



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“MIRCENO Y OCIMENO: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA  
E INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGA**

PRESENTA

**MARÍA FERNANDA CHÁVEZ ESTRADA**

DIRECTORA DE TESIS:

M. en C. MARISOL AVILA ROMERO



LOS REYES IXTACALA,  
TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

NOVIEMBRE, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

*“Cuando una puerta a la felicidad se cierra, otra se abre;  
pero a menudo miramos tanto tiempo la puerta cerrada  
que no vemos la que ha sido abierta para nosotros”.*

*Helen Keller*

*“Somos lo que hacemos constantemente.  
La excelencia es definida por nuestros hábitos”*

*Aristóteles*

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por darme la oportunidad de crecer académica y personalmente.

A la FES Iztacala y la carrera de Biología por tener un excelente cuerpo académico y apoyar a la comunidad universitaria y externa.

A la maestra Marisol Avlia Romero por hacer más que mi tutora, por ser una consejera, una amiga, una hermana mayor y hasta una mamá, por preocuparse por mí, por mi bienestar y mi salud, por ayudarme a crecer no solo como estudiante, sino también a crecer como persona. Por esos ratos de alegría durante el arduo trabajo que tuvimos, por ser la mujer tan admirable que es, por enseñarme que sin importar cuantas cosas tengas en la cabeza, todo sale y que con esfuerzo, dedicación y trabajo duro una mujer puede partirse en mil y conquistar su mundo.

A mis revisores, por la dedicación y los aportes para la mejora de este trabajo:

A la Dra. Ana María García Bores gracias por su paciencia, por sus enseñanzas y por estar siempre dispuesta a escucharnos y aconsejarnos.

Al Dr. José Guillermo Avila Acevedo, por resolver mis dudas, por esas charlas en las que el tiempo no pasaba y por ser un profesor ATM.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado por preocuparse por nosotros y por ayudarnos en todo lo que le era posible.

A la M. en C. Julieta Orozco Martínez gracias por esos momentos tan divertidos, por ser como una hermana mayor y dejarnos crecer.

A los laboratorios de Farmacognosia y Fitoquímica, gracias por dejarme ser parte de esta gran familia fito-farma.

A la Dra. Monts por ser “La jefa”, por ayudarnos a ser más cercanos y convivir fuera del laboratorio, por su completa honestidad y confiar en nosotros. Al Dr. Isrra, gracias por esta siempre dispuesto a ayudar y a compartir con nosotros lo que usted se gana con esfuerzo. A la Dra. Roció por tener la paciencia de resolver todas mis curiosidades y por esos momentos en los que compartió un poco de su vida conmigo.

A mis hermanitos Pedro, Karen, Georgy, Isma y Kary, por ser las maravillosas personas que son, por esos días completos en el laboratorio en lo que por ustedes el cansancio no se sentía, gracias hacer el laboratorio divertido, por ayudarme en mi trabajo, por ser y estar siempre.

A mis amiguitos del laboratorio Lucy, Viry, Kike, Zay, Aketzally, Arianne, Gelos, Alma, Erick y Nalle por dejarme pasar momentos tan divertidos a su lado, por ese apoyo que me dieron desde que llegue y por todas sus enseñanzas.

A mi hermanita postiza cristina, mi kisirita gracias por estar en uno de los momentos más difíciles de mi vida, y aunque estas lejos, siempre contarás conmigo.

A Yadir por ser mi compañero de aventuras, por ser mi persona, por permitirme crecer y aprender a tu lado, por tenerme paciencia y ayudarme a ver mis errores, por quererme sin juzgarme y aceptarme como soy.

A mis amigos Erika, Sayuri, Rafa, Olea, Yuri, Amaury, Aby y Zule por apoyarme y ayudarme a salir adelante, por ser un grupo de locos con los que encajé perfectamente.

Mis guapas Eva y Azu, mis hermanitos Remi, Rols y Rix, a mi cuñiz Aurora, mi kokoro Sam, Andrea, Gaby, Jaqui, Mafer y Andrés por esos hermosos momentos en los que nos perdíamos en carcajadas, por ayudarme a crecer y a ver que las penas son más ligeras cuando las compartes con las personas que te quieren.

A Nadia por ser más que mi colega, por ser mi amiga y confidente, por esas noches en vela de charlas exquisitas, por creer en mí y ayudarme a ser valiente, por cuidarme y dejarte cuidar, por estar conmigo en las buenas, en las malas y en las peores. Siempre contarás conmigo.

A Dulce por ser esa magnífica persona, por decir lo que piensas y a expresar lo que sientes, por darme consejos excepcionales, por confiar en mí y considerarme una amiga.

A Vale, Ivette, Kay, Pedrin, Estef, Migue, Mich y Pamelis por estar conmigo desde el inicio de esta aventura llamada Carrera Universitaria, por acompañarme a explorar nuevos lugares y pasar excelentes aventuras.

A Angy porque gracias a ti deje de sentirme sola en un lugar nuevo y desconocido para mí, por tu apoyo y amistad incondicional, por confiarme muchas cosas de tu vida y permitirme pasar momentos excelentes a tu lado y por ser más que una amiga para mí.

Amigos míos gracias por enseñarme que no solo hay familia de sangre, si no que a lo largo de tu vida encuentras personas que se vuelven parte de tu familia, parte de ti y que marcan tu vida, gracias por apoyarme y creer en mí, por no dejarme nunca, por escucharme, por enseñarme que soy mejor de lo que yo pensaba y que todos merecen lo mismo que dan, por ayudarme a ver que las cosas malas de la vida se vuelven pequeñas cuando las compartes con los que se preocupan por ti.

Familia y amigos todos ustedes fueron, son y serán parte fundamental de mi vida, me ayudaron a ser lo que soy, este logro no lo hice sola, este logro también es de ustedes.

Tal vez la sangre te hace parientes, pero el amor y el apoyo te hacen familia.

## DEDICATORIAS

*A mi madre Lucy:*

*Por estar conmigo siempre, por apoyarme incondicionalmente sin importar lo lejos que me llevaron mis daciones y sueños. Por jamás dejarte vencer con las adversidades de la vida, por estar para mí siempre, por ser la mujer más maravillosa y admirable que conozco.*

*A mi padre Félix:*

*Simplemente no tengo palabras para agradecerte y expresarte mi amor; aunque desearía haberte tenido más tiempo conmigo fuiste el mejor padre y espero que donde sea que te encuentres, estés orgulloso de mí.*

*A mi hermano:*

*Por qué, aunque no me lo digas mucho, yo sé que me amas y que estarás para mí siempre, recuerda jamás estaremos solos, nos tendremos para apoyarnos el uno al otro.*

*A mis tíos, Juanita y Felipe:*

*Por estar con nosotros y apoyarnos, por cuidar y procurar a mi mamá, por apoyarme, bendecirme y por ser como mis segundos padres.*

*A mi tía Rosita:*

*Por quererme como a una hija, por mantenerme en sus oraciones, llevare conmigo el recuerdo de la mujer fuerte que siempre fue.*

*A mi abuelita:*

*Por ser el mejor ejemplo de humildad e inocencia y por enseñarme que sin importar lo poco que tengas con trabajo duro, esfuerzo y dedicación podrás a salir adelante.*

*A mis primos Gaby, Toño, Tere, Álvaro, Edu y Jessy:*

*Por ser como mis hermanos, darme apoyo y guía, por ser excelentes ejemplos a seguir, cuidarme y por estar para mí siempre.*

*A mis sobrinos:*

*Porque siempre me reciben con sonrisas y abrazos, por enseñarme otro tipo de amor y ayudarme a no olvidar lo maravilloso que es ser niño.*

*Érase una vez la historia de un niño y una niña, el niño se llamaba Siempre y era una persona soñadora, aventurera, que creía que todo lo que veía no era todo lo que había en realidad y que había algún lugar donde las leyendas cobraban sentido.*

*Por contra, estaba Nunca. Nunca era una persona pesimista, una persona realista, una persona que sólo se fiaba de aquello que podía comprobar y constatar con sus propios ojos y que no se creía ni historias ni cuentos.*

*Entonces, llegó un día en que Siempre se acercó a Nunca, y le dijo que su mayor sueño en la vida era viajar y llegar hasta el sol. Ella dijo “No podrás, si saltas te vas a caer, o lo que es peor, si llegas te vas a quemar”.*

*Supongo que ella lo que intentaba era ser la cuerda del globo de los pájaros que tenía en la cabeza Siempre, pero tal era el peso de sus sueños y tantos pájaros tenía en la cabeza, que llegó un día en que todos a la vez emprendieron el vuelo y Siempre se perdió en mitad del cielo.*

*Hay quién dice que llegó, otros que se cayó, incluso hay quién dice que cumplió su sueño, pero de todo esto que pasó, Nunca, nunca lo supo porque echó raíces en el suelo.*

