativas. Así mismo el Eugenol en combinación con el antibiótico Cefepima mostró una CMI de 15 µg/mL y una CMB de 30 µg/mL para la cepa *S. aureus* 23 MR (multirresistente) así como una CMI de 7.5 µg/mL y una CMB de 15 µg/mL para *S. aureus* ATCC 29213. Para las cepas *E. Coli* 82 MR se obtuvo una CMI 0.47 µg/mL y una CMB de 0.94 µg/mL y para la referencia una CMI de 0.94 µg/mL y una CMB de 1.88 µg/mL. Diversas investigaciones mencionan que algunos antibióticos convencionales pueden ser activos en concentraciones de 5 a 1000 veces más bajas en combinación con el Eugenol que cuando se usa solo, esto indicaría una gran sensibilización del Eugenol con antibióticos. En el presente estudio la CMI del antibiótico se vio reducida 60 veces al usarlo en combinación con el Eugenol.

En cuanto a la inhibición de biofilm se obtuvo que hubo una mayor inhibición en la cepa de *E. coli* 82MR con una inhibición del 67.54% para la concentración 150 µg/mL.

En las bacterias gram-positivas la mayor inhibición de biofilm se mostró en la cepa de catalogo *S. aureus* ATCC con una inhibición 11.30% para la media CMI en una concentración de 0.06 µg/mL.

El Eugenol presenta una sensibilización de resistencia en combinación con el antibiótico Cefepima en contra de las cepas *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* 23 MR, *E. coli* 82 MR, a diferencia del antibiótico Cefuroxima que los datos presentan una misma CMI en presencia y ausencia del Eugenol para la cepa *S. aureus* 23 MR y para *E. coli* 82 MR.

En el análisis molecular se obtuvo que para el caso de la combinación de Eugenol-Cefuroxima y la proteína β -Lactamasa, la posición 1 fue la que obtuvo una mayor afinidad con un valor de - 4.8 kcal/mol, para el caso de la proteína β -Lactamasa y el antibiótico Cefuroxima la posición 1 fue la que presentó una mejor afinidad con un valor de - 6.66 kcal/mol finalmente el Eugenol y la proteína β -Lactamasa la posición 8 fue la que presentó una mejor afinidad con un valor de - 4.28 kcal/mol.

La combinación del Eugenol, Cefepima y Cefuroxima presentan una mayor actividad frente a las cepas desafiadas.

Introducción

Desde que se descubrió la penicilina por Alexander Fleming en 1928, los antibióticos se han vuelto los compuestos más efectivos para combatir infecciones bacterianas, su éxito se ha mostrado por su uso continuo y el descenso en la mortalidad que causaban las infecciones bacterianas en los últimos 50 años. Después de la comercialización de la penicilina en los años 40, han ido surgiendo un gran número de compuestos con actividad antimicrobiana de origen natural (derivados del metabolismo secundario de los microorganismos), sintéticos o por modificación de versiones anteriores, pero, los microorganismos poseen herramientas moleculares que han permitido desarrollar resistencia y poder adaptarse a las nuevas condiciones de su entorno, haciendo que los agentes antimicrobianos pierdan su efectividad al poco tiempo de ser comercializados. La selección de cepas bacterianas resistentes a antibióticos se permite a través de tres mecanismos principales: la captura de genes de resistencia, principalmente a través de transposones, integrones, plásmidos y transferencia genética horizontal de fuentes ambientales, adquisición de mutaciones de resistencia antibiótica junto con mutaciones compensatorias y la sobreexpresión de los mecanismos intrínsecos de resistencia como son las bombas de eflujo o enzimas que inactivan los antibióticos (Recacha, 2019).

Las plantas medicinales han sido herramientas que el ser humano ha utilizado desde tiempos muy antiguos para curar enfermedades o aliviar dolencias, conocido como medicina tradicional. Todo este conocimiento se ha obtenido por medio de la experiencia y se ha transmitido y conservado por medio del lenguaje. El registro del primer texto sobre las plantas medicinales es de hace más de 4000 años y es una tabla de arcilla de la cultura Sumeria (Rodríguez, 2005).

Los viajes intercontinentales conllevaron a la exportación de diferentes especies de plantas, esto provocó que se les tuviera que clasificar. Carlos Linneo se dio a la tarea de la organización, en un ámbito científico, de las plantas y animales. Por su contribución se obtuvo un conocimiento específico de las propiedades curativas de las plantas, pero esto llevó a que no se pudiera explicar las causas por las cuales las

plantas actuaban, es decir, aun no se conocían los principios activos de productos naturales en las plantas (Rodríguez et al., 2005).

En el metabolismo primario existen procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de la planta estos compuestos pueden ser los glúcidos, lípidos y algunos derivados de aminoácidos. Los productos derivados del metabolismo secundario no son esenciales para el metabolismo primario, estos se consideran como defensa de las plantas contra depredadores o como productos que han sido sintetizados en situaciones de estrés respecto a su entorno, como también puede ser la adaptación al mismo, como la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas para su reproducción (Bruneton, 2001).

Los metabolitos secundarios se sintetizan, localizan o concentran en distintas partes de las plantas estos presentan actividad farmacológica que alteran o modifican la función del organismo, ya sea en el cuerpo humano o en algún animal. Estos se clasifican o agrupan en 4 clases principales. Terpenos: como hormonas, pigmentos y aceites esenciales. Compuestos fenólicos: entre los que se encuentran cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. Glicósidos: tales como Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos alcaloides (Ávalos y Perez-Urria, 2009).

El Eugenol es un derivado fenólico que suele ser extraído de la esencia del clavo, este compuesto también puede extraerse de la pimienta, hojas de laurel, canela, alcanfor y otros aceites. Comúnmente suele ser utilizado desde hace varios siglos en la práctica odontológica. Presenta una consistencia líquida y aceitosa de color amarillo claro y un aroma característico, este compuesto es poco soluble en agua y soluble en alcohol. Los registros han mostrado que el aceite del clavo se ha utilizado desde el siglo XVI, hasta que Chisolm en 1873, recomendó que Eugenol se mezclara con Oxido de Zinc ya que se forma una masilla de Eugenolato de Zinc y pudiera así aplicarse directamente en las cavidades cariosas, así fue como lo introdujo en la odontología (González, 2002).

Se conoce que el Eugenol y el Cinamaldehído comúnmente se utilizan en diversas preparaciones alimenticias ya que estos poseen actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias (Ali et al., 2005).

Estudios anteriores han revelado que los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*), canela (*Cinnamomum verum*) y el clavo (*Syzygium aromaticum*) muestran actividades antimicrobianas contra patógenos transmitidos por alimentos. Análisis químicos revelaron que β -Cariofileno, Cinaldehído y Eugenol fueron los mejores componentes de los tres tipos de aceites esenciales (canela, pimienta negra y clavo) (Purkait et al., 2020).

Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos han sido consideradas como infecciones emergentes, debido a que su tratamiento es cada vez más limitado con el potencial de afectar a todas las personas del mundo, tanto en países con mayores recursos económicos como en aquellos en vías de desarrollo. El uso de los antibióticos en el área de la salud es reciente en la historia de la humanidad desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, seguido por el uso excesivo durante la segunda guerra mundial. Poco después se observó que cepas de *Staphylococcus* desarrollaron resistencia a la penicilina lo que indicó el surgimiento de resistencia que se aceleró en las décadas siguientes (Rocha et al., 2015).

La pared celular de las cepas bacterianas es esencial para su proliferación y desarrollo normal ya que protegen el contenido intracelular de la bacteria (Brunton et al, 2007).

Los antibióticos β -Lactámicos son de gran utilidad que se suelen prescribir a menudo, tienen una estructura común y la misma forma de acción pues inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana formada por peptidoglucanos. La resistencia bacteriana a los antibióticos β -Lactámicos se ha elevado a un ritmo impresionante. Los mecanismos de resistencia no solo son por la producción de β -Lactamasas que destruyen a los antibióticos sino también por la modificación o adquisición de proteínas fijadoras de penicilina y disminución de la penetración o emisión (eflujo)

activa del fármaco. Casi todas las bacterias contienen proteínas fijadoras de penicilina, pero los antibióticos β -Lactámicos no logran destruir o no inhiben a todas las bacterias, y operan diversos mecanismos de resistencia de los patógenos a tales medicamentos. *S. aureus* resistente a meticilina ha adquirido su resistencia por la adquisición de PBP (mosaico de genes de proteínas fijadoras de penicilina) adicionalmente por el alto peso molecular (a través de un transposón de un microorganismo desconocido) con una bajísima afinidad por todos los antibióticos Lactámicos (Brunton et al, 2007).

S. aureus ha demostrado la capacidad de adaptarse a los antimicrobianos, adquiriendo gradualmente resistencia a todos los diferentes fármacos disponibles para tratar infecciones establecidas. En la actualidad las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos y se pueden encontrar cepas multirresistentes convirtiéndose en un gran problema de salud pública (Castellano y Pedroza-Mena, 2010).

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen incorporándose a una matriz de exopolisacáridos y adhiriéndose a una superficie inerte o tejido vivo. El crecimiento de las biopelículas es un método común de crecimiento bacteriano en la naturaleza. Un ejemplo común de biopelícula es la placa dental. Todos los días tratamos de combatir la capa bacteriana que cubre la superficie de los dientes para evitar que crezca excesivamente (Lasa et al., 2005).

Existe una urgente necesidad de obtener nuevos agentes anti-biofilm ya que los patógenos con crecimiento de biofilm son fuertemente resistentes para los antibióticos convencionales (Schillaci et al., 2008).

Se ha identificado la formación de biofilm en cepas bacterianas de *S. Aureus*, con base en la literatura consultada se sabe que estas estructuras contribuyen a la resistencia de ciertas cepas a antibióticos.

El biofilm tiene una estrategia de resistencia que evita la penetración de fármacos y aumenta la tolerancia en un factor de 100. Estudios recientes muestran que el 65 % de todas las bacterias infecciosas y el 70 % de todas las infecciones humanas crónicas pueden estar relacionadas con la formación de biopelículas (Gómez et al., 2020).

S. aureus es una cepa de una importancia razonable por su implicación en diversas patologías debido a diferentes factores de virulencia y patogenicidad codificados por diferentes genes expresados a lo largo de su ciclo de vida. Este microorganismo es conocido por ser difícil de tratar y capaz de colonizar e invadir las células de su huésped debido a que posee mecanismos de resistencia como la formación de un biofilm, una matriz extracelular compuesta principalmente por proteínas conocidas en la actualidad como polisacáridos y ácidos nucleicos. La formación de esta matriz causa que la interacción de los antibióticos con las bacterias no se dé de manera adecuada generando fallas en los tratamientos (Roy et al., 2017).

Es necesario conocer matemática y algorítmicamente la eficacia del uso de inhibidores de enzimas, buscando su interacción y zonas de acoplamiento. El método asistido por computadora es un primer enfoque para la detección de nuevos agentes terapéuticos y esta disciplina es una estrategia emergente, ya que reduce muchas complejidades del proceso de diseño de fármacos. La predicción de tales interacciones por acoplamiento molecular tiene una importancia creciente en el campo de los descubrimientos de nuevos fármacos basados en la estructura (Khamouli et al., 2019).

El acoplamiento molecular fue descrito inicialmente en 1982 por Kuntz y colaboradores, y desde entonces se ha convertido en una herramienta central para la búsqueda y selección virtual con base en la estructura, tanto de ligandos con actividad biológica como de posibles blancos terapéuticos. Los ligandos son un amplio grupo de pequeñas moléculas de diversa naturaleza desde de hormonas, neurotransmisores, fármacos o compuestos aislados de diversas fuentes naturales (alcaloides en extractos de plantas), mientras que los blancos terapéuticos suelen ser moléculas grandes como los ácidos nucleicos (ADN/ARN) o proteínas. Los

principios activos de los fármacos cumplen la función de ligandos y de esta manera producen un efecto biológico beneficioso al consumirlos (Ballon et al. 219).

El acoplamiento molecular es una herramienta clave de la biología molecular estructural y de diseño de fármacos asistido por computadora. El objetivo del acoplamiento molecular ligando-enzima es predecir los modos de unión predominantes de un ligando con una enzima de estructura tridimensional conocida. Los métodos de acoplamiento exitosos buscan espacios de alta dimensión de manera efectiva y utilizan una función de puntuación que clasifica correctamente los acoplamientos candidatos. El acoplamiento se puede utilizar para examinar virtualmente grandes bibliotecas de compuestos, ordenar resultados y generar hipótesis estructurales sobre cómo los ligandos inhiben un objetivo, lo cual es invaluable para la optimización de prospectos (Morris y Lim-Wilby, 2008).