*Y es que, si siempre te dices nunca, nunca será siempre.*

*Nunca será Siempre*

*David Röss*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>Índice de cuadros</b>	<b>II</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>III</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>III</b>
<b>Lista de abreviaturas</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>Justificación</b>	<b>7</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>7</b>
<b>Objetivos</b>	
Objetivo general	<b>8</b>
Objetivos particulares	<b>8</b>
<b>Metodología</b>	
1. Obtención de los compuestos y cepas	<b>9</b>
2. Actividad antimicrobiana	<b>9</b>
2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana	<b>9</b>
2.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana	<b>10</b>
2.3 Evaluación de la actividad antifúngica en hongos filamentosos	<b>10</b>
2.4 Efecto sobre una curva de supervivencia microbiana	<b>10</b>
3. Determinación de la interacción	<b>11</b>
4. Análisis estadísticos	<b>11</b>
<b>Resultados</b>	<b>12</b>
<b>Discusión</b>	<b>27</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>Referencias</b>	<b>37</b>
<b>Anexos</b>	
Anexo I. Estructura química de los compuestos mirceno y ocimeno	<b>47</b>
Anexo II. Técnica de difusión en agar o Kirby-Baüer	<b>47</b>
Anexo III. Técnica de dilución en caldo	<b>49</b>
Anexo IV. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos	<b>51</b>
Anexo V. Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento	<b>52</b>
Anexo VI. Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF)	<b>53</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas con mirceno y ocimeno.	13
Cuadro 2	Actividad antibacteriana de la combinación de los compuestos Mirceno: Ocimeno en cepas Gram positivas y negativas.	14
Cuadro 3	Actividad antifúngica en cepas de levaduras con mirceno y ocimeno.	15
Cuadro 4	Actividad antifúngica de la combinación de los compuestos Mirceno: Ocimeno en cepas de levaduras.	15
Cuadro 5	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cepas bacterianas Gram positivas con los compuestos por separado y en combinación.	16
Cuadro 6	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cepas bacterianas Gram negativas con los compuestos por separado y en combinación.	17
Cuadro 7	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) de cepas de levaduras con los compuestos por separado y en combinación.	18
Cuadro 8	Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) en cepas Gram positivas con las diferentes combinaciones de los compuestos mirceno: ocimeno.	24
Cuadro 9	Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) en cepas Gram negativas con las diferentes combinaciones de los compuestos mirceno: ocimeno.	25
Cuadro 10	Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) en cepas de levaduras con las diferentes combinaciones de los compuestos mirceno: ocimeno.	26

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Índice de la concentración para determinar el tipo de interacción.	Página 11
---------	--	--------------

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Curvas de crecimiento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CBM: Concentración Bactericida Mínima.	19
Figura 1A	Cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 expuesta a mirceno.	19
Figura 1B	Cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 expuesta a ocimeno.	19
Figura 1C	Cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 expuesta a la combinación 2:8 mirceno: ocimeno.	19
Figura 2	Curvas de crecimiento de <i>V. cholerae</i> ATCC 39440 CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CBM: Concentración Bactericida Mínima.	21
Figura 2A	Cepa <i>V. cholerae</i> ATCC 39440 expuesta a mirceno.	21
Figura 2B	Cepa <i>V. cholerae</i> ATCC 39440 expuesta a ocimeno.	21
Figura 2C	Cepa <i>V. cholerae</i> ATCC 39440 expuesta a la combinación 2:8 mirceno: ocimeno.	21
Figura 3	Curvas de crecimiento de <i>C. tropicalis</i> cc CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, CBM: Concentración Bactericida Mínima.	23
Figura 3A	Cepa <i>C. tropicalis</i> cc expuesta a mirceno.	23
Figura 3B	Cepa <i>C. tropicalis</i> cc expuesta a ocimeno.	23
Figura 3C	Cepa <i>C. tropicalis</i> cc expuesta a la combinación 2:8 mirceno: ocimeno.	23
Figura 4	Estructura química del Mirceno.	47
Figura 5A	Estructura química del Cis-Ociemeno.	47
Figura 5B	Estructura química del Trans-Ociemeno.	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosín trifosfato
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CF <sub>50</sub>	Concentración Fungicida Media
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CIF	Concentración Inhibitoria Fraccionada
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
EPA	Efecto Post Antibiótico
IPP	Isopentenil Pirofosfato
LPS	Lipopolisacáridos
MH	Müeller-Hinton
M	Mirceno
PDA	Agar Papa y Dextrosa
O	Ocimeno
UFC	Unidad Formadora de Colonia

## RESUMEN

Los componentes terpenoides son constituyentes de los aceites esenciales. Estos presentan propiedades biológicas tales como atrayentes de polinizadores, dispersores de semillas, repelentes, protección contra herbívoros, además de poseer actividad alelopática y antimicrobiana. En México, los habitantes del Valle de Tehuacán-Cuicatlán tienen un gran conocimiento de las plantas medicinales de la zona y el estudio de éstas se ha enfocado principalmente en la búsqueda de compuestos con efecto antimicrobiano. Se ha demostrado que de los componentes mayoritarios en los aceites esenciales de muchas plantas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán se encuentran los monoterpenos, entre ellos están el mirceno y el ocimeno. Los diferentes componentes de un aceite esencial pueden interactuar entre ellos y así modificar la eficacia antimicrobiana, estas modificaciones son conocidas como interacciones farmacológicas y originan distintos tipos de efectos: indiferencia, adición, antagonismo y sinergismo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana y las interacciones farmacológicas de los monoterpenos mirceno y ocimeno contra 20 cepas bacterianas, 3 cepas de levaduras y 4 cepas de hongos filamentosos. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron los compuestos por separado y en combinación (1:1, 2:8 y 8:2). Por medio de la técnica de difusión en agar se evaluó cualitativamente la actividad antimicrobiana, la técnica de dilución en caldo se usó para determinar la actividad cuantitativa, con la técnica de inhibición del crecimiento radial se evaluó la actividad antifúngica y por último para determinar el tipo de interacción (sinergismo, adición, indiferencia y antagonismo) se utilizó el índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF). Como resultado se obtuvo que los compuestos por separado inhibieron el crecimiento de 6 cepas bacterianas Gram positivas, 7 Gram negativas y 3 levaduras. Las combinaciones evaluadas (1:1, 8:2 y 2:8 mirceno-ocimeno) mostraron actividad en 20 cepas bacterianas y 3 cepas de levaduras. Las cepas más sensibles fueron *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 con la combinación 8:2 mirceno-ocimeno, *Vibrio cholerae* ATCC 39540 (CMI=0.25 mg/mL) y *Candida tropicalis* cc (CMI=0.25 mg/mL) ambas con la combinación 2:8. Ninguno de los compuestos ni las combinaciones presentaron actividad en las cepas de hongos filamentosos. Se realizaron curvas de sobrevivencia y se encontró que ambos compuestos solos y en combinación presentaron actividad bacteriostática en *S. epidermidis* 12228, *V. cholerae* ATCC 39540 y fungistática en *C. tropicalis* cc (cepa clínica). En cuanto a las interacciones farmacológicas, los resultados muestran que los compuestos mirceno y ocimeno presentaron principalmente indiferencia (62.32%), aunque también se presentó sinergismo (27.54%), y un porcentaje mínimo de interacciones antagónicas (4.35%). Con esto se concluye que ambos compuestos por separado y en combinación presentan actividad antimicrobiana, son bacteriostáticos y que la interacción que se presenta con más frecuencia es indiferencia.

## INTRODUCCIÓN

Un agente antimicrobiano es cualquier compuesto químico, natural o sintético, que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos. Desde el descubrimiento de los antibióticos, se ha observado una importante resistencia a los fármacos por parte de una gran cantidad de microorganismos (Usano-Alemaný *et al.*, 2014). Esto es un problema que se ha ido complicando, sobre todo en las últimas décadas, esto es porque a medida que se sintetizan nuevos agentes antimicrobianos, surgen cepas resistentes a los mismos. Se entiende por resistencia, al mecanismo a través del cual la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos (Cordies *et al.*, 1998).

Los remedios tradicionales durante un tiempo quedaron en desuso; sin embargo la creciente resistencia de los microorganismos a los fármacos antimicrobianos requiere una búsqueda de nuevas sustancias, procedentes de fuentes naturales como lo son las plantas (Pai *et al.*, 2004; Pandey y Kumar, 2013).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas, existe una amplia gama de fórmulas herbales que se utilizan para el tratamiento de enfermedades infecciosas, utilizándolas solos o en combinación (Barragan-Solís, 2006; Sharm *et al.*, 2017). En el estado de Puebla, los habitantes de Zapotitlán de las Salinas, situado en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, utilizan diversas especies de plantas para tratar enfermedades y se ha demostrado que presentan actividad antibacteriana contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Hernández *et al.*, 2003).

El estudio de las plantas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán se ha enfocado principalmente en la búsqueda de compuestos con efecto antimicrobiano que representen una opción viable de tratamiento para las personas de escasos recursos. Algunas como *Lantana achyranthifolia*, *Lippia graveolens*, *Acalypha monostachya* y *Caesalpinia melanadenia* tienen aceites esenciales que han demostrado poseer actividad antimicrobiana (Hernández *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales, son los responsables de los aromas característicos de las plantas. Estos son mezclas complejas de componentes con diversos grupos funcionales como son alcoholes, aldehídos, cetonas e hidrocarburos, los cuales forman parte del metabolismo secundario de las plantas, son líquidos a temperatura ambiente, muestran diferentes colores que van del amarillo pálido al verde esmeralda y del azul al rojo parduzco oscuro,

son altamente volátiles y sensibles a altas temperaturas, tienen importantes funciones ecológicas como atraentes de polinizadores y dispersores de semillas y polen, protección contra herbívoros y alelopatía (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Bassolé y Juliani, 2012; Reyes-Jurado *et al.*, 2012; Usano-Alemaný *et al.*, 2014).