Antecedentes

En estudios realizados por Feitosa y colaboradores en 2020 evaluaron los efectos inhibidores del Eugenol y derivados contra la bomba de flujo NorA en *S. aureus*. Encontrando que para la cepa portadora NorA 4-alil-2-6-dimetoxifenol, Eugenol e isoeugenol potenciaron la acción del antibiótico. Ashrafudoulla y colaboradores en el mismo año investigaron la actividad antibacteriana y antibiofilm del Eugenol contra *Vibrio parahaemolyticus*, encontraron que la actividad del Eugenol puede inhibir los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* como la biopelícula y la motilidad, así mismo encontraron que una pequeña cantidad de Eugenol ha demostrado la capacidad de filtración de ácidos nucleicos y proteínas para inhibir el crecimiento de las células de *V. parahaemolyticus*.

Purkait y colaboradores en 2020, evaluaron la eficacia antibacteriana, antifúngica y antioxidante de los aceites esenciales de tres especias de uso común (pimienta negra, canela y clavo) en combinación con la caracterización química y la evaluación de la toxicidad. Observaron que la combinación de aceite de canela y aceite de clavo exhibían interacciones antibacterianas sinérgicas contra *S. aureus*, *L.*

monocytogenes, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*, así como actividad antifúngica sinérgica contra *A. niger*. Por otro lado, Dhara y Tripathi (2020) determinaron la combinación sinérgica de Eugenol con Cefotaxima y Ciprofloxacina para combatir la resistencia y potenciación de fármacos antibacterianos por Eugenol contra cepas bacterianas. Se observó que existe una interacción sinérgica entre Eugenol y Cefotaxima. *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* exhibieron CMI oscilo entre 0.22 y 7.28 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambos organismos. En presencia del Eugenol la CMI de Cefotaxima se redujo alrededor de 32 a 1024 veces en *E. coli* y de 16 a 1024 veces en *K. pneumoniae*. Se detectó un mayor daño de la membrana bacteriana con Eugenol que con los antibióticos convencionales. Las células no tratadas tenían una forma ovalada con superficies muy lisas, después de la exposición a Eugenol, se observó agrandamiento de la célula, mientras que las bacterias tratadas con la combinación de CMI Eugenol y CMI Cefotaxima mostraron grandes surcos en las superficies celulares junto con un alargamiento celular significativo. El tratamiento con la combinación CMI Eugenol y CMI Ciprofloxacina dio como resultado la desaparición del contenido citoplasmático de la célula.

Falleh y colaboradores en 2020 calcularon la fórmula óptima que combinan los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myrtus communis* y *Lavandula stoechas* para potenciar sus efectos anti-*S. aureus*. Los compuestos principales fueron Alcanfor (35%), α -Pino (75%), Cinamaldehído (89%) y Eugenol (75%) para los AE de lavanda, mirto, canela y clavo, respectivamente. Además, la prueba de actividad antibacteriana ilustra que todos los AE estudiados eran potentes agentes antimicrobianos, especialmente lo de canela y clavo (de 15 a 39 mm de zona de inhibición). La búsqueda de la combinación más eficaz para la conservación de la leche contra *S. aureus* sugirió que una mezcla de 58.8% de canela, 34.4% de clavo de olor, y 6.8% lavanda presenta la eficiencia óptima. Por lo tanto, esta fórmula podría considerarse como una alternativa potencial para la seguridad alimentaria contra la contaminación por *S. aureus*, particularmente en la industria láctea.

JUSTIFICACIÓN

El Eugenol es utilizado muy comúnmente en la medicina mexicana, para tratar diferentes afecciones, comúnmente como antimicrobiano, ya que este compuesto se encuentra en la especia del clavo, por muchos años la gente lo ha utilizado por su efecto antimicrobiano, pero la mayoría de la población lo utiliza sin saberlo.

Se ha buscado en los últimos años alternativas que muestren una mayor eficacia para el tratamiento de enfermedades y potencializar los efectos de los antibióticos.

En busca de esta solución, se ha encontrado una respuesta del Eugenol sobre las cepas *S. aureus* y *E. coli*. Ya que existen pocos estudios en donde se evaluó la actividad sensibilizadora del Eugenol sobre fármacos, por lo tanto, es importante determinar la actividad sensibilizadora del compuesto Eugenol en presencia diferentes fármacos.

HIPOTESIS:

Se sabe que existen cepas multirresistentes de *S. aureus* y *E. coli* a ciertos fármacos, y se ha comprobado que algunos productos naturales son capaces de sensibilizar dicha resistencia, por lo tanto, si el Eugenol ha mostrado actividad antimicrobiana probablemente actuará como sensibilizador y se observará una disminución en las concentraciones necesarias de antibióticos para inhibir el crecimiento de estas cepas resistentes.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar al Eugenol como sensibilizador de resistencia.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar de manera cualitativa la actividad antimicrobiana del Eugenol.
- Establecer las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas del Eugenol tanto de manera individual como en combinación con antibióticos, para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas.
- Cuantificar el porcentaje de inhibición en la formación de biopelícula en cepas Gram-positivas y Gram-negativas tratadas con Eugenol.
- Examinar la capacidad del Eugenol para sensibilizar a las bacterias resistentes frente a diferentes fármacos.
- Analizar el efecto del Eugenol sobre las curvas de crecimiento de cepas Gram-positivas y Gram-negativas, tanto en presencia como en ausencia de antibióticos.
- Investigar el posible mecanismo de acción del Eugenol en su actividad antimicrobiana.

METODOLOGIA:

1. Obtención de los compuestos:

Los compuestos fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioactividad de productos naturales de la UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Acido clavulánico # de catálogo 61177-45-5

Reserpina # de catálogo 50-55-5

Cefuroxima # de catálogo 56238-63-2

Cefepima # de catálogo 123171-59-5

Eugenol # de catálogo E51791-5Gb

2. BIOENSAYOS

Bacterias Gram-positivas

Staphylococcus aureus ATCC 29213

Staphylococcus aureus 23 MR

Bacterias Gram-negativas

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli 82 MR

3. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

En el caso de evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana del Eugenol y de los antibióticos se evaluó por medio de la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Rodríguez, 2005). Se impregnaron sensidiscos con 4 µL (4.25 µg) de Eugenol y 30 µg de cada uno de los siguientes antibióticos: Cefuroxima, Cefepima. De igual manera se evaluaron combinaciones de Eugenol con cada uno de los fármacos a probar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 2). Así mismo se utilizó como control el ácido clavulánico (inhibidor de β-Lactamasas) y reserpina (inhibidor de bombas de flujo) para poder determinar el posible mecanismo de acción.

4. Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.

Para la evaluación cuantitativa se empleó el método de dilución en caldo (Koneman, 1996). Las concentraciones utilizadas fueron una serie de diluciones de 500 a 0.0625 µg/mL de Eugenol, los diferentes antibióticos, así como diferentes combinaciones de Eugenol con los antibióticos a probar. (Apéndice 3)

5. Evaluación de la inhibición de Biofilm

Para el método de inhibición de biofilm se empleó la técnica propuesta por Gómez-Sequeda y colaboradores en 2020 en donde se adicionaron 100 µL de la cepa a una concentración de 1×10^5 en solución salina con 100 µL de Eugenol a diferentes concentraciones, en una placa de 96 pozos, se dejó por 48 hrs en incubación a 37 °C sin agitarse, después de esas 48 hrs se desechó el contenido y se lavó 3 veces con solución salina, se agregaron 200 µL de cristal violeta al 0.4% dejándose reposar durante 15 minutos, después se lavó 3 veces con solución salina para remover el exceso de cristal violeta para añadir ácido acético al 30% dejándose por 15 minutos para la lectura en el lector ELISA a 595 nm.

(Apéndice 4)

6. Evaluación de la capacidad sensibilizadora de resistencia.

Se empleó el método de microdilución en caldo (Picazo, 2000).

Utilizando concentraciones de 120 a 0.05 µg/mL de los antibióticos con una concentración subinhibitoria del Eugenol (1/2 CMI). (Apéndice 5)

7. Efecto del compuesto Eugenol y sus combinaciones sobre la curva de crecimiento en cepas bacterianas.

Se realizó el método propuesto por Kubo y colaboradores en 1993 modificado por Ávila en 1996 donde se evaluaron la CMI del Eugenol, CMI de la Cefuroxima, y la CMI de la Cefuroxima en presencia del Eugenol en una cantidad subinhibitoria y un testigo. (Apéndice 6)

8. Docking molecular

Se realizó un acoplamiento molecular para poder inferir el mecanismo virtual de acción del Eugenol en un blanco proteico, obteniendo las conformaciones moleculares, prediciendo así la eficacia y su actividad biológica. El acoplamiento molecular es un método informático que predice computacionalmente la posición más conveniente de interacción entre un ligando y un blanco usualmente proteico a partir de sus proyecciones tridimensionales. Mientras más estable, específica y favorable, mayor será la actividad biológica (Ballón et al., 2019).

9. Análisis estadístico

Se realizó el método de ANOVA de un factor para determinar si existe diferencia significativa entre los halos de inhibición obtenidos.

Resultados:

1.- Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

Para la evaluación cualitativa se pueden observar los resultados obtenidos de la prueba Kirby-Buer en la siguiente tabla como un resultado de los promedios de tres repeticiones más menos la desviación estándar:

Tabla 1. Evaluación cualitativa del Eugenol y los compuestos resultados de los halos de inhibición.

Cepas	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 MR	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> 82MR	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Control +</i>	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0
<i>Cefepima</i>	N/A	20.0 ± 0.0	N/A	N/A
<i>Cefuroxima</i>	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Ácido Clavulánico</i>	N/A	6.0 ± 0.0	6.0 ± 0.0	N/A
<i>Reserpina</i>	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Eugenol (PN)</i>	15.0 ± 0.0	13.0 ± 0.0	13.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0
Combinaciones				
<i>Control+/PN</i>	22.6 ± 1.0	25.5 ± 3.4	24.5 ± 0.5	25.5 ± 1.1
<i>Cefepima/PN</i>	14.3 ± 0.5	14.5 ± 0.5	13.0 ± 1.7	12.0 ± 2.0
<i>Cefuroxima/PN</i>	13.6 ± 1.0	11.5 ± 0.0	14.0 ± 1.5	14.6 ± 0.5
<i>Ac. Clavulánico/PN</i>	12.5 ± 0.5	11.5 ± 0.5	13.0 ± 1.1	14.0 ± 0.0
<i>Reserpina/PN</i>	N/A	14.0 ± 0.0	13.5 ± 0.5	13.5 ± 0.5

Valores de los halos de inhibición en milímetros, donde PN= Eugenol, N/A= no presento actividad. Concentraciones: Control + = cloranfenicol 25 µg; Eugenol 4 µL; Cefuroxima, Cefepima, Reserpina y Acido Clavulánico 15 µg.

Se puede observar en la tabla 1 que en el caso de los antibióticos se obtuvo una actividad nula para las cepas *S. aureus* multirresistente y para las dos cepas de *E. coli*, a excepción de la cepa *S. aureus* que si presenta una actividad contrario a los antibióticos se puede observar que con base en los resultados el Eugenol si presentó actividad frente a las cepas gram-negativas y gram-positivas así mismo las combinaciones entre el Eugenol y los antibióticos si mostraron actividad, excepto la combinación de reserpina y Eugenol frente a la cepa *S. aureus* multirresistente. Así mismo se puede observar que para la reserpina no se observó una actividad frente

a las cepas evaluadas, tomando en cuenta que este compuesto es un inhibidor de las bombas de eflujo, de la misma manera para el caso del Ac. Clavulánico mostro actividad frente a la cepa *S. aureus* de catalogo y la cepa *E. coli* multirresistente este último compuesto es un inhibidor de β -Lactamasas, la reserpina y el Ac. Clavulánico fueron utilizados para determinar el modo de acción de la resistencia de las cepas.

2. Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.

Al determinar la actividad antimicrobiana de los antibióticos y el compuesto puro se prosiguió a determinar los valores de CMI y CMB presentados en la siguiente tabla:

Tabla 2. CMI y CMB del Eugenol por cepa bacteriana.