Los aceites esenciales y sus constituyentes tienen diversas propiedades que se utilizan en las industrias para la producción de jabones, perfumes y artículos de tocador, también muchos de ellos son usados en la medicina tradicional porque exhiben actividades biológicas interesantes como insecticida, antibacteriana, antifúngica, anticonceptiva, espasmolítica y antiparasitaria (Cimanga *et al.*, 2002; Bassolé y Juliani, 2012; Usano-Alemaný *et al.*, 2014).

Los principales componentes de los aceites son los terpenos (Reyes-Jurado *et al.*, 2012). Estos son sustancias que presentan grupos funcionales (Paredes y Roca, 2004). Derivan de la fusión de 5 unidades de carbono del isopentenil pirofosfato (IPP), también denominado isopreno (C5) (Usano-Alemaný *et al.*, 2014), y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman (Sepúlveda *et al.*, 2003). Aunque estos compuestos presentan una biosíntesis y una estructura en común, no desempeñan las mismas funciones (Paredes y Roca, 2004).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe principalmente a los terpenoides oxigenados (por ejemplo, alcoholes y terpenos fenólicos), mientras que algunos hidrocarburos como el ocimeno y el mirceno también presentan este mismo efecto (Bassolé y Juliani, 2012). Estos últimos son monoterpenos acíclicos (Bakkali *et al.*, 2008) que han sido encontrados en algunos aceites esenciales, son isómeros que solamente se diferencian en la posición del doble enlace.

El mirceno contiene dos unidades de isopreno unidas cabeza-cola, formando una cadena de 8 carbonos con dos ramificaciones de un carbono (McMurry, 2012), es utilizado para la producción comercial de terpenos alcohólicos (geraniol, nerol y linalol) y de aromas sintéticos. También se utiliza como punto de partida para la síntesis de vitaminas A y E (Kolicheski *et al.*, 2007).

El ocimeno por su parte es un trieno de olor agradable que se encuentra en los aceites esenciales de varias plantas, como son la albahaca (*Ocimum basilicum*), albahaca de clavo (*O. gratissimum*), evodia (*Evodia littoralis*) y en el aceite de estragón (*Artemisia*

*dracunculus*) y de lavanda francesa (*Lavandula Dentata*) (Guenther, 1949). Se usa principalmente en la industria de la perfumería y está aprobado por la FDA para uso alimentario (Consejo Europeo, 1974).

Algunos terpenos tienen actividad antimicrobiana por sí mismos; aunque no siempre un producto aislado de una planta resulta ser más efectivo que un aceite esencial el cual es una mezcla de compuestos (Bandoni *et al.*, 2009; Gallucci *et al.*, 2009), dentro de esta los diferentes componentes terpenoides pueden interactuar para reducir o aumentar la eficacia antimicrobiana (Bassolé y Juliani, 2012). Estas interacciones son conocidas como interacciones farmacológicas, las cuales son modificaciones que ejerce un fármaco sobre otro, de modo que éste experimente un cambio cuantitativo o cualitativo en su actividad, originando distintos tipos de efectos: sinergismo, adición, antagonismo e indiferencia (Flórez, 2008; Bassolé y Juliani, 2012).

El efecto sinérgico se presenta cuando la acción antibacteriana de 2 o más antibióticos es mayor que la que se obtiene con cada una de las drogas utilizadas individualmente (Neu, 1992). La adición significa que el efecto de una combinación es igual al que se produce con cada uno de las drogas utilizadas individualmente (Cohen, 1992). El antagonismo se produce cuando el efecto de una droga contrarresta el de la otra (Wyatt *et al.*, 1990). Mientras que la indiferencia es el resultado de la falta de interacción de los antimicrobianos (Bassolé y Juliani, 2012).

## ANTECEDENTES

Liu y colaboradores (2007), trabajaron con el aceite esencial de *Santolina corsica*, encontraron que el mirceno es uno de los componentes mayoritarios (34.6%) y que presenta también trazas de  $\beta$ -ocimeno (<0.05%). Evaluaron la actividad antibacteriana del aceite en dos cepas Gram positivas y cuatro Gram negativas, mencionan que este presentó actividad moderada en *Listeria innocua* (9.5 mm), fue activo en *Staphylococcus aureus* (14.7 mm) y *Campylobacter jejuni* (39 mm). También fraccionaron el aceite por medio de cromatografía en columna y encontraron que la fracción hidrocarbonada contenía un 57.2% de mirceno, está presentó actividad en *S. aureus* (8.5 mm) y *C. jejuni* (27.5 mm).

Existen también trabajos en los que se evalúa la actividad de compuestos puros como es el de Bueno-Sánchez y colaboradores (2009), quienes evaluaron la actividad de varios terpenos, entre ellos el mirceno en *Mycobacterium tuberculosis* y *M. chelonae* obteniendo CMI de 0.25 mg/mL y >0.5 mg/mL respectivamente.

Candelaria-Dueñas (2016) evaluó la actividad antimicrobiana de los compuestos más abundantes de los aceites esenciales de algunas plantas medicinales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán incluyendo el mirceno y el ocimeno. Reportó que ambos compuestos fueron activos en cepas de *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* (ambos compuestos con CMI=4.0 mg/mL en las tres cepas), el ocimeno mostró actividad en cepas de *S. aureus* (CMI=1.5 mg/mL), *E. aerogenes* y *Proteus mirabilis* (en ambas CMI=4.0 mg/mL) y el mirceno presentó actividad en *E. coli* ATCC 53228 (CMI=2.0 mg/mL) y en cepas de levaduras este autor reporta una CMI entre 1.0 y 4.0 mg/mL.

Algunos trabajos en los que no solo se evalúa la actividad de los compuestos puros por separado, sino las combinaciones de ellos son el Gallucci y colaboradores (2009), quienes evaluaron la actividad de varios terpenos por separado en *E. coli*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*. El mirceno no mostró actividad contra ninguna de las bacterias (rango de concentraciones 1.54–790 mg/mL), este compuesto fue utilizado en combinación con el carvacrol, pero la interacción resultó antagónica mientras que al combinarlo con citronelol presentó indiferencia.

Por último, está el estudio de Saut-Reyes en el (2016), quien evaluó la actividad antimicrobiana de  $\alpha$  y (-)  $\beta$  pineno y por separado y en combinación (proporción 1:1). Menciona que tanto en las cepas bacterianas como en las levaduras el (-)  $\beta$  pineno es más



activo que el  $\alpha$  pineno. Las especies sensibles en su mayoría son del género *Staphylococcus*. Determinó que la cepa Gram positiva más sensible fue *S. epidermidis* ATCC12228 con una CMI de 1.5 mg/mL para ambos compuestos, sin embargo con la combinación  $\alpha$ : $\beta$  fue de 4.0 mg/mL. Para cepas de *S. aureus* registró concentraciones de entre 1.5 y 4.0 mg/mL. En cuanto a las cepas Gram negativas que utilizó explica que *V. cholerae* ATCC 39540 es la cepa más sensible para los compuestos por separado y en combinación. Reporta también que el efecto de los compuestos separados es mayor en cepas de levaduras que en cepas bacterianas, ya que la mayoría de los valores de CMI determinadas se encuentran en un rango de 0.5 a 2.0 mg/mL. Con la CIF determinó el tipo de interacción que ejercen los compuestos al combinarlos en proporción 1:1 ( $\alpha$ : $\beta$ ) y menciona que en las bacterias Gram negativas se dio un mayor número de sinergismos que en las Gram positivas, sin embargo de las interacciones que encontró en su mayoría son efectos antagónicos y de indiferencia.

## **JUSTIFICACIÓN**

El aumento en la resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos se ha vuelto un problema de gran importancia en las últimas décadas. Esto está conduciendo a la búsqueda de nuevas alternativas que permitan implementar tratamientos que sean eficaces contra cepas microbianas de interés clínico. Una de ellas es utilizar combinaciones de compuestos que son poco efectivos, esperando que cuando interactúan se potencialice su efecto. Además de que en la literatura son escasos los trabajos en los que se evalúa la actividad antimicrobiana de las combinaciones de compuestos puros.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué tipo de interacción habrá entre los monoterpenos mirceno y ocimeno?

## **HIPÓTESIS**

Se ha demostrado que existe una relación entre la estructura química de los compuestos y la actividad que presentan y que las combinaciones de mezclas artificiales de los componentes purificados de los aceites esenciales afectan a múltiples procesos bioquímicos de microorganismos, por lo tanto, se espera que la combinación de mirceno y ocimeno, produzca un efecto sinérgico sobre cepas de importancia clínica.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana y las interacciones farmacodinámicas del mirceno y el ocimeno.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Determinar cualitativamente la actividad antimicrobiana del mirceno y ocimeno por separado y en combinación sobre cepas de importancia clínica.
- ◆ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM), la Concentración Fungicida Mínima (CFM) y la Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) del mirceno y ocimeno por separado y en combinación.
- ◆ Determinar el efecto del mirceno y ocimeno por separado y en combinación en una curva de crecimiento de una bacteria Gram positiva, una Gram negativa y una levadura, las cuales resulten más sensibles.
- ◆ Determinar qué tipo de interacción farmacodinámica presenta el mirceno y el ocimeno en combinación.

## MATERIALES Y MÉTODO

### 1. Obtención de las cepas y compuestos

Los compuestos mirceno (7-Metil-3-metileno-1,6-octadieno) de grado técnico con número de catálogo M100005 y ocimeno (mezcla de isómeros 3,7-Dimetil-1,3,7-octatrieno y 3,7-Dimetil-1,3,6-octatrieno) con número de catálogo W35391 que se utilizaron son de la marca de Sigma- Aldrich (Sigma, Nueva Jersey, USA) (Anexo I) y los microorganismos forman parte del cepario del laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

**Cepas Gram positivas:** *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* 23MR, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* cc, *S. aureus* CUSI, *S. aureus* FES-C (donada por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán), *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. epidermidis* FES-C.

**Cepas Gram negativas:** *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *E. gergoviae* ATCC 33028, *Escherichia coli* 82MR, *E. coli* CUSI, *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi ATCC 7251, *S. tify*, *Serratia marcescens* ATCC 1475 y *Vibrio cholerae* ATCC 39540.

**Cepas de levaduras:** *Candida albicans* 17MR, *C. glabrata* cc, y *C. tropicalis* cc (cc donadas por la Clínica Universitaria de Salud Integral Iztacala).

**Cepas de hongos Filamentosos:** *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* y *F. sporitrichum*

### Bioensayos

#### 2. Actividad antimicrobiana

##### 2.1 Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana y antifúngica en cepas de levaduras

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana y de la actividad antifúngica en cepas de levaduras se realizó mediante el método de difusión en agar o Kirby-Baüer (Van der Berghe y Vlietinck, 1991) utilizando agar MH (Müller-Hinton) y agar papa y dextrosa (PDA) respectivamente. Para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los

monoterpenos por separado los sensidiscos fueron colocados en cajas Petri e impregnados con 4  $\mu$ L (3.2 mg/mL) del compuesto puro, como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25  $\mu$ g de cloranfenicol para las cepas bacterianas y 30  $\mu$ g de nistatina para las cepas y como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 3  $\mu$ L de aceite de oliva estéril. Para la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los monoterpenos en combinación los sensidiscos fueron impregnados con 4  $\mu$ L de las mezclas de compuestos 1:1, 2:8 y 8:2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Anexo II).

## **2.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana y antifúngica en cepas de levaduras**

Para las cepas bacterianas y de levaduras que resultaron sensibles a la prueba de Kirby-Baüer se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) mediante el método modificado de macrodilución en caldo (Winn *et al.*, 2006). De los compuestos por separado y de las combinaciones (1:1, 2:8 y 8:2) se utilizaron las concentraciones 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL (Anexo III).

## **2.3 Evaluación de la actividad antifúngica en hongos filamentosos**

La evaluación cualitativa y cuantitativa de la actividad antifúngica en hongos filamentosos se realizó por medio de la técnica de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Para la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los monoterpenos por separado, los sensidiscos fueron colocados en las cajas Petri e impregnados con 4  $\mu$ L (3.2 mg/mL) de compuesto puro. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 56  $\mu$ g de ketoconazol y como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 3  $\mu$ L de aceite de oliva estéril. La evaluación se realizó por triplicado. Para la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los monoterpenos en combinación los sensidiscos fueron impregnados con 4  $\mu$ L de las mezclas de compuestos 1:1, 2:8, y 8:2. Los ensayos se realizarán por triplicado (Anexo V).

## **2.4 Efecto sobre una curva de sobrevivencia**

La evaluación de la sobrevivencia bacteriana y fúngica se realizó en las cepas bacterianas (Gram positiva y negativa) y la cepa de levadura que presentó mayor sensibilidad, se monitoreó su crecimiento a lo largo de 24 horas durante 9 tiempos, al ser expuestas a

diferentes concentraciones de los compuestos (1/2 CMI, CMI, CBM y CFM) y un testigo (sin compuesto) (Kubo *et al.*, 1993; citado en Avila, 1996) (Anexo IV).

### 3. Determinación de la interacción farmacológica

Después de obtener todas las CMI de los compuestos por separado y de las tres combinaciones se calculó la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF), esto para calcular el índice de la CFI y determinar del tipo de interacción del mirceno en combinación con el ocimeno.

Se utilizando la siguiente ecuación:

$$CFI = \left( \frac{[m] \text{ en combinación}}{CMI_{m \text{ solo}}} \right) + \left( \frac{[o] \text{ en combinación}}{CMI_{o \text{ solo}}} \right)$$

Dónde:

[m] en combinación: es la concentración de mirceno en combinación con ocimeno.

CMI<sub>m solo</sub>: es la concentración mínima inhibitoria del mirceno.

[o] en combinación: es la concentración de ocimeno en combinación con mirceno.

CMI<sub>o solo</sub>: es la concentración mínima inhibitoria del ocimeno.

Los valores serán interpretados según la escala de Bassolé y colaboradores en el 2010 y 2011 (Anexo VI)

Tabla 1. Índice de la concentración para determinar el tipo de interacción farmacológica.

Rango (Valor índice CFI)	Tipo de interacción
<0.5	Sinergismo (SI)
0.5 ≤ índice CIF ≤ 1	Adición (AD)
1 < índice CIF ≤ 4	Indiferencia (IN)
índice CIF > 4	Antagonismo (AN)

### 4. Análisis estadísticos

Se realizó un ANOVA simple para saber si existen diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas Gram positivas y Gram negativas a los compuestos y a las combinaciones evaluadas.

## RESULTADOS

### Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los compuestos por separado y en combinación

#### Cepas bacterianas

En los resultados que se muestran continuación, primero se presentarán los valores obtenidos en los halos de inhibición de mirceno (M) y posteriormente los del ocimeno (O).

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación en la actividad antibacteriana cualitativa de los compuestos por separado en cepas Gram positivas y negativas. Ambos compuestos fueron activos en *E. faecalis* ATCC 14506, estos presentaron halos de inhibición de M=8.3±1.5 mm y O=8.0±1.0 mm, *S. aureus* ATCC 29213 M=7.7±1.2 y O=5.7±4.9 mm, *S. epidermidis* ATCC 12228 M=6.0±0.0 y O=6.0±0.0 mm y en *S. epidermidis* FES-C M=8.3±0.6 y O=5.3±4.7 mm.

El ocimeno fue activo en *M. luteus* ATCC 10240 y *S. aureus* cc, en ambas cepas se presentaron los halos de inhibición de mayor tamaño con 11.0±1.0 y 9.0±1.0 mm respectivamente. Por otro lado, el mirceno fue activo en *S. aureus* CUSI (6.0±0.0 mm) y en *S. aureus* FES-C (6.0±0.0 mm).

De igual manera en los resultados de las cepas Gram negativas primero se presentarán los valores de los halos de inhibición del mirceno (M=) y después los valores con el ocimeno (O=).

Ambos compuestos resultaron ser activos contra *E. coli* CUSI (M=8.0±1.0 mm y O=11.0±1.7 mm), *S. thypi* (M=6.0±0 mm y O=6.0±0 mm), *S. marcescens* ATCC 14756 (M=8.7±0.6 mm y O=6.0±0.0 mm) y *V. cholerae* ATCC 39440 (M=7.7±0.6 mm y O=7.3±0.6 mm).

El mirceno fue activo en *K. oxytoca* ATCC 8724 (7.0±0.0 mm), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (7.0±0.0 mm) y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (8.0±1.0 mm).

Cuadro 1. Actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas con mirceno y ocimeno.

Cepas Gram positivas	Mirceno	Ocimeno	Cloranfenicol
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	8.3±1.5	8.0±1.0	13.5±2.1
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	NA	11.0±1.0	30.0±0.0
<i>S. aureus</i> ATCC 23MR	NA	NA	13.5±4.9
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7.7±1.2	5.7±4.9	14.5±2.1
<i>S. aureus</i> cc	NA	9.0±1.0	13.0±1.4
<i>S. aureus</i> CUSI	6.0±0.0	NA	17.5±2.1
<i>S. aureus</i> FES-C	6.0±0.0	NA	20.0±1.4
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	6.0±0.0	6.0±0.0	19.0±0.0
<i>S. epidermidis</i> FES-C	8.3±0.6	5.3±4.7	15.0±2.8
Cepas Gram negativas	Mirceno	Ocimeno	Cloranfenicol
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	NA	NA	19.5±0.7
<i>E. gergoviae</i> ATTCC 33028	NA	NA	16.0±1.4
<i>E. coli</i> 82MR	NA	NA	18±1.4
<i>E. coli</i> CUSI	8.0±1.0	11.0±1.7	18.5±0.7
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	7.0±0.0	NA	24.5±0.7
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	7.0±0.0	NA	20.0±2.8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8.0±1.0	NA	0.0±0.0
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	NA	NA	15.5±0.7
<i>S. thypi</i>	6.0±0.0	6.0±0.0	20.5±2.1
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	8.7±0.6	6.0±0.0	14.5±0.7
<i>V. cholerae</i> ATCC 39440	7.7±0.6	7.3±0.6	21.5±0.7

NA=No Activo. \*Halos de inhibición en mm (promedio ± desviación estándar)

Los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y negativas con las combinaciones de mirceno:ocimeno se presentan en el cuadro 2.

Podemos observar que las tres combinaciones (1:1, 8:2 y 2:8) presentaron actividad en todas las cepas Gram positivas evaluadas, las cepas en las que se presentaron los halos de inhibición de mayor tamaño fueron *S. epidermidis* ATCC 12228 con la combinación 8:2 (8.0±0.0 mm) y en *S. epidermidis* FES-C con la combinación 2:8 (8.0±0.0 mm).