Cepas	<i>Staphylococcus aureus</i> 23 MR	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> 82MR	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
CMB	3	3	3	3
CMI	1	0.125	0.25	0.5

CMB=concentración mínima bactericida, CMI= concentración mínima inhibitoria. Concentración en $\mu\text{g/mL}$.

En la tabla 2 el Eugenol presentó un valor igual de CMB para todas las cepas bacterianas, de tal manera que una concentración de 3 mg/mL de Eugenol inhibe el 99.9% del crecimiento bacteriano en bacterias gram-positivas y gram-negativas de catalogo y multirresistentes.

Por otro lado, existió una variación sobre las concentraciones CMI considerando que para mostrar una inhibición drástica en las cepas bacterianas se requerirá de 1 mg/mL para *S. aureus* multirresistente, 0.125 mg/mL para *S. aureus* de catálogo, 0.25 mg/mL para *E. coli* multirresistente y 0.5 mg/mL para *E. coli* de catálogo.

3.- Evaluación de la inhibición de biofilm

Ya determinadas las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Mínimas Bactericidas, se evaluó el efecto antibiofilm del Eugenol. El porcentaje obtenido se puede observar en las siguientes graficas.

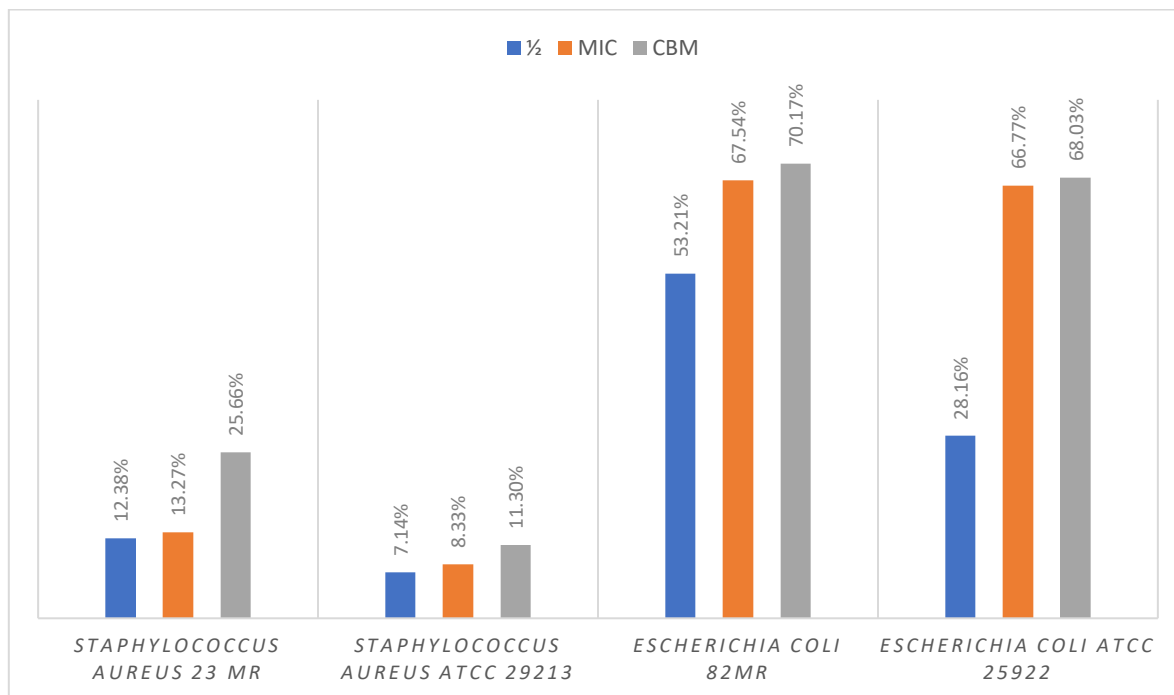


Figura 1. Resultados porcentuales de la inhibición de la formación de biofilm del Eugenol contra cepas bacterianas.

Se muestra en la figura 1 una inhibición mayor contra las cepas multirresistentes y la cepa de catálogo de *E. coli*, por otro lado, en presencia de la cepa *S. aureus* la inhibición de la formación de biofilm fue menor. De tal manera que una cantidad subinhibitoria del compuesto logra inhibir un 53.21 % de la formación de biofilm en la cepa *E. coli* multirresistente y un 28.16 % en la cepa de catálogo, al evaluar la concentración bactericida se obtuvo que para la cepa de *E. coli* multirresistente se obtuvo una inhibición del 70.1% y una inhibición del 68.03% en la cepa *E. coli* de catálogo.

Respecto a la cepa *S. aureus* se obtuvo que con una cantidad subinhibitoria se inhibe un 12.38% de la formación de biofilm en la cepa multirresistente y un 7.1% para la cepa *S. aureus* de catálogo, evaluando la concentración bactericida el porcentaje de

inhibición se duplica para la cepa multirresistente obteniendo un 25.66% y para la cepa de catálogo se inhibe un 11.30%.

4.- Evaluación de la capacidad sensibilizadora de resistencia

Se evaluó la capacidad sensibilizadora del Eugenol en combinación de los antibióticos por medio de la determinación de CMB y CMI, mostrando los resultados obtenidos en las siguientes tablas.

Tabla 3. CMI y CMB de la prueba de sensibilización con el antibiótico Cefuroxima.

Cepa	CMI <i>antibiótico</i> µg/mL	PN + Cefuroxima CMI µg/mL	PN + Cefuroxima CMB µg/mL
<i>S. aureus</i> 23 MR ¹	15	15	30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ²	15	> 0.23	> 0.23
<i>E. coli</i> 82 MR ³	120	120	240
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ⁴	120	7.5	15

Unidades en microgramos sobre mililitros en presencia del Eugenol a una concentración de (0.5)¹ (0.06)² (0.125)³ (0.25)⁴ y el antibiótico Cefuroxima. PN= Eugenol, (>) = menor que.

Tabla 4. CMI y CMB de sensibilización con el antibiótico Cefepima.

Cepa	CMI <i>antibiótico</i> µg/mL	PN + Cefepima CMI µg/mL	PN + Cefepima CMB µg/mL
<i>S. aureus</i> 23 MR ¹	0.9	15	30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 ²	0.9	7.5	15
<i>E. coli</i> 82 MR ³	0.9	0.47	0.94
<i>E. coli</i> ATCC 25922 ⁴	0.9	0.94	1.88

Unidades en microgramos sobre mililitros en presencia del Eugenol a una concentración de (0.5)¹ (0.06)² (0.125)³ (0.25)⁴ y el antibiótico Cefepima. PN= Eugenol.

En la tabla 3 se mostró una disminución en los valores de concentración del antibiótico Cefuroxima en presencia del Eugenol para las cepas de catálogo, de tal manera que la concentración mínima inhibitoria del antibiótico para *S. aureus* paso de 15 µg/mL a una concentración menor que 0.23 µg/mL así mismo una CMB menor que 0.23 µg/mL disminuyendo el valor de la CMI poco más de 65 veces y para *E. coli* paso de 120 µg/ml a 7.5 µg/mL disminuyendo su valor 16 veces.

Para el caso del antibiótico Cefepima en la tabla 4 para la cepa *E. coli* de catálogo se obtuvo un ligero aumento de 0.9 µg/mL a 0.94 µg/mL el valor de la CMI y una disminución para la cepa multirresistente que mostro una disminución de la CMI de 0.9 µg/mL a 0.47 µg/mL, a diferencia de la cepa *S. aureus* que mostro actividad en sus dos versiones (multirresistente y de catálogo) disminuyendo de 0.9 µg/mL a 15 µg/mL para la cepa multirresistente y de 0.9 µg/mL a 7.5 µg/mL para la cepa de catálogo.

5.- Efecto del compuesto Eugenol y sus combinaciones sobre la curva de crecimiento en cepas bacterianas.

Por último, se evaluó el efecto del Eugenol y su combinación con el antibiótico con base en los resultados de sensibilidad donde se determinó que se evaluaría el antibiótico Cefuroxima frente a las cepas *S. aureus* evaluando así las concentraciones para CMI y CMB.

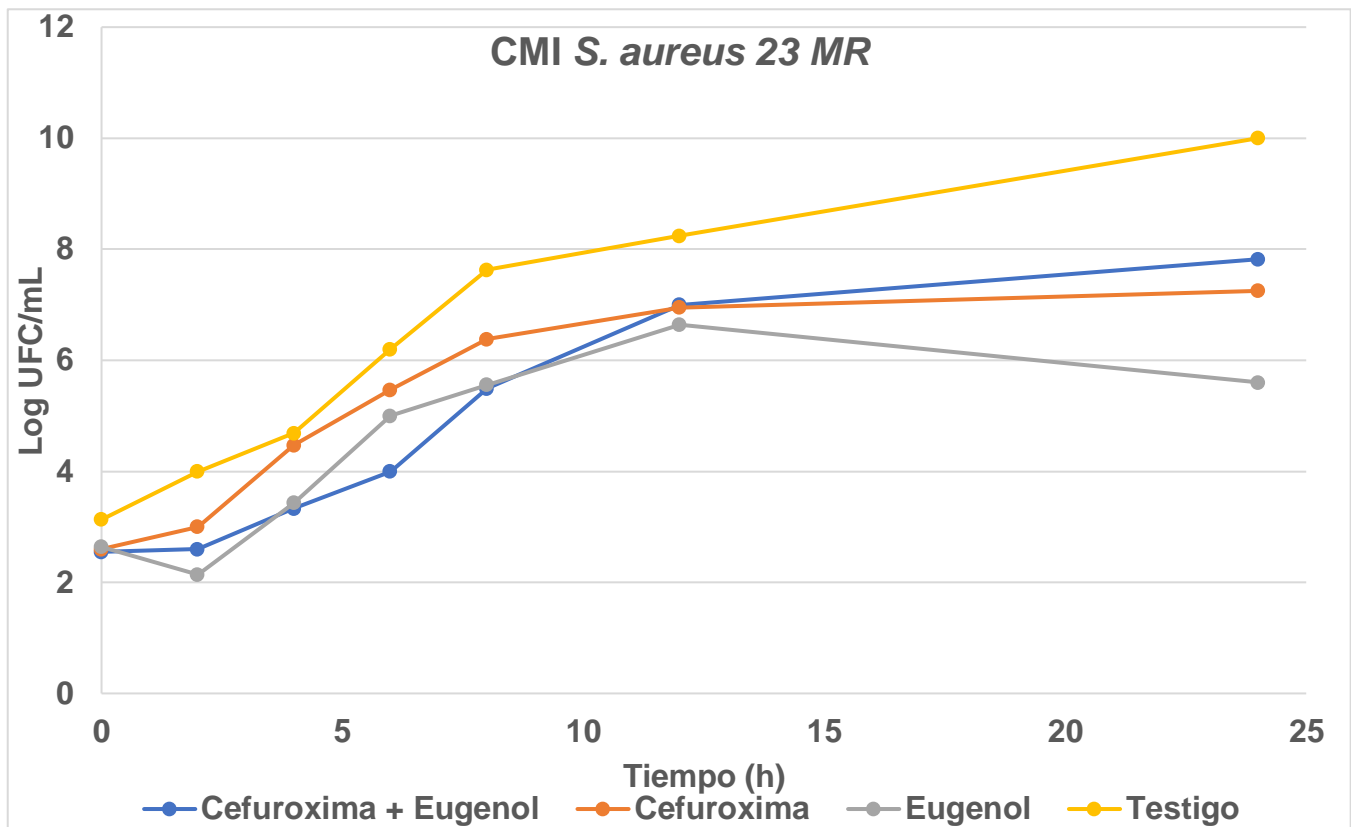


Figura 2. Curva de crecimiento para la CMI de la cepa *S. aureus* 23 MR.

Cepa multirresistente en presencia del Eugenol, Cefuroxima y su combinación en cantidades mínimas inhibitorias Concentración evaluada del antibiótico (15 µg/mL) Eugenol a una concentración de (0.5 µg/mL).