Con respecto a las bacterias Gram negativas las tres combinaciones presentaron actividad en las once cepas evaluadas. *K. oxytoca* ATCC 8724 ( $7.7\pm 0.6$  mm), *S. thypi* ( $7.7\pm 0.6$  mm) y *V. cholerae* ATCC 39440 ( $7.7\pm 0.6$  mm) registraron los halos de inhibición de mayor tamaño, estos con la combinación 1:1.

Cuadro 2. Actividad antibacteriana de la combinación de los compuestos Mirceno:Ocimeno en cepas Gram positivas y negativas.

Cepas Gram positivas	1:1	8:2	2:8
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	7.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	6.7±0.6	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>S. aureus</i> 23MR	6.3±0.6	6.0±0.0	7.0±0.0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	7.0±0.0	6.0±0.0	7.0±0.0
<i>S. aureus</i> cc	7.0±0.0	6.3±0.6	8.0±0.0
<i>S. aureus</i> CUSI	7.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>S. aureus</i> FES-C	6.3±0.6	7.0±0.0	6.0±0.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	6.0±0.0	↑8.0±0.0	7.0±0.0
<i>S. epidermidis</i> FES-C	6.0±0.0	6.0±0.0	↑8.0±0.0
Cepas Gram negativas	1:1	8:2	2:8
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>E. gergoviae</i> ATTCC 33028	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> 82MR	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>E. coli</i> CUSI	6.7±0.6	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	↑7.7±0.6	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	6.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>S. thypi</i>	↑7.7±0.6	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
<i>V. cholerae</i> ATCC 39440	↑7.7±0.6	7.0±0.0	7.0±0.0

ND=No Determinado. \*Halos de inhibición en mm (promedio ± desviación estándar). ↑Aumento en el tamaño del halo de inhibición.

Al realizar el ANOVA para comparar la actividad en cepas Gram positivas y negativas este no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos bacterianos con mirceno ( $F=0.001$ ,  $p\geq 0.05$ ), ocimeno ( $F=1.495$ ,  $p\geq 0.05$ ) y las combinaciones 1:1, 8:2 y

2:8 (F=0.703, p≥0.05; F=1.175, p≥0.05 y F=2.757, p≥0.05), en conclusión, el tamaño de los halos de inhibición no está relacionados con el tipo bacteriano.

### Cepas de levaduras

Los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica en cepas de levaduras con mirceno y ocimeno se presentan en el cuadro 3, podemos observar que ambos compuestos fueron activos en las tres cepas evaluadas. Los mayores halos de inhibición se presentaron en *C. tropicalis* cc. (10.3±0.6 mm) con ocimeno y en *Candida albicans* ATCC 17MR (10.0±1.0 mm) con mirceno.

Cuadro 3. Actividad antifúngica en cepas de levaduras con mirceno y ocimeno.

Cepa	Mirceno	Ocimeno	Nistatina
<i>C. albicans</i> ATCC 17MR	10.0±1.0	9.3±0.6	23.0±0.0
<i>C. glabrata</i> cc	9.3±0.6	8.0±1.0	21.0±1.4
<i>C. tropicalis</i> cc	8.7±0.6	10.3±0.6	23.0±2.8

\*Halos de inhibición en mm (promedio ± desviación estándar).

En el cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica en cepas de levaduras de las combinaciones de mirceno:ocimeno. Como se puede observar las tres combinaciones (1:1, 8:2 y 2:8) presentaron actividad de igual manera en las tres cepas evaluadas, los halos de inhibición de mayor tamaño se registraron en *C.albicans* 17MR con la combinación 2:8 (9.7±0.6 mm), en *C. glabrata* cc (8.7±0.6 mm) y *C. tropicalis* cc (8.3±0.6 mm) con la combinación 1:1.

Cuadro 4. Actividad antifúngica de la combinación de los compuestos Mirceno:Ocimeno en cepas de levaduras.

Cepa	1:1	8:2	2:8
<i>C. albicans</i> 17MR	7.7±0.6	7.0±1.0	9.7±0.6
<i>C. glabrata</i> cc	8.7±0.6	7.0±0.0	7.7±0.6
<i>C. tropicalis</i> cc	8.3±0.6	6.0±0.0	7.0±0.0

\*Halos de inhibición en mm (promedio ± desviación estándar).

## Cepas de hongos filamentosos

Ninguno de los compuestos ni de las combinaciones fueron activos en las cepas de hongos filamentosos que se evaluaron.

## Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de los compuestos por separado y en combinación

### Cepas bacterianas

El compuesto que presentó las CMI más bajas fue el ocimeno (cuadro 5) en *S. aureus* CUSI (CMI= 1.5 mg/mL). La CMI más baja con mirceno se registró en *S. epidermidis* ATCC 12228 (2.0 mg/mL). Para las otras cepas las CMI estuvieron por arriba de 2.0 mg/mL con ambos compuestos.

En cuanto a las combinaciones de mirceno:ocimeno, podemos observar que en varias cepas se presentaron CMI>4.0mg/mL, las CMI más bajas se presentaron en la combinación 2:8 en las cepas *S. aureus* CUSI y *S. epidermidis* ATCC 12228 con 1.0 mg/mL para ambas. Las CMI más baja de la combinación 1:1 se presentó en *M. luteus* ATCC 10240 (1.5 mg/mL), las concentraciones más bajas de la combinación 8:2 se presentaron en las cepas *E. faecalis* ATCC 14506 y *S. epidermidis* FES-C, ambas con CMI de 1.5 mg/mL.

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cepas bacterianas Gram positivas con los compuestos por separado y en combinación.

Cepas	Mirceno		Ocimeno		Combinaciones (Mirceno/Ocimeno)					
	CMI	CBM	CMI	CBM	1:1		8:2		2:8	
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	>4.0	>>4.0	2.0	3.0	3.0	4.0	1.5	2.0	>4.0	>>4.0
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	ND	4.0	ND	3.0	1.5	2.0	4.0	>4.0	4.0	>4.0
<i>S. aureus</i> 23MR	-	-	-	-	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>S. aureus</i> cc	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	4.0	>4.0	>4.0	>>4.0
<i>S. aureus</i> CUSI	3.0	4.0	1.5	2.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	1.0	1.5
<i>S. aureus</i> FES-C	ND	ND	2.0	3.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	4.0	>4.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2.0	3.0	2.0	3.0	4.0	>4.0	2.0	3.0	1.0	1.5
<i>S. epidermidis</i> FES-C	3.0	4.0	2.0	3.0	>4.0	>>4.0	1.5	2.0	2.0	3.0

ND= No Determinado. \* Concentraciones en mg/mL

La determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana en cepas Gram negativas se presenta en el cuadro 6. La cepa que presentó las CMI más bajas fue *V. cholerae* ATCC 39440 (mirceño CMI=3.0 mg/mL y ocimeno CMI=2.0 mg/mL), de igual manera en esta cepa se registraron las menores CMI con las combinaciones (combinación 8:2 CMI=0.75 mg/mL y combinación 2:8 CMI=0.25 mg/mL). Para las otras diez cepas se registraron CMI>4 mg/mL.

Cuadro 6. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cepas bacterianas Gram negativas con los compuestos por separado y en combinación.

Cepas	Mirceño		Ocimeno		Combinaciones (Mirceño/Ocimeno)					
	CMI	CBM	CMI	CBM	1:1		8:2		2:8	
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	-	-	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>E. gergoviae</i> ATTCC 33028	-	-	-	-	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>E. coli</i> 82MR	-	-	-	-	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>E. coli</i> CUSI	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	-	-	-	-	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>S. thypi</i>	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0	>4.0	>>4.0
<i>V. cholerae</i> ATCC 39440	3.0	4.0	2.0	3.0	>4.0	>>4.0	0.75	1.0	0.25	0.5

\* Concentraciones en mg/mL

Los resultados obtenidos en la determinación cuantitativa de la actividad antifúngica en cepas de levaduras con los compuestos por separado y en combinación se aprecian en el cuadro 7. En este se puede observar que las CMI más bajas se registraron en *C. tropicalis* cc (mirceño 0.25 mg/mL y ocimeno 0.5 mg/mL). *C. albicans* 17MR presentó una CMI de 1.0 mg/mL con ambos compuestos.

Con respecto a las combinaciones se muestra que las CMI más bajas son de 3 mg/mL para las tres cepas de levaduras con las diferentes concentraciones.

Cuadro 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) de cepas de levaduras con los compuestos por separado y en combinación.

Cepas	Mirceno		Ocimeno		Combinaciones (Mirceno/Ocimeno)					
	CMI	CBM	CMI	CBM	1:1		8:2		2:8	
<i>C. albicans</i> 17MR	1	1.5	1	1.5	3	4	3	4	3	4
<i>C. glabrata</i> cc	3	4	1.5	2	3	4	4	>4	>4	>>4
<i>C. tropicalis</i> cc	0.25	0.5	0.5	1	4	>4	3	4	3	4

\* Concentraciones en mg/mL

### Efecto sobre curvas de sobrevivencia frente a los compuestos por separado y en combinación

La evaluación de la sobrevivencia bacteriana y fúngica con los compuestos por separado se realizó en las cepas bacterianas (Gram positiva y Gram negativa) y la cepa de levaduras que presentaron mayor sensibilidad. Las cepas seleccionadas son: *S. epidermidis* ATCC 12228, *V. cholerae* ATCC 39440 y *C. tropicalis*. La evaluación de la sobrevivencia bacteriana y fúngica de los compuestos en combinación se realizó en estas mismas cepas, esto para observar si existe un cambio en el crecimiento microbiano, es importante mencionar que se seleccionó la combinación 2:8 ya que con esta se registraron las CMI más bajas que con los compuestos por separado.

### Curvas de sobrevivencia de *S. epidermidis* ATCC 12228

El efecto que ejercieron los compuestos mirceno y ocimeno por separado y en combinación 2:8 sobre el crecimiento de *S. epidermidis* ATCC 12228 se presenta en la figura 1. Se puede observar que el efecto que presentan ambos compuestos en la cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 es bacteriostático (figura 1 A y 1B), ya que únicamente inhiben el crecimiento bacteriano en el transcurso de cuatro horas y posteriormente la población bacteriana vuelve a incrementar.

El efecto que tiene la combinación 2:8 (mirceno:ocimeno) también es bacteriostático (Figura 1C), ya que al igual que con los compuestos por separado detiene el crecimiento poblacional por un periodo de cuatro horas. Sin embargo, la población bacteriana a las cuatro horas es mayor con la combinación (aproximadamente 4 log UFC/mL) que con los compuestos por separado (aproximadamente 3.6 log UFC/mL).

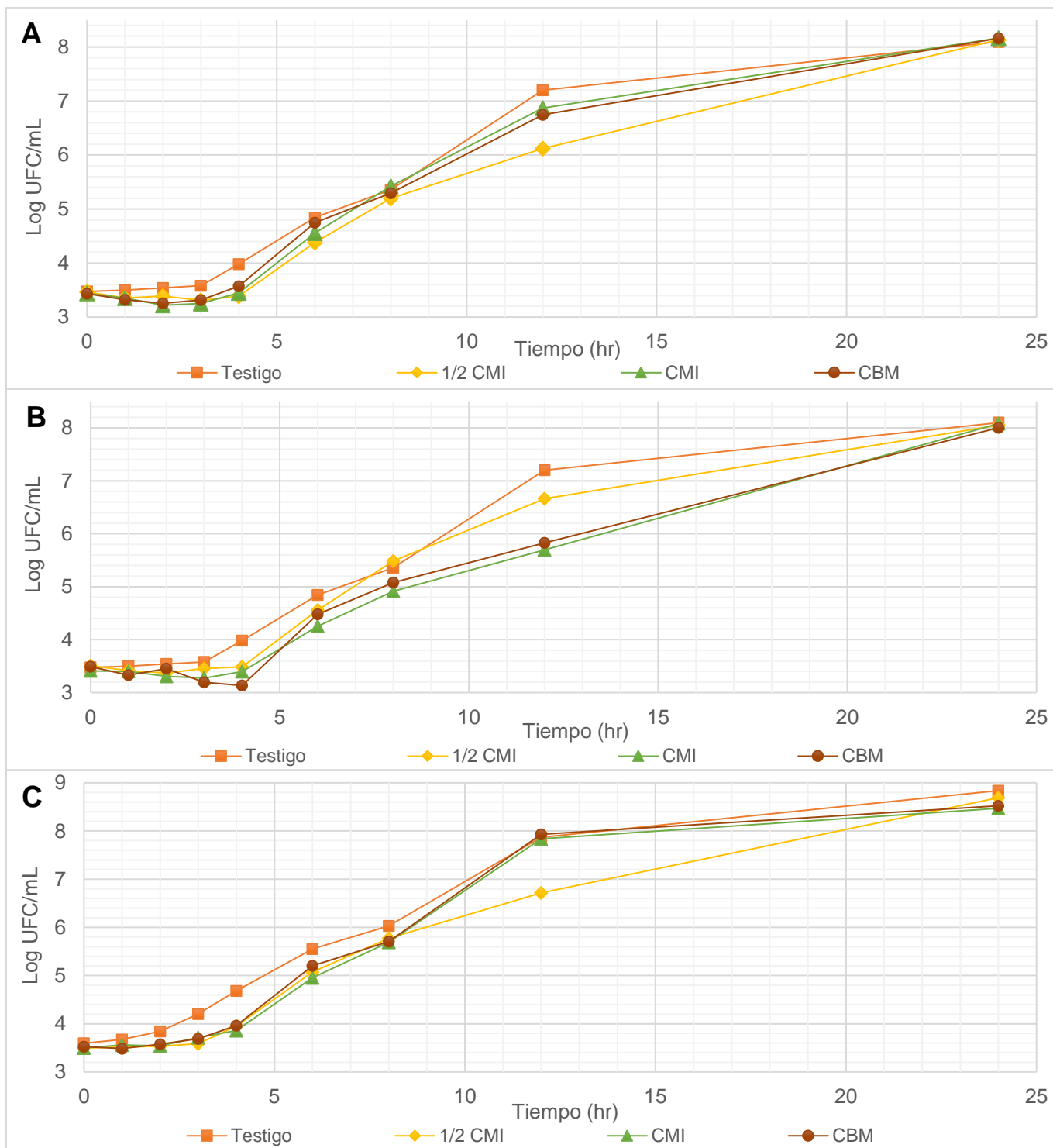


Figura 1. Curvas de crecimiento de *S. epidermidis* ATCC 12228 A: expuesta a mirceno. B: expuesta a ocimeno. C: expuesta a la combinación 2:8 mirceno:ocimeno \*A y B: 1/2CM=1.5, CMI=2.0 y CBM=3.0. \*C: 1/2CMI=0.5, CMI=1.0 y CBM=1.5 (concentraciones en mg/mL).

### **Curvas de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 39440**

En la figura 2 se observa el efecto que tuvieron los compuestos mirceno, ocimeno y la combinación 2:8 en el crecimiento bacteriano de la cepa *V. cholerae* ATCC 39440.

El mirceno y el ocimeno presentan un efecto bacteriostático en la cepa *V. cholerae* ATCC 12228, sin embargo, este efecto no es muy significativo, ya que como se observa en la figura 2A y 2B la población bacteriana expuesta a los compuestos por separado presenta un comportamiento similar al testigo.

Por el contrario, el efecto bacteriostático que ejerce la combinación 2:8 (mirceno:ocimeno) sobre la cepa *V. cholerae* ATCC 12228 (figura 2C) es mayor que con los compuestos por separado, ya que detiene el crecimiento bacteriano por un periodo de seis horas, mientras que los compuestos por separado solo lo hacen por dos horas.

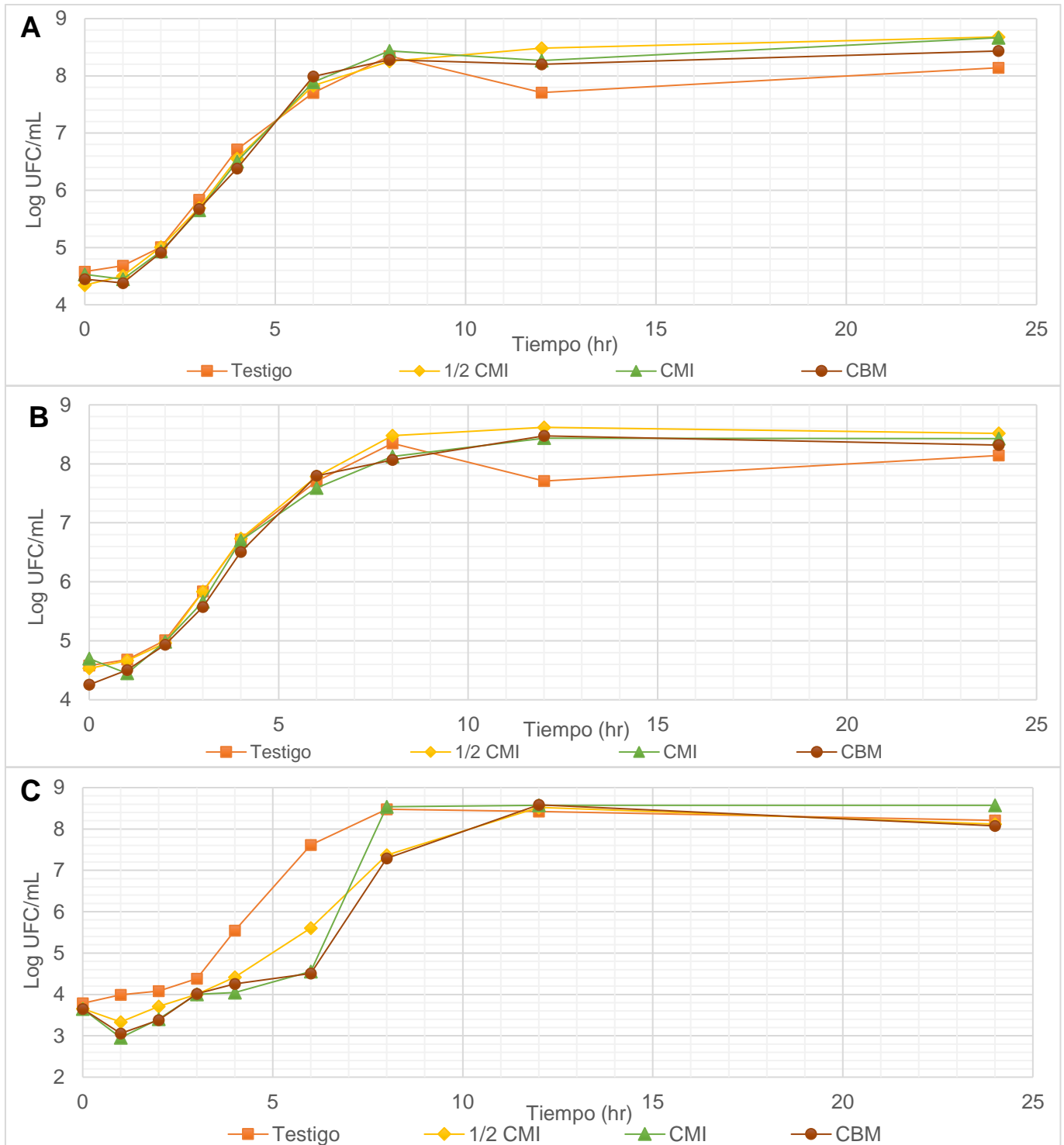


Figura 2. Curvas de crecimiento de *V. cholerae* ATCC 39440 A: expuesta a mirceno. B: expuesta a ocimeno. C. expuesta a la combinación 2:8 mirceno:ocimeno. \*A: 1/2CMI=2.0, CMI=3.0 y CBM=4.0. \*B: 1/2CMI=1.5, CMI=2.0 y CBM=3.0 \*C: 1/2CMI=0.125, CMI=0.5 y CBM=1.0 (concentraciones en mg/mL).