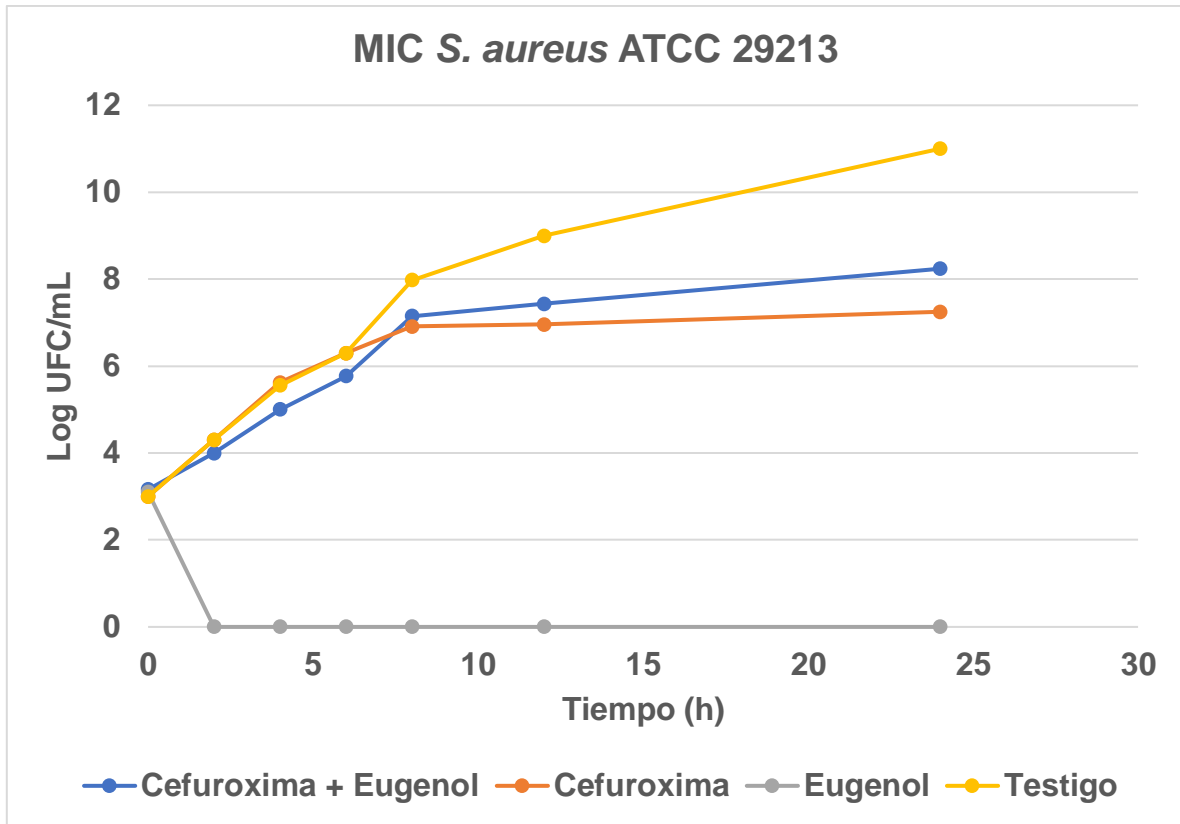


Figura 3. Curva de crecimiento para la CMI de la cepa *S. aureus ATCC 292113*.

Cepa de catálogo en presencia del Eugenol, Cefuroxima, y su combinación en cantidades mínimas inhibitorias. Concentración evaluada del antibiótico (120 µg/mL) Eugenol a una concentración de (0.06 µg/mL).

Como se observa en la figura 2, pasado las primeras 12 horas si existe una disminución en las poblaciones bacterianas en la combinación del Eugenol y el antibiótico contrastado con el antibiótico solo para la cepa multirresistente, observando que la línea de crecimiento de la Cefuroxima y el Eugenol queda por debajo de la línea de crecimiento del antibiótico solo.

Frente a la cepa de catálogo en la figura 3, se muestra que el Eugenol por sí solo inhibe el crecimiento bacteriano drásticamente desde la primera hora, al combinarse con el antibiótico en una cantidad subinhibitoria se observa que disminuye la población bacteriana quedando en las primeras 5 horas por debajo del antibiótico solo.

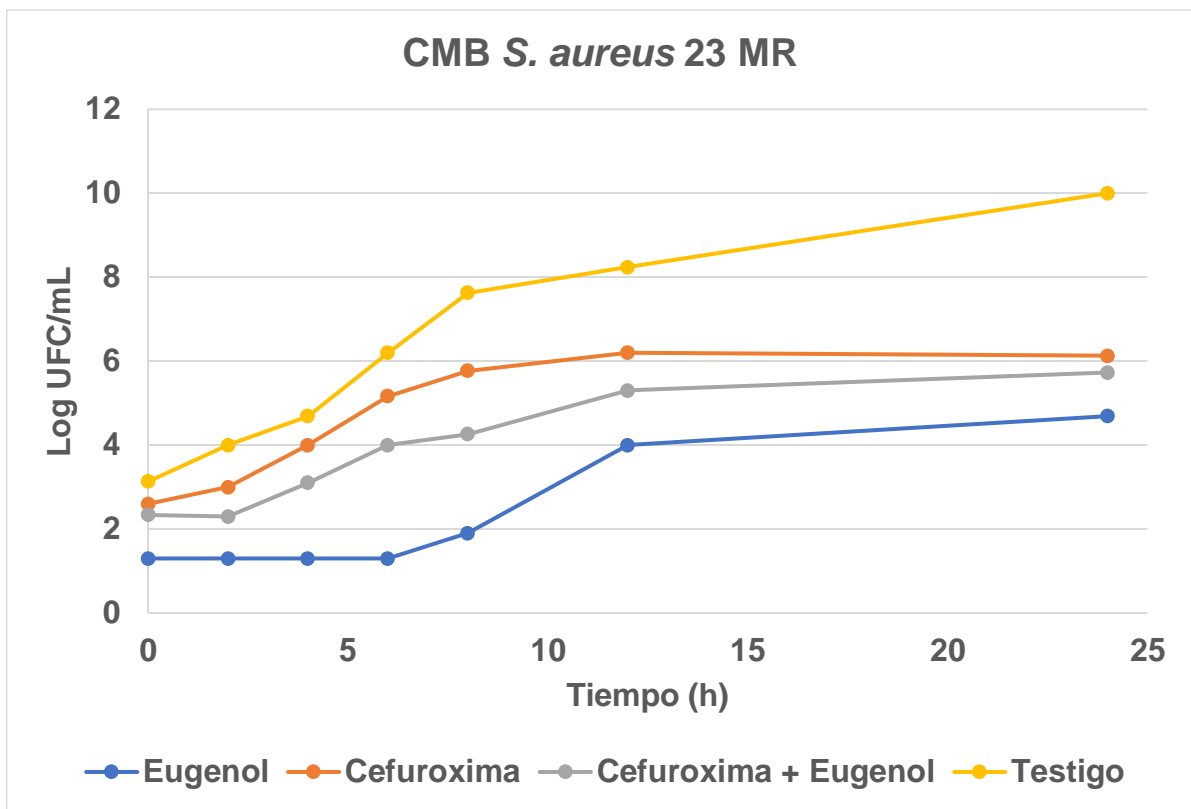


Figura 4. Curva de crecimiento para la CMB de la cepa *S. aureus* 23 MR.

Cepa multirresistente en presencia del Eugenol, Cefuroxima y su combinación, en cantidades mínimas bactericidas. Concentración evaluada (30 µg/mL) Eugenol a una concentración de (1.0 µg/mL).

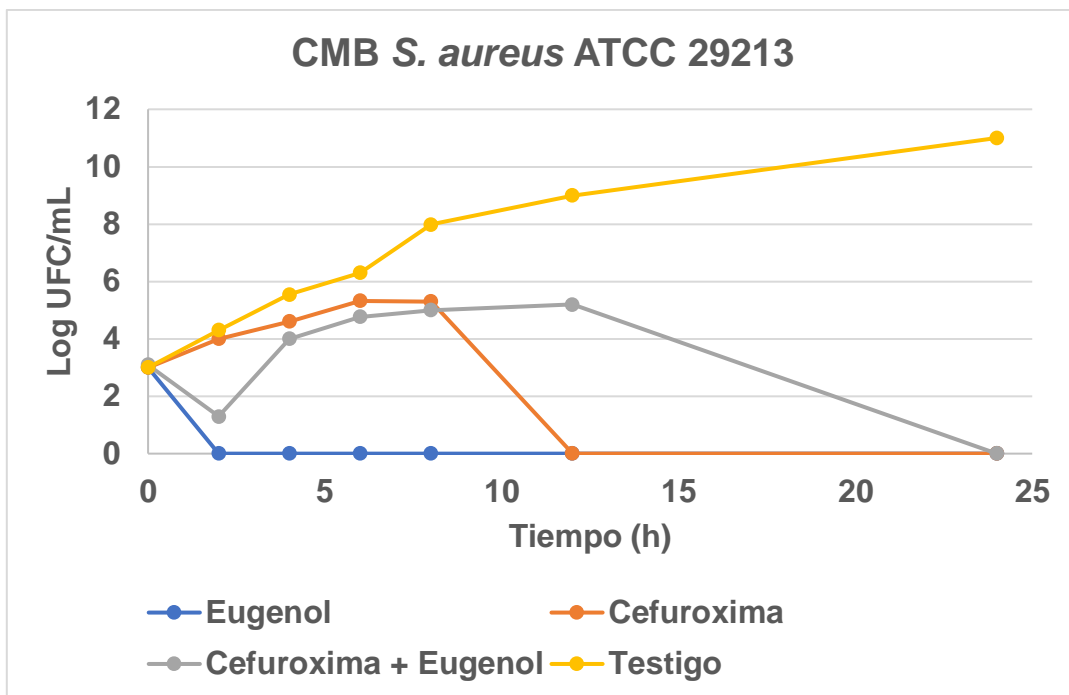


Figura 5. Curva de crecimiento para la CMB de la cepa *S. aureus* ATCC 29213.

Cepa de catálogo en presencia del Eugenol, Cefuroxima y su combinación en cantidades mínimas bactericidas. Concentración evaluada (>0.23 µg/mL) Eugenol a una concentración de (0.12 µg/mL).

Para las Concentraciones Bactericidas Mínimas se presenta que para la cepa multiresistente en la figura 4 el Eugenol a diferencia del antibiótico presenta una disminución mayor en las poblaciones bacterianas comparado con el antibiótico solo, pero al combinarlos utilizando una cantidad subinhibitoria de Eugenol, se muestra una disminución por debajo del antibiótico solo en las primeras dos horas, pero no por debajo del Eugenol a diferencia en la figura 5 de la cepa de catálogo, ya que, en esta se muestran disminuciones drásticas de las poblaciones bacterianas en el Eugenol a las 12 horas, el antibiótico a las 12 horas y su combinación 24 horas después, la combinación muestra una disminución por debajo del antibiótico solo, pero muestra una disminución total del crecimiento a un mayor tiempo que el antibiótico solo.

6. Docking Molecular

Se realizó el Docking molecular en el programa AMDock, se visualizaron y obtuvieron las imágenes 3D en el programa PyMOL, el esquema 2D se obtuvo con el programa Discovery Studio 2020 para la cepa *S. aureus* en donde se observó una mayor actividad con base en el objetivo del proyecto, en donde se corrió un docking para la proteína β -Lactamasa de la cepa *S. aureus* y como ligando el Eugenol, la Cefuroxima e igual un empalmamiento de los dos ligandos y la proteína en donde se observaría su posible acción, se obtuvieron diferentes poses de acoplamiento y con base en su afinidad la mayor eficiencia. Los resultados se muestran en las siguientes tablas e imágenes:

Tabla 5. Valores de afinidad y poses del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* con el antibiótico Cefuroxima y el compuesto Eugenol.

Poses	Afinidad (kcal/mol)	Estimación Ki	Unidades Ki	Eficiencia del ligando
1	-4.8	0.30	mM	-0.40
5	-4.3	0.70	mM	-0.36
2	-4.0	1.17	mM	-0.33
6	-4.0	1.17	mM	-0.33
7	-3.9	1.38	mM	-0.33
9	-3.9	1.38	mM	-0.33
8	-3.8	1.64	mM	-0.32
10	-3.8	1.64	mM	-0.32
4	-3.7	1.94	mM	-0.31
3	-1.8	47.93	mM	-0.15

Tabla 6. Valores de afinidad y poses del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* con el antibiótico Cefuroxima.