### **Curvas de sobrevivencia de *C. tropicalis* cc**

En la siguiente figura (3) se observan las curvas de crecimiento poblacional de la levadura *C. tropicalis* cc con mirceno, ocimeno y con la combinación 2:8.

El efecto que presentan los compuestos por separado y la combinación 2:8 en la cepa *C. tropicalis* cc es fungistático, ya que como se observa en la figura 3 detienen el crecimiento por un periodo de tiempo de aproximadamente cuatro horas y posteriormente el crecimiento poblacional vuelve a ser exponencial.

La población microbiana con los compuestos por separado crece de manera similar al testigo, por el contrario, con la combinación 2:8 la población se mantiene en aproximadamente 3 log UFC/mL durante ocho horas, mientras que el testigo tiene una población bacteriana de 4.8 log UFC/mL.

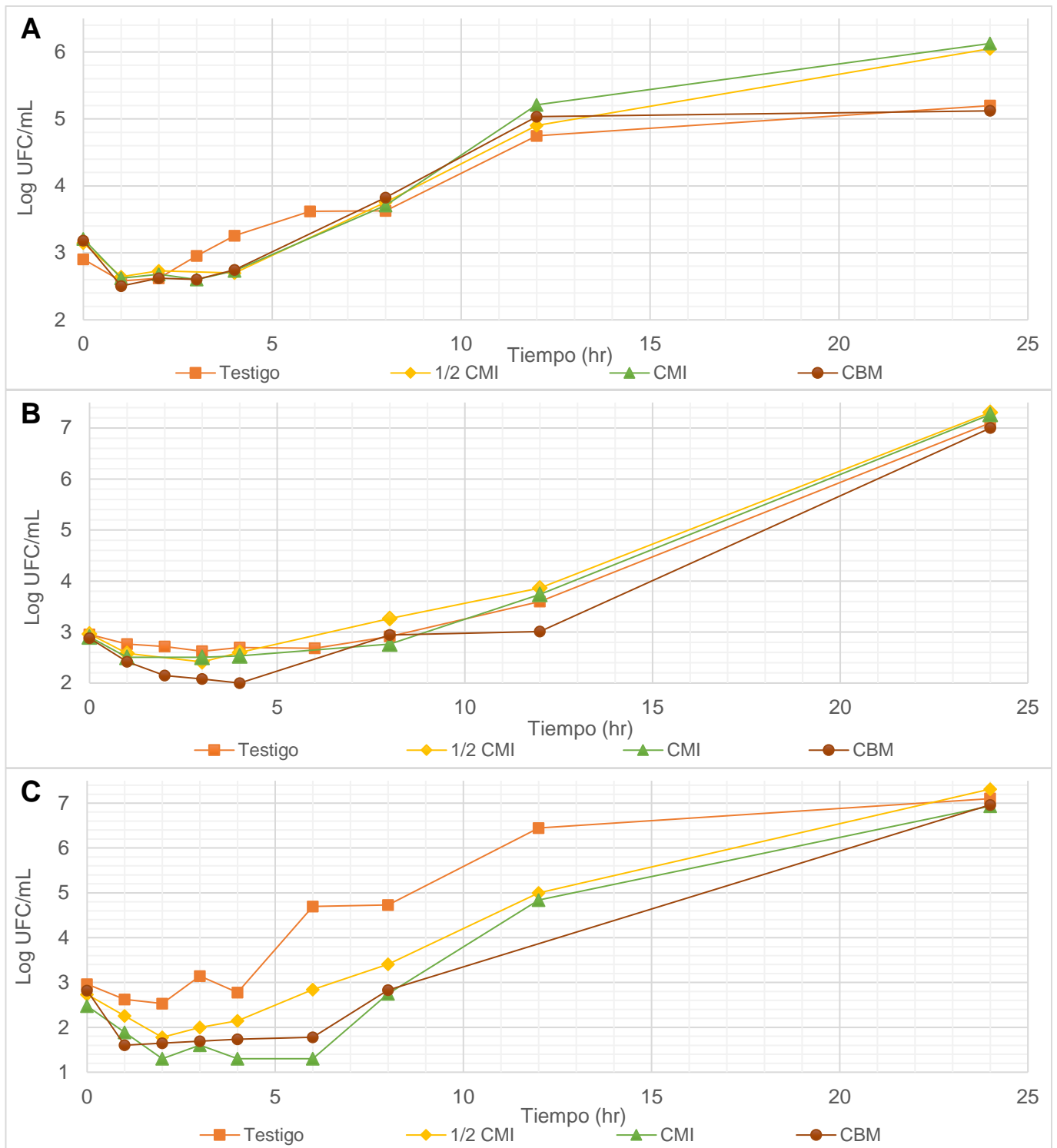


Figura 3. Curvas de crecimiento de *C. tropicalis* cc A: expuesta a mirceno. B: expuesta a ocimeno. C: expuesta a la combinación 2:8 mirceno:ocimeno. \*A: 1/2CMI=0.125, CMI=0.25 y CFM=0.5. \*B: 1/2CMI=0.25, CMI=0.5 y CFM=1.0 \*C: 1/2CMI=1.5, CMI=3.0 y CBM=4.0 (concentraciones en mg/mL).

## Determinación del índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF)

En el cuadro 8 se observan los resultados obtenidos del cálculo del índice de la CIF en cepas Gram positivas además de los tipos de efectos determinados.

En general el 77.78% de las cepas presentaron indiferencia y ninguna de las cepas presentó antagonismo. Solo la cepa *S. aureus* 23MR presentó sinergismo en las tres combinaciones, es importante mencionar que se determinó este tipo de interacción ya que anteriormente no había presentado actividad, sin embargo, no se determinaron CMI bajas. La cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 presentó sinergismo en la combinación 2:8 (índice CIF=0.5).

Con la combinación 1:1 las cepas que presentaron adición fueron *M. luteus* ATCC 10240 (CIF=0.6), en la combinación 2:8 la cepa *S. aureus* CUSI (CIF=0.6) y la cepa *S. epidermidis* FES-C (CIF=0.9), esta última también presentó adición con la combinación 8:2 (CIF=0.5).

Cuadro 8. Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) en cepas Gram positivas con las diferentes combinaciones de los compuestos mirceno:ocimeno.

Cepa	CIF 1:1	CIF 8:2	CIF 2:8
<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	1.1 (IN)	0.4 (SI)	1.8 (IN)
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	0.6 (AD)	1.4 (IN)	1.8 (IN)
<i>S. aureus</i> 23MR	SI*	SI*	SI*
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>S. aureus</i> cc	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>S. aureus</i> CUSI	2.0 (IN)	1.6 (IN)	0.6 (AD)
<i>S. aureus</i> FES-C	2.0 (IN)	2.0 (IN)	2.0 (IN)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	2.0 (IN)	1.0 (IN)	0.5 (SI)
<i>S. epidermidis</i> FES-C	1.6 (IN)	0.5 (AD)	0.9 (AD)

\*SI: Sinergismo, AD: Adición, IN: Indiferencia. \*Se consideró sinergismo por presencia de actividad.

Los resultados obtenidos con el cálculo del índice de la CIF en las cepas Gram negativas se aprecian en el cuadro 9. Se presentó sinergismo en las cepas *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. gergoviae* ATTCC 33028, *E. coli* 82MR y *S. enterica* ATCC 7251, cabe mencionar que de igual manera que con las cepas Gram positivas se determinó así ya que los compuestos solos no presentaron actividad.

El porcentaje de indiferencia fue de 63.64% en la combinación 1:1, y en las combinaciones 8:2 y 2:8 el porcentaje en ambas fue de 54.55%. En ninguna de las cepas se presentó adición ni antagonismo.

La cepa que presentó los índices CIF más bajos fue *V. cholerae* ATCC 39440 en la combinación 8:2 (CIF=0.2) y en la combinación 2:8 (CIF=0.09), es por esto que en ambas combinaciones se determinó sinergismo.