	Afinidad (kcal/mol)	Estimación Ki	Unidades Ki	Eficiencia del ligando
1	-6.66	13.13	uM	-0.23
2	-6.31	23.70	uM	-0.22
3	-6.17	30.02	uM	-0.21
6	-5.92	45.77	uM	-0.20
10	-5.37	0.12	mM	-0.19
8	-5.15	0.17	mM	-0.18
7	-4.97	0.23	mM	-0.17
4	-4.13	0.94	mM	-0.14
5	-3.97	1.23	mM	-0.14
9	-3.85	1.51	mM	-0.13

Tabla 7. Valores de afinidad y poses del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* con el compuesto Eugenol.

	Afinidad (kcal/mol)	Estimación Ki	Unidades Ki	Eficiencia del ligando
8	-4.28	0.73	mM	-0.36
6	-4.11	0.97	mM	-0.34
5	-4.10	0.99	mM	-0.34
9	-4.10	0.99	mM	-0.34
1	-4.03	1.11	mM	-0.34
4	-4.00	1.17	mM	-0.33
3	-3.78	1.70	mM	-0.32
10	-3.71	1.91	mM	-0.31
7	-3.39	3.27	mM	-0.28
2	-3.31	3.75	mM	-0.28

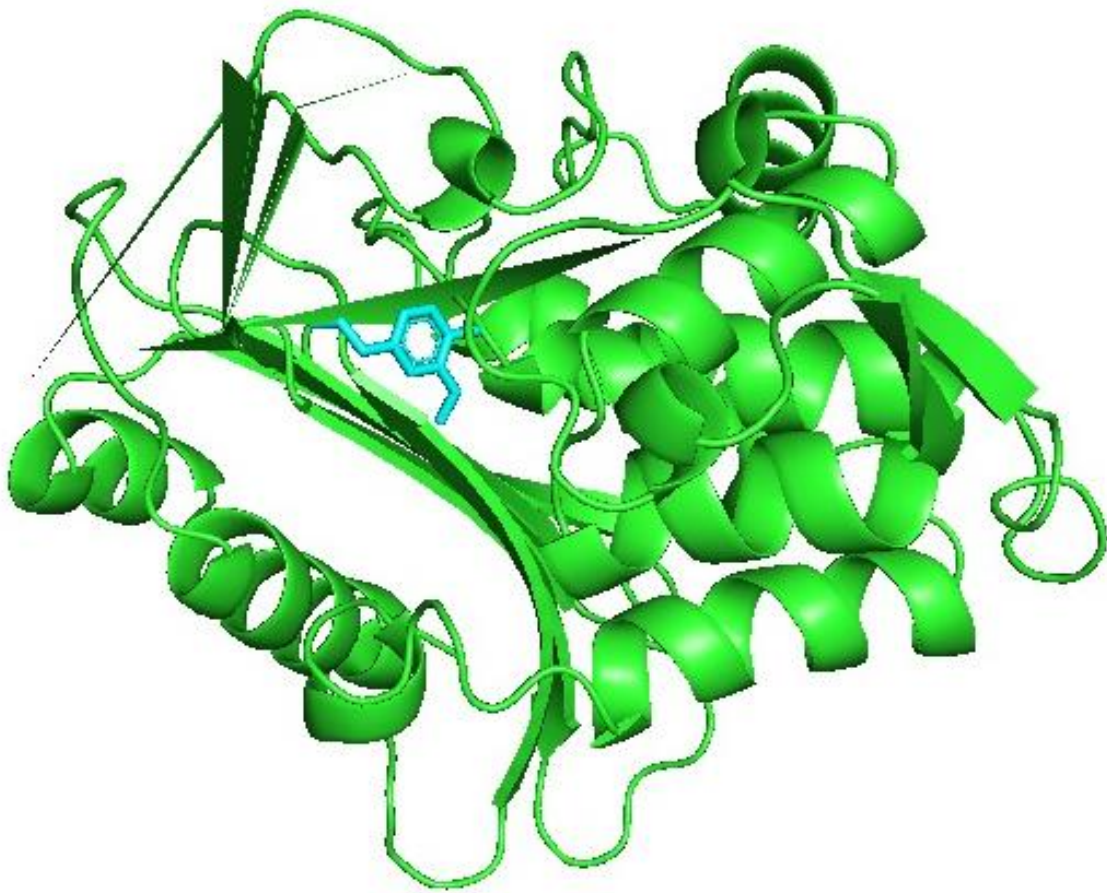


Figura 6. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* y el compuesto Eugenol.

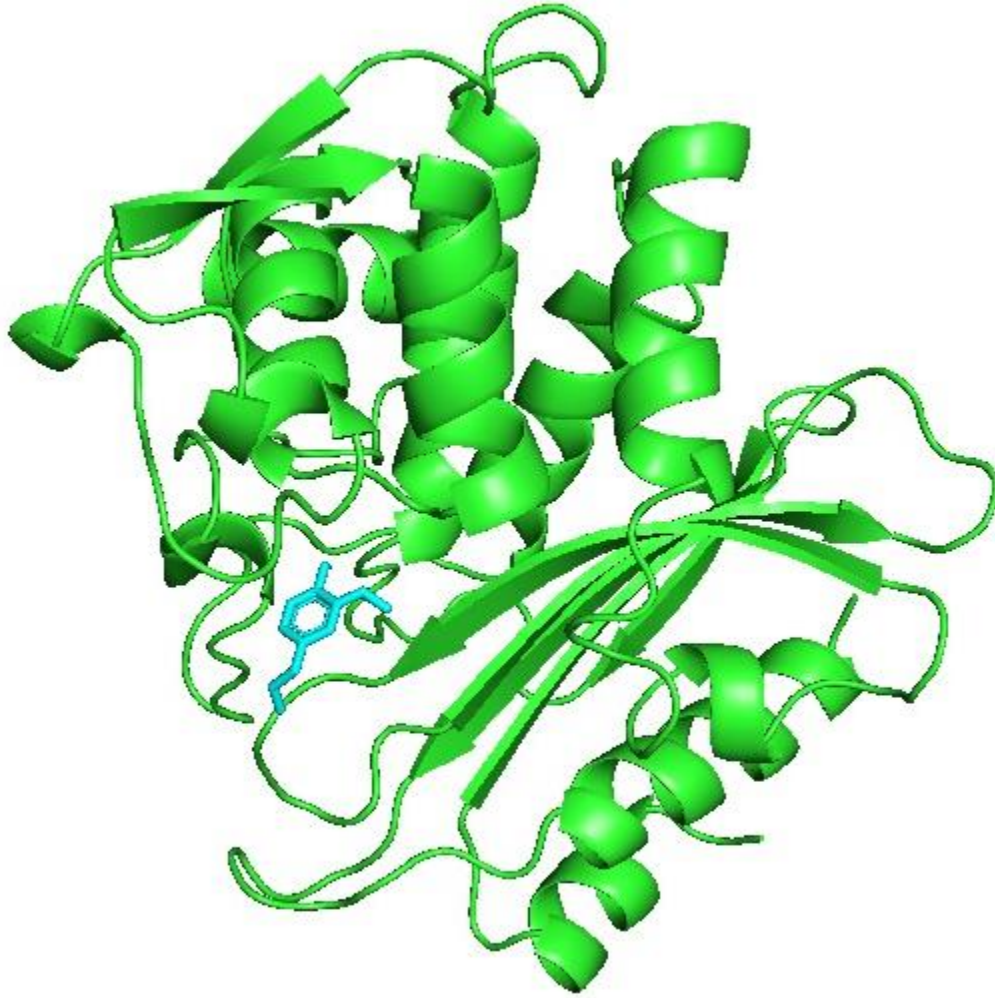


Figura 7. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* y el compuesto Eugenol.

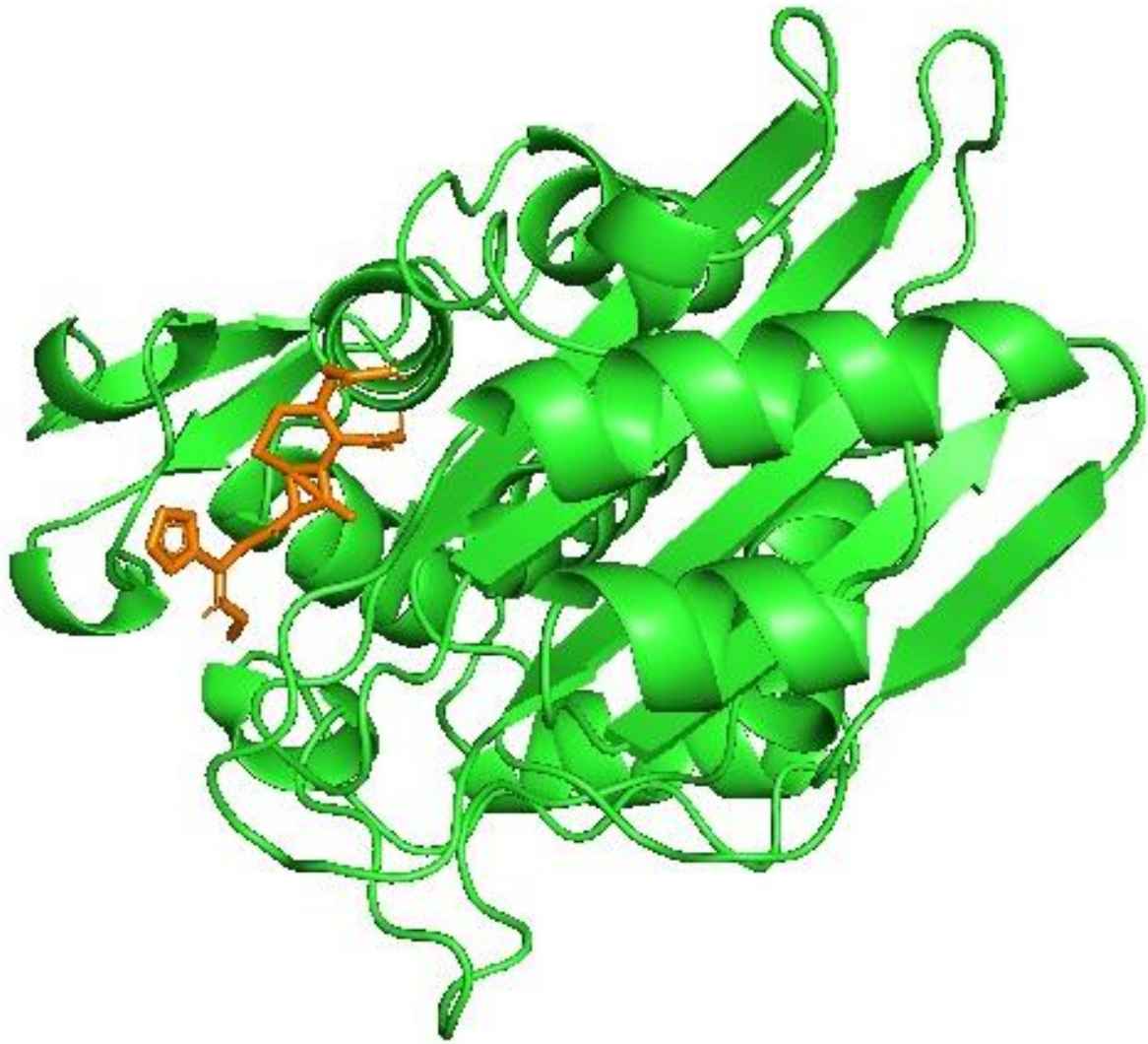


Figura 8. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* y el antibiótico Cefuroxima.

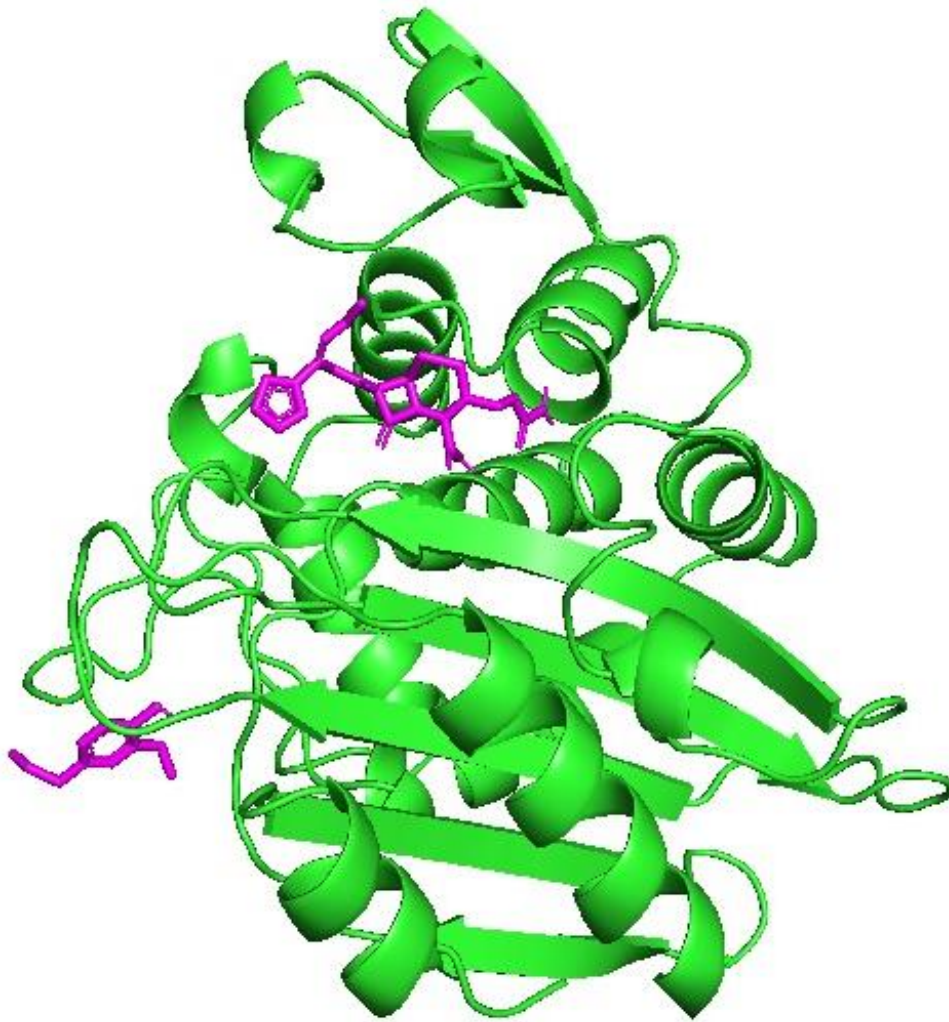


Figura 9. Acoplamiento de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus* con el antibiótico Cefuroxima y el compuesto Eugenol.

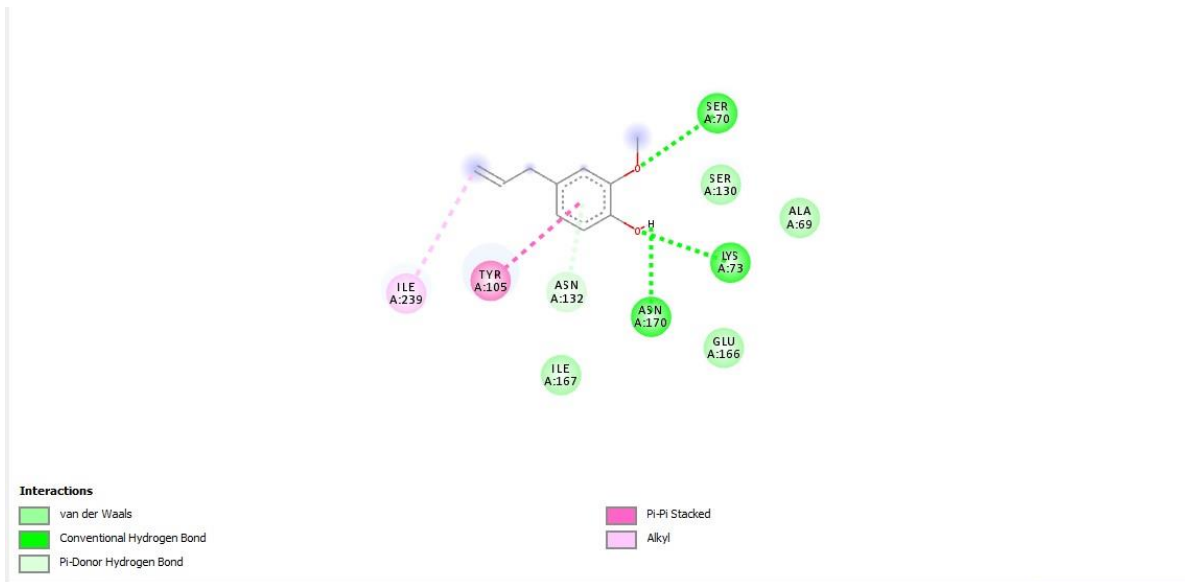


Figura 10. Esquema 2D de la interacción del Eugenol con los residuos de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus*.

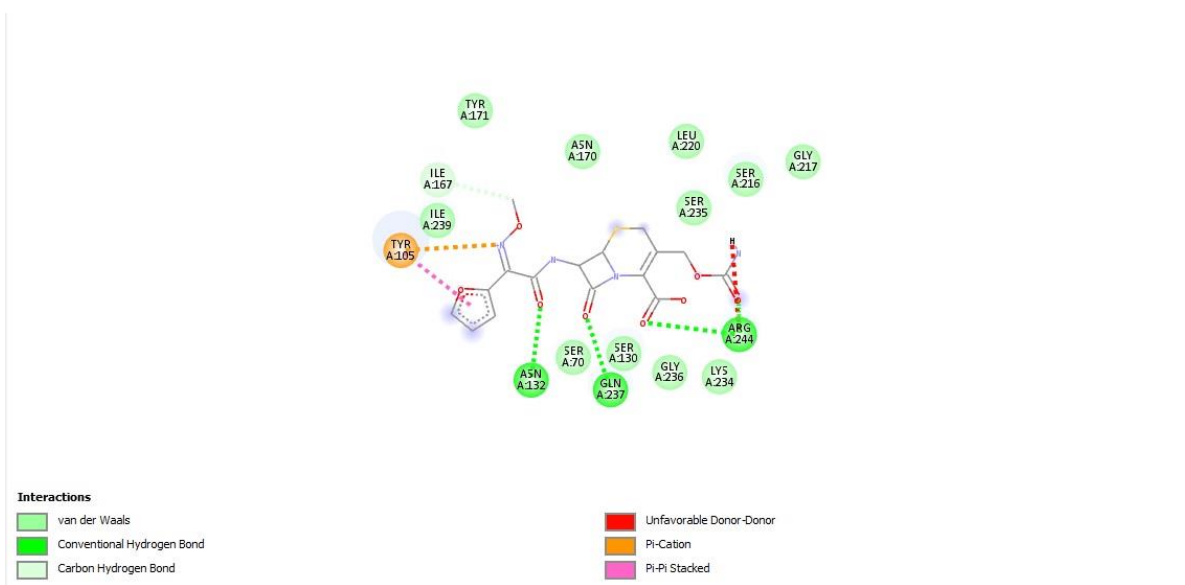


Figura 11. Esquema 2D de la interacción del antibiótico Cefuroxima con los residuos de la proteína β -Lactamasa de *S. aureus*.

En la tabla 5 se observa que la posición más favorable y efectiva en la combinación del Eugenol y Cefuroxima frente a la proteína β -Lactamasa fue la número 1 con una afinidad del - 4.8 kcal/mol y una eficiencia del ligando de - 0.40 en la figura 9 se observa el empalmamiento de los dos ligandos (Eugenol y Cefuroxima) en donde estas dos moléculas se observan de color rosa y el resto de la proteína de color

verde, observando pues que el antibiótico Cefuroxima se une en un sitio ortostérico y el ligando Eugenol en un sitio alostérico.

En la tabla 6 para el caso del acoplamiento de la proteína β -Lactamasa con el antibiótico Cefuroxima se obtuvo que la posición número 1 fue la más favorable con un valor de afinidad de - 6.66 kcal/mol y una eficiencia del ligando de - 0.23 observado en la figura 8 el acoplamiento en 3D, en color naranja el compuesto Cefuroxima y en color verde el resto de la proteína.

En la tabla 7 se observan los resultados para el acoplamiento del Eugenol y la proteína β -Lactamasa, en donde los resultados muestran que la posición 8 fue la más eficaz con un valor de afinidad de - 4.28 kcal/mol y una eficiencia de ligando de -0.36. En la figura número 7 y 6 se observa el acoplamiento del Eugenol con la proteína β -Lactamasa, en donde el Eugenol se muestra de color azul y el resto de la proteína en color verde desde dos perspectivas diferentes.

En la figura 10 se observa la interacción del Eugenol con los aminoácidos pero al momento de que los aminoácidos forman parte de una enzima o proteína se les conocerá como residuos, de esta manera el Eugenol interactúa con los residuos Isoleucina (ILE A:239), Tirosina (TYR A:105), Aspartato (ASN A:132), Aspartato (ASN A:170), Lisina (LYS A:73), Serina (SER A:70) así mismo podemos observar que la interacción del Eugenol con la proteína es por medio de enlaces alquilo con la Isoleucina A:239, para el caso de la Tirosina A:105 la interacción es por medio del enlace π - π , el Aspartato A:132 interactúa por un enlace π -hidrogeno donante, la Lisina A:73, el Aspartato A:170 y la Serina A:70 interactúan con el Eugenol por enlaces de hidrógeno.

Para el caso de la interacción de los residuos con el antibiótico Cefuroxima en la figura 11 se puede observar que interactúa con Isoleucina (ILE A:167), Tirosina (TYR A:105), Aspartato (ASN A:132), Glutamina (GLN A:337), Arginina (ARG A:244), en donde para los enlaces por puentes de hidrógeno se observan en Aspartato, Glutamina y Arginina, en esta última se observa también un enlace de tipo donador-donador desfavorable, para la Tirosina la interacción es por medio del enlace π - π

además de una interacción enlace π -catión y finalmente la interacción de Isoleucina es por medio del enlace de hidrógeno de carbono.

7. Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico ANOVA multifactorial para los halos de inhibición obtenidos de las combinaciones del Eugenol y los compuestos.

Las conclusiones para los halos obtenidos de las combinaciones son las siguientes:

Como el valor de $P= 5.4 \times 10^{-9}$ resulto menor que $\alpha= 0.05$ se rechaza H_0 y se concluye que existe diferencia significativa en los halos de inhibición obtenidos entre las cepas multirresistentes y las cepas de catálogo. Lo anterior se afirma con una confiabilidad del 95%.

Como el valor de $P= 3.25 \times 10^{-28}$ resulto menor que $\alpha= 0.05$ se rechaza H_0 y se concluye que si existe diferencias significativas en los halos de inhibición obtenidos entre los compuestos combinados con el Eugenol. Lo anterior se afirma con una confiabilidad del 95%.

Como el valor de $P= 1.40 \times 10^{-13}$ resulto menor que $\alpha= 0.05$ se rechaza H_0 y se concluye que si existe interacción entre los compuestos combinados con Eugenol y las cepas probadas. Lo anterior se afirma con una confiabilidad del 95%

Discusión.

Con base en los resultados del presente estudio se valida el uso en la medicina tradicional de las plantas que en su aceite esencial o extracto contengan Eugenol, ya que este presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas.

El Eugenol mostró actividad antimicrobiana contra las cepas evaluadas *S. aureus* y *E. coli* con una concentración de 4 µg/mL de Eugenol por disco, estudios previos revelan que los aceites esenciales de pimienta negra, canela y el clavo exhiben actividades antimicrobianas contra patógenos transmitidos por alimentos (Purkait et al., 2020). La bacteria *E. coli* es una bacteria que comúnmente se encuentra en los intestinos de las personas, animales, en el medioambiente, en los alimentos y el agua sin tratar.

En el caso del análisis estadístico se obtuvo que, si existe diferencia significativa entre los compuestos utilizados en el presente proyecto en combinación con el Eugenol, contrastado con los datos obtenidos en la tabla 1, en donde se ve que muchos de los compuestos presentaban una actividad nula frente a las cepas utilizadas en el proyecto, mientras que, al ser combinados con el Eugenol, en su mayoría presentaron actividad inhibitoria.

Para las Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Concentraciones Mínimas Bactericidas, se obtuvo que no existió diferencia entre la Concentración Mínima Bactericida de las cepas gram-positivas y gram-negativas pues se estableció en una concentración de 3 µg/mL en donde la concentración de Eugenol fue de 27.62 µg/mL, por otra parte para la Concentración Mínima Inhibitoria se obtuvo que la menor concentración fue para *S. aureus* ATCC 29213 la cepa de catálogo con una concentración de 0.125 µg/mL en donde la concentración de Eugenol fue de 1.15 µg/mL de aceite, en segundo lugar *E. coli* 82 Mr con una concentración de 0.25 µg/mL en donde la concentración Eugenol fue de 2.3 µg/mL, siguiéndole *E. coli* ATCC 25922 con una concentración de 0.5 µg/mL con una concentración del aceite de Eugenol de 4.60 µg/mL y finalmente *S. aureus* 23 MR con una concentración de 1

$\mu\text{g/mL}$ con una concentración de $9.21 \mu\text{g/mL}$ de aceite de Eugenol. Dhara y Tripathi (2020) determinaron una concentración de Eugenol de $7.28 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *E. coli* una concentración menor a la reportada en este estudio.

Purkait y colaboradores en 2020 evaluaron la eficacia antibacteriana, antifúngica y antioxidante de los aceites esenciales de tres especias de uso común, reportaron una CMI para el aceite de clavo de $58.54 \pm 3.17 \mu\text{g/mL}$, reportando así mismo que su mayor componente fue el Eugenol con una presencia del 53.9 %.

Para la sensibilidad de la resistencia se mostró que el ácido clavulánico y la reserpina no mostraban actividad frente a las cepas *S. aureus* y *E. coli*, pero en combinación con Eugenol ($4 \mu\text{g/mL}$), cada uno mostraron una actividad frente a las cepas, autores afirman que el ácido clavulánico se une de manera irreversible a las β -Lactamasas pues contiene un anillo betalactámico en su estructura, evitando que se inactiven ciertos antibióticos betalactámicos, además del uso de Cefuroxima y Cefepima que funcionan como antibióticos betalactámicos a los cuales las cepas *S. aureus* 23 MR y *E. coli* 82 MR mostraron una resistencia, por esto se puede inferir que el método de resistencia de las cepas *S. aureus* 23 MR y *E. coli* 82 MR es por efecto de β -Lactamasas.

En el caso de la reserpina no mostraba actividad frente a ninguna cepa, al combinar la reserpina con Eugenol estos mostraron actividad frente a tres cepas, se puede inferir que como se ha reportado que el Eugenol presenta actividad en cantidades mínimas, la respuesta de la combinación y su actividad posiblemente fue por el Eugenol, ya que el compuesto reserpina demostró ser un inhibidor del mecanismo de resistencia que implica la sobreexpresión de bombas de flujo en la membrana celular (Garvey y Piddock, 2008) se infiere que la resistencia no es por bombas de flujo.

Para el caso de la inhibición de la formación de biofilm, se presentó en una mayor inhibición para las bacterias gram-negativas, resaltando que la inhibición fue casi similar en las dos cepas multirresistente y de catálogo, presentando una inhibición del 70.17 % y un 68.03 % respectivamente. En la literatura se menciona que el

Eugenol tiene la habilidad de inhibir la formación de biofilm al afectar la membrana citoplasmática (Walmiki y Ravishankar, 2017).

Así mismo Somrani y colaboradores en 2021 reportaron que el Aceite esencial de clavo mostro una inhibición de la formación de biofilm al paso de una hora del 25.2% frente a *Salmonella entérica* una bacteria gram-negativa, donde el Eugenol componía el 78.85% del aceite.

En cuanto a la capacidad sensibilizadora del Eugenol frente a los antibióticos se obtuvo que la Cefuroxima logro disminuir su concentración en presencia del Eugenol pasando de una CMI de 15 µg/mL a una cantidad menor a 0.23 µg/mL para la cepa *S. aureus* ATCC 29213 considerando así la cantidad de Eugenol 3.68 µg/mL, así mismo disminuyendo el valor de la CMI para la cepa *E. coli* ATCC 25922 de 120 µg/mL a 7.5 µg/mL la concentración de Eugenol utilizada para esta cepa fue de 1.84 µg/ml, para las cepas multirresistentes las cantidades permanecieron iguales, en el caso de cepa *S. aureus* 23 MR la cantidad de Eugenol utilizada fue de 0.5 µg/mL y para la cepa *E. coli* 82 MR 0.92 µg/mL.

Por otro lado, la Cefepima mostró disminuciones frente a tres cepas, *S. aureus* 23 MR de 0.9 µg/mL a 15 µg/mL la concentración utilizada de Eugenol fue de 0.5 µg/mL, para *S. aureus* ATCC 29213 de 0.9 µg/mL a 7.5 µg/mL con una concentración de Eugenol de 3.68 µg/mL y *E. coli* 82 MR de 0.9 µg/mL a 0.47 µg/mL con una concentración de Eugenol de 0.92 µg/mL.

Esto evaluado en las curvas de crecimiento se obtuvo que al combinar la Cefuroxima con Eugenol en una Concentración Mínima Bactericida al paso de 24 horas se obtendrá una inhibición completa de la cepa bacteriana *S. aureus* de catálogo, esto concuerda con Gonzales en 2002 pues a altas concentraciones el Eugenol tiene un efecto bactericida, acción atribuida a los fenoles por degradación de las proteínas, lo que resulta en daño a la membrana celular.

Para las Concentraciones Mínimas Inhibitorias se observa una disminución en el crecimiento de las bacterias, sin llegar a una inhibición por completo en ninguna de las cepas. En bajas concentraciones el Eugenol tiende a estabilizar las membranas

celulares, lo cual previene la penetración de las bacterias a los conductos destinatarios. (Gonzales, 2002)

El docking molecular dio como resultado que para el acoplamiento de la proteína β -Lactamasa y el Eugenol la mayor eficacia se observa en la posición 8 con un valor de energía de unión de - 4.28 (kcal/mol), en la figura 10 se muestran los resultados de la interacción del Eugenol con los residuos Isoleucina, Tirosina, Aspartato, Lisina y Serina.

Para el caso del acoplamiento para la proteína β -Lactamasa y el antibiótico Cefuroxima la mayor eficacia se observó en la posición 1 presentando una energía de unión de - 6.66 (kcal/mol), en la figura 8 podemos observar a la molécula de Cefuroxima interactuando con los residuos Isoleucina, Tirosina, Aspartato, Glutamina y Arginina.

Finalmente, para la combinación de Cefuroxima y Eugenol la mayor eficacia se obtiene en la posición 1, considerando su energía de unión con un valor de - 4.8 (kcal/mol), teniendo una interacción con los aminoácidos con estos valores y esquemas se puede confirmar la eficacia de la combinación del compuesto Eugenol como sensibilizador de las bacterias, tomando a consideración también que los programas utilizados son en función de análisis predictivos matemáticamente.

La mayor interacción se puede observar para el caso del Eugenol y la proteína β -Lactamasa esto pues entre menor sea el valor de afinidad mayor será la unión del ligando y la proteína.

Morris y Lim-Wilby en 2008 mencionaron que el objetivo del acoplamiento ligando proteína es predecir los modos de unión predominantes de un ligando con una proteína de estructura tridimensional conocida, así se proponen hipótesis estructurales de como los ligandos inhiben el objetivo, esto de acuerdo a los objetivos de este estudio respaldaría computacionalmente y predictivamente la efectividad de la combinación de Eugenol y Cefuroxima frente a la proteína de *S. aureus* y supondría los modos de interacción entre los ligandos y la proteína.

Conclusiones:

- El Eugenol presenta actividad antimicrobiana en cepas gram-positivas como gram-negativas.
- El Eugenol presenta una mayor inhibición sobre la formación de biofilm en cepas gram-negativas con una inhibición superior al 28%.
- El Eugenol en combinación del antibiótico Cefuroxima presenta una mayor eficacia frente a la cepa *S. aureus* ATCC 29213 disminuyendo la CMB y CMI por debajo de 0.23 µg/mL.
- Se comprueba que el Eugenol es un sensibilizador de resistencia de cepas bacterianas gram-positivas y gram-negativas.
- La combinación de Eugenol con Cefepima fue la más eficaz contra la cepa *S. aureus* ATCC 29213.
- El Eugenol presenta una sensibilización ante la resistencia de las cepas para el antibiótico Cefuroxima.
- La combinación de Eugenol y el antibiótico Cefuroxima es eficaz contra bacterias gram-negativas, con un valor de afinidad de - 6.66 (kcal/mol) por determinación computacional.
- El Eugenol presenta una inhibición no competitiva en conjunto con el antibiótico Cefuroxima.

BIBLIOGRAFÍA:

- Ali S.M., Khan A.A., Ahmed I., Musaddiq M., Ahmed K.S., Polasa H., Rao L.V., Habibullah C.M., A Sechi L. and Ahmed, (2005) *Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen Helicobacter pylori*. *Ann Clin Microbiol Antimicrobials*
- Ashrafudoulla, Furkanur A., Jie-won S., Hong S. Do. (2020) Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*.
- Ávalos G. A. y Pérez-Urria C. E. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119 - 145.
- Ávila, J. G. (1996) Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM.México.
- Ballón P., Wendy G., Grados T., Ricardo E., (2019) Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. CON-CIENCIA vol 7: 55-72
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006&lng=es&tlng=es
- Bruneton J. (2001). *Farmacognosia*. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A
- Brunton L., Lazo S. y Parker L., (2007) Las bases farmacológicas de la TERAPÉUTICA, editorial McGraw-Hill Interamericana, <https://oncousd.files.wordpress.com/2015/06/goodman-farmacologia.pdf>
- Castellano González, Maribel J., Perozo-Mena, Armindo J. (2010). *Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en Staphylococcus aureus*. *Kamera*, 38(1), 18-35. Recuperado en 05 de abril de 2021, de

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003&lng=es&tlng=es.

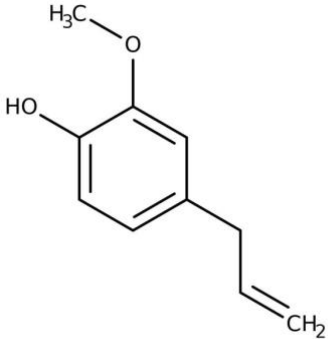
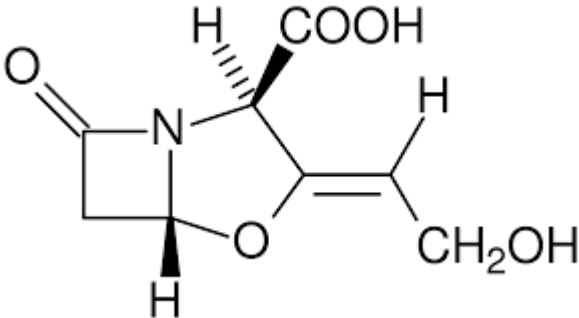
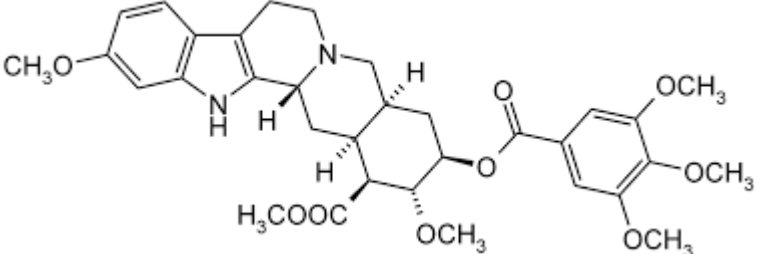
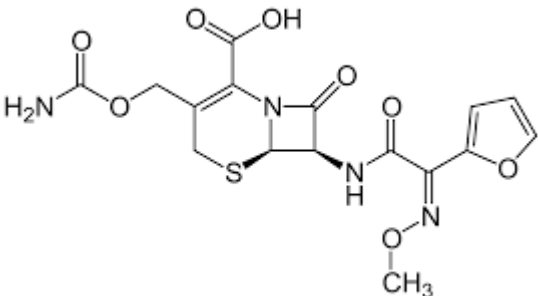
- Dhara L. and Tripathi A. (2020) *The use of eugenol in combination with cefotaxime and ciprofloxacin to combat ESBL-producing quinolone-resistant pathogenic Enterobacteriaceae*, journal of applied microbiology y ISSN 1364-5072 <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/jam.14737>
- Falleh H., Djebali K., Jemaa M.B., Hammami M., Khammasi S., y Ksouri R. (2021) Milk preservation: Enhancing the anti-Staphylococcus aureus potency using essential oils specific mixture. *Food Measure* 15, 376-385
- Feitosa D., Rodrigues C., Rose I., Oliveira E., Luiz R., Tavares J., Silvino P., MLS Y., Hs R., Datiane C., Douglas H., Barbosa J., Ribeiro G., Ribeiro J., Pinto J., Relison S. (2020) In vitro and in silico inhibitory effects of synthetic and natural eugenol derivatives against the NorA efflux
- Garvey, M. I. Y Piddock, L.J. (2008) The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that over express the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52(5): 1677-1685.
- Gómez N., Cáceres M., Stashenko E., Hidalgo W., Ortiz C (2020). *Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against Escherichia coli O157: H7 and Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* Multidisciplinary Digital Publishing Institute 12 pp
- Gómez-Sequeda N., Cáceres M., Stashenko E. E., Hidalgo W., y Ortiz C., (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*. 9: 730.
- González E. R. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 139-156. Recuperado en 03 de enero de 2021,

- de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200005&lng=es&tlng=es
- Khamouli S., Belaidi S. & Lanez T. (2019) Molecular Docking And Admet Studies Of Amino-Pyrimidine Derivatives As Mycobacterium Tuberculosis Ser/Thr Protein Kinases B INHIBITORS. Journal of fundamental and applied sciences, disponible en <https://eds-s-ebscohost-com.pbidi.unam.mx:2443/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=aa5e3051-37d6-48bc-833c-80d645ba4c9e%40redis>
 - Koneman E. W. (1996). Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana. México DF. 386-393pp.
 - Kuntz, I.D., Blaney, J.M., Oatley, S.J., Langridge, R., Ferrin, T.E. (1982). A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. J. Mol. Biol. 161, 269–288.
 - Lasa I., Pozo J. L., Penadés J. R., & Leiva J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 28(2), 163-175. Recuperado en 16 de abril de 2022, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es.
 - Morris, G.M., Lim-Wilby, M. (2008). Molecular Docking. In: Kukol, A. (eds) Molecular Modeling of Proteins. Methods Molecular Biology™, vol. 443. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
 - Picazo J.J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España. Consultado en: http://coesant-seimc.org/documents/métodosbásicos_sensibilidadantibióticos.pdf
 - Purkait S., Bhattacharya A., Bag A., and Chattopadhyay R.R. (2020) Synergistic antibacterial, antifungal and oxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01858-3>

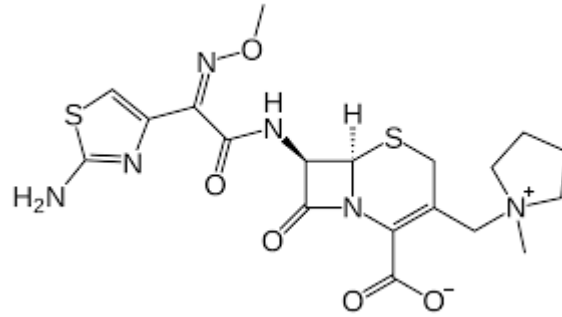
- Recacha Villamor E. (2019). Supresión de la respuesta SOS como estrategia para la sensibilización de bacterias Gram-negativas resistentes a quinolonas. (Tesis Doctoral Inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Rocha C.N.D., y Reynolds M. P., Simons (2015) Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud.
- Rodríguez E., Gamboa M., Hernández F., y García J. (2005). Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez O, J., y Príncipe V, J. (2005). Experto en fitoterapia. Alcalá la real. Editorial Formación Alcalá. pp ;15-23.
- Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. (2017) Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-bio-film agents and their mechanisms of action. *Virulence.*;9(1):522-554.
- Schillaci D., Ariza V., Dayton T., Camarda L. And Stefano V.Di (2008) In vitro anti-biofilm activity of *Boswellia* spp. Oleogum resin essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 47 433-438
- Somrain M., Debbabi H., Abidi F., y Palop A. (2018) The Anti-Biofilm Activity Of Cloven Essential Oil On *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis. *Nuevas Tendencias En Microbiología de alimentos* consultado en: <http://llibres.urv.cat/index.php/purv/catalog/book/331>
- Walmiki R., Ravishankar V. (2017) Cell Attachment Inhibition and Anti-biofilm Activity of *Syzygium aromaticum*, *Cuminum cyminum* and *Piper nigrum* Essential Oils Against Pathogenic Bacteria. *Journal Essential Oil-Bearing Plants.* DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1287011>

Apéndice 1

Estructura química de los compuestos utilizados en el presente estudio.

Nombre	Estructura química
Eugenol	 <p>The chemical structure of Eugenol is a benzene ring substituted with a methoxy group (H₃C-O) at the 1-position, a hydroxyl group (HO-) at the 3-position, and an allyl group (-CH₂-CH=CH₂) at the 4-position.</p>
Acido clavulánico	 <p>The chemical structure of Clavulanic acid is a bicyclic beta-lactam. It features a six-membered ring with a nitrogen atom and a carbonyl group, fused to a five-membered ring with an oxygen atom. The structure includes a carboxylic acid group (COOH), a hydroxyl group (CH₂OH), and a hydrogen atom (H) attached to the bicyclic core.</p>
Reserpina	 <p>The chemical structure of Reserpine is a complex pentacyclic alkaloid. It consists of an indole ring system fused to a piperidine ring, which is further fused to a hexahydroindole ring. The structure is highly substituted with methoxy groups (OCH₃), a methyl ester group (H₃COOC), and a trimethoxybenzoyl ester group.</p>
Cefuroxima	 <p>The chemical structure of Cefuroxime is a second-generation cephalosporin. It features a beta-lactam ring fused to a dihydrothiazolidine ring. The structure is substituted with a carboxylic acid group (COOH), a methyl ester group (CH₃), a furfuryl group, and a side chain containing a methylamino group (H₂N) and a methoxy group (OCH₃).</p>

Cefepima



Apéndice 2.

Método de difusión de agar de Kirby- Baüer. (Rodríguez, 2005)

*Antes de inocular las cajas y de impregnar los sensidiscos, el agar y los sensidiscos se esterilizarán en Autoclave a 121°C bajo 1 atmósfera de presión, por 15 min.

Este método se basa en la utilización de sensidiscos de papel Whatman 5 impregnados con una concentración conocida de la sustancia antimicrobiana a utilizar.

Cuando el agar se ha solidificado, se procede a inocular las cajas con las suspensiones que contienen a cada microorganismo.

Los discos son colocados en la superficie del agar en el que pondrá a inocular una suspensión de la cepa a probar.

Las cajas son aseguradas con cinta y volteadas de manera que el agar quede hacia arriba. Son incubadas a 37°C por un periodo de 24hrs.

Pasado el tiempo de incubación se procede a medir los halos formados alrededor de los sensidiscos en milímetros.

Apéndice 3

Técnica de microdilución en caldo (Koneman 1996).

El inóculo se prepara colocando con un asa bacteriológica colonias de una misma bacteria, se sumerge el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuaga bien en el líquido hasta que se desprenda todo rastro de bacteria y acto seguido se retira el asa de siembra hasta que la turbidez del medio sea equivalente al No. 0.5 de McFarland, (1.5×10^8 de bacterias por mL).

Se tomarán 10 μ L de inóculo y se suspenderán en 10 mL de solución salina al 0.9% estéril. Se prepararán tubos con caldo MH, con las siguientes concentraciones de los compuestos y de las mezclas 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1.00, 2.00, 3.00 y 4.00, posteriormente de los tubos con las concentraciones se toman 100 μ L de cada concentración en tubos eppendorf y a esos tubos se les adiciona 100 μ L de inóculos de cada cepa. Los tubos se incuban por 24 horas a 37°C, posterior a ese tiempo de incubación las bacterias se siembran en agar MH, para sembrar se tomaron con micropipeta 50 μ L de cada tubo eppendorf colocándose en su respectivo agar. Posterior a eso se incubo durante 24 horas a 37°C y se observó la disminución en el crecimiento del microorganismo. Para los controles positivos se utilizaron diferentes concentraciones de cloranfenicol y nistatina para bacterias.

Apéndice 4

Método de cristal violeta (Gómez-Sepulveda et al. 2020)

Este método se evalúa en placas de 96 pozos con un volumen final de 200 µL se adicionaran 100 µL de la cepa a una concentración de 1×10^5 en solución salina con 100 µL del compuesto a diferentes concentraciones se dejara por 48 hrs en incubación a 37 ° sin agitarse permitiendo la adherencia de bacterias a la superficie, después de esas 48 hrs se desechara el contenido y se lavara 3 veces con solución salina estéril al 0.9% para eliminar las bacterias, se dejara secando a una temperatura de 60°C por 45 minutos después se proseguirá a agregar 200 µL de cristal violeta al 0.4% dejándose reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se lavaran 3 veces con solución salina estéril al 0.9% para remover el exceso de cristal violeta para añadir 200 µL ácido acético al 30 % en agua destilada, dejándose por 15 minutos para la lectura en el lector ELISA a 595 nm.

Para obtener el porcentaje de inhibición será calculado usando la fórmula:

$$\text{Inhibition Percentage} = \frac{OD \text{ negative control} - OD \text{ Experimental}}{OD \text{ negative control}} \times 100$$

Apéndice 5

Método de Sensibilización (Picazo, 2000)

El volumen de cada pocillo suele ser de 100 μL , por lo que al inocular las placas con 100 μl por pocillo de caldo que contenga el compuesto antimicrobiano (tamaño del inóculo < 10 μl) o 50 μl (si se utiliza también para inocular placas de 50 μl). Cabe señalar que, al calcular la concentración inicial más alta, la concentración del agente antimicrobiano se diluirá a la mitad después de la adición del inóculo. Por lo tanto, utilizando una pipeta multicanal, agregue 100 o 200 μl de la solución antibacteriana más alta a la placa en la línea 1 según el volumen final del inóculo. Luego, se agregan 50 o 100 μl de caldo libre de antibacteriano de la fila 2 a la 11, la dilución se realiza con una pipeta multicanal, teniendo en cuenta que los pocillos de la última columna siguen sirviendo de controles (positivo - no antibacteriano - y negativo - no inoculado). El inóculo en el método de dilución en caldo se prepara a partir de una suspensión de 0,5 en la escala de McFarland con crecimiento o suspensión directa usando uno de estos dos métodos. En la técnica de microdilución, el volumen de inóculo final debe ser de 5×10^5 CFU/ml o 5×10^4 CFU/pozo. Con base en esto, se diluirá la suspensión original en caldo Mueller-Hinton según el método elegido. Para microdiluciones, haga una dilución 1:10 usando 5 μl de inóculo o una dilución 1:100 con inóculo 50 μL . El inóculo diluido debe usarse dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación. Las placas deben sellarse con parafilm antes de la incubación para evitar la evaporación del medio. Es necesario probar el inóculo durante su preparación mediante la inoculación de porciones diluidas en medios sólidos para que el inóculo real utilizado pueda calcularse después de la incubación. Para facilitar el recuento, los tubos de control positivo de 10 μL pueden diluirse en 10 mL de solución salina y luego inocularse con 100 μL de la dilución. Si el inóculo es de 5×10^5 CFU/ml, deberían crecer 50 colonias en las placas de medio sólido. Incubar los tubos o placas a 35°C durante 16 a 20 horas. La interpretación de los resultados se facilita por referencia al crecimiento observado en el tubo de ensayo o el control positivo. Las placas de microdilución deben tener al menos 2 mm de turbidez o tinción para estos controles positivos.

Apéndice 6

Curva letal (Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento) (Kubo 1993 et al, citado en Ávila, 1996).

Se preparará tubos con las cepas bacterianas a probar y se dejarán incubando durante 24 horas.

Se preparará y rotulará un tubo sin antibióticos que servirá como control.

El inóculo se preparará con aproximadamente 1×10^5 UFC/mL en un tubo con rosca con 10 ml de caldo MH de la concentración.

Inocular con ayuda de una micropipeta, 0.01 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano, el cual estará en una concentración igual a la concentración bactericida, a la concentración bactericida mínima y sus múltiplos medios; esto será la CMB, CMI y la mitad de la CMI. La concentración final debe ser aproximadamente de 1×10^5 bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se deberá incubar en una estufa sin presión de CO₂ a 37°C.

Muestrear cada dos horas durante los primeros cuatro tiempos (T0-0, T1-1, T2-2, T3-3, T4-4), el tiempo 5 se muestra a las 12 horas y el tiempo 6 a las 24 horas. Se realizan 2 diluciones para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, una vez incubadas durante 24 horas a 37°C.

Se grafica el Log₁₀ del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el tiempo en donde se produzca la inactivación.