Cuadro 9. Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) en cepas Gram negativas con las diferentes combinaciones de los compuestos mirceno:ocimeno

Cepa	CIF 1:1	CIF 8:2	CIF 2:8
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	*SI	SI*	*SI
<i>E. gergoviae</i> ATTCC 33028	*SI	SI*	*SI
<i>E. coli</i> 82MR	*SI	SI*	*SI
<i>E. coli</i> CUSI	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>S. enterica</i> ATCC 7251	*SI	SI*	*SI
<i>S. thypi</i>	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>S. marcescens</i> ATCC 14756	1.0 (IN)	1.0 (IN)	1.0 (IN)
<i>V. cholerae</i> ATCC 39440	1.6 (IN)	0.2 (SI)	0.09 (SI)

\*SI: Sinergismo, IN: Indiferencia. \*Se consideró sinergismo por presencia de actividad.

En los resultados que se encuentran a continuación (cuadro 10) se presentan los resultados obtenidos del CIF en las cepas de levaduras.

Se observa que *C. tropicalis* cc fue la única que presentó antagonismo con las tres combinaciones evaluadas. Las otras dos especies (*C. albicans* 17MR y *C. glabrata* cc) presentaron indiferencia con las tres combinaciones (CIF>4).

Cuadro 10. Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) en cepas de levaduras con las diferentes combinaciones de los compuestos mirceno:ocimeno.

Cepa	CIF 1:1	CIF 8:2	CIF 2:8
<i>C. albicans</i> 17MR	3.0 (IN)	3.0 (IN)	3.0 (IN)
<i>C. glabrata</i> cc	1.5 (IN)	1.6 (IN)	2.4 (IN)
<i>C. tropicalis</i> cc	9.0 (AN)	10.2 (AN)	4.8 (AN)

\*IN: Indiferencia, AN: Antagonismo.

## DISCUSIÓN

### Actividad antibacteriana cualitativa

Los compuestos por separado mostraron ser efectivos en quince de las veinte cepas bacterianas que se evaluaron. Las tres combinaciones de mirceno:ocimeno (1:1, 2:8 y 8:2) presentaron actividad en 19 de las 20 cepas, con excepción de *E. gergoviae* ATCC 33028. Como típicos compuestos lipofílicos, los aceites esenciales y los compuestos que los constituyen pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática. La modificación de la permeabilidad de las membranas y el daño a la pared celular conduce a la fuga de moléculas, esto puede llevar al proceso de lisis (Sikkema *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Bakkali *et al.*, 2008).

El tamaño de los halos de inhibición con las combinaciones es menor que con los compuestos por separado, sin embargo esto no significa que los microorganismos sean más sensibles a la actividad que ejercen los compuestos por separado, ya que la Técnica de difusión en agar o Kirby-Baüer es solo una prueba cualitativa y el diámetro de la zona de inhibición dependerá de la capacidad de la(s) sustancia(s) para difundirse uniformemente a través de la placa de agar. La mayoría de los aceites esenciales y sus componentes son altamente volátiles y presentan poca solubilidad en una fase acuosa (Hulin *et al.*, 1998; Friedman *et al.*, 2002) es por ello que esta técnica no es concluyente para determinar la diferencia en las actividades de los compuestos por separado y en combinación.

### Actividad antifúngica cualitativa

En cuanto a la actividad antifúngica en cepas de levaduras, las tres especies de *Candida* que se evaluaron son sensibles a ambos compuestos, y las tres combinaciones (1:1, 8:2 y 2:8). Algunos autores mencionan que los terpenos de los aceites esenciales pueden inhibir sistemas enzimáticos en las levaduras, incluidos los que intervienen en la producción y síntesis de componentes estructurales de la pared celular, alterando la permeabilidad de la membrana al penetrar entre las cadenas de ácidos grasos que forman la bicapa lipídica, lo que altera los lípidos y cambios de fluidez en la membrana (Conner y Beuchart, 1984; Suppakul *et al.*, 2003; Dalleau *et al.*, 2008). Los compuestos terpénicos también pueden provocar despolarización progresiva de la membrana mitocondrial por la reducción en el potencial de membrana, afectan los canales iónicos reduciendo el gradiente de pH, lo cual

altera la formación de ATP (Richter y Schlegel, 1993; Novgorodov y Gudz, 1996 y Vercesi *et al.*, 1997).

En el caso de hongos filamentos ninguno de los dos compuestos tuvo efecto, esto puede ser porque estos se encuentran entre los microorganismos más resistente; contrario a esto, autores mencionan que algunos aceites esenciales han demostrado ser altamente efectivos en hongos, ya que provocan daño irreversible de la pared celular, la membrana citoplasmática, organelos celulares y una reducción considerable del contenido de ergosterol. Mencionan que esta actividad está relacionada principalmente a la composición química de dichos aceites, estos son ricos en monoterpenos fenólicos como timol, carvacrol y eugenol (Skočibušid y Bezid, 2004; Sacchetti *et al.*, 2005; Barrera-Necha y García-Barrera, 2008; Kulijanabhagavad *et al.*, 2010), que son químicamente muy diferentes a los monoterpenos hidrocarbonados que se utilizaron en el presente trabajo.

Otro aspecto es el desarrollo de mecanismos de resistencia que presentan algunas especies, esto debido a que la mayoría de los fármacos son fungistáticos y la administración prolongada o tratamientos repetidos por micosis recidivantes causa fallas en la terapéutica antimicótica a diversos compuestos como ketoconazol, fluconazol e incluso anfotericina B y permite la aparición de cepas multirresistentes (Kalemba y Kunicka 2003; Mesa-Arango y Bueno-Sánchez, 2004; Manzano-Gayosso *et al.*, 2008).

### **Actividad antimicrobiana cuantitativa en cepas bacterianas**

Una vez realizada la actividad cuantitativa se determinó que el compuesto con la CMI más baja fue el ocimeno en la cepa de *S. aureus* CUSI (1.5 mg/mL). La CMI más baja con mirceno fue en *S. epidermidis* ATCC 12228 (2.0 mg/mL). En cuanto a las combinaciones las CMI más bajas se presentaron en la combinación 2:8 en las cepas *S. aureus* CUSI y *S. epidermidis* ATCC 12228 con 1.0 mg/mL para ambas. Estos resultados se pueden apoyar con lo reportado por Pepeljnjak y colaboradores en el 2005, ellos encontraron que el aceite esencial de *Juniperus communis* (enebro común) también mostró actividad inhibitoria en las bacterias Gram positivas como *S. aureus*. Estos autores atribuyen esta actividad a la presencia de algunos terpenos como  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno y limoneno, los que resultaron ser componentes mayoritarios de dicho aceite esencial. Por el contrario Bueno-Sánchez y colaboradores en el 2009 reportaron que algunos monoterpenos, entre ellos el mirceno presentaron actividad reportando una CMI de 0.25 mg/mL en *Mycobacterium tuberculosis* (Gram positiva) que es menor a las obtenidas en el presente trabajo.

Apoyando a nuestros resultados, algunos autores mencionan que la actividad antibacteriana de los compuestos hidrocarbonados como lo son el mirceno y el ocimeno se debe principalmente a la perturbación de la bicapa lipídica, estos pueden producir cambios en la fluidez de la membrana plasmática, modificar la estructura de la pared celular, lo que conduce a una alteración de la permeabilidad, alteran las interacciones de lípidoproteínas afectando el intercambio de iones, además penetran en el interior de la célula donde pueden provocar despolarización progresiva de la membrana mitocondrial, afectan los canales iónicos reduciendo el gradiente de pH y afectando la bomba de protones para formar ATP (Juven *et al.*, 1994; Sikkema, 1994; Gustafson *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 2002; Trombetta *et al.*, 2005; Bueno-Sánchez *et al.*, 2009).

La cepa que presentó las CMI más bajas con ambos compuestos y las combinaciones fue la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228. Esto es importante ya que actualmente, se manifiesta la proliferación de bacterias de este género que son multiresistentes a la acción de numerosos agentes antimicrobianos (Rodríguez, 2010). Candelaria-Dueñas (2016), como se mencionó anteriormente evaluó diversos compuestos, sin embargo reportó que el mirceno y el ocimeno no fueron activos en la cepa de *S. epidermidis* que utilizó en su investigación.

Los estafilococos son los microorganismos más comunes de los humanos y animales, ocasionalmente causan infecciones muy severas y diversas relacionadas con el sistema nervioso central, el tracto genitourinario, la piel, los tejidos blandos, las vías respiratorias, así como con afecciones tales como otitis, osteomielitis y artritis. Se reconocen dos especies importantes en relación con los humanos, *S. epidermidis* es miembro de la flora normal de la piel, las vías respiratorias y gastrointestinales del hombre y *S. aureus* que normalmente se asocia a forúnculos, neumonía y meningitis (Martínez y Pérez, 2001; Madigan *et al.*, 2003; Rodríguez, 2010).

*S. epidermidis* es una bacteria que se aísla con más frecuencia en muestras clínicas, aunque rara vez produce supuración, pero pueden infectar prótesis ortopédicas o cardiovasculares, así mismo causa enfermedades en personas inmunodeprimidas y las infecciones son difíciles de curar porque ocurren en dispositivos protésicos donde pueden formarse biofilms. Esta bacteria ha sido aislada de un 74 a 92% en bacteriemias intrahospitalarias, es un agente primario en las peritonitis durante la diálisis peritoneal ambulatoria y un agente común de infecciones urinarias tales como: cistitis, uretritis y pielonefritis y a menudo es más resistente a los fármacos antimicrobianos que *S. aureus*,



aproximadamente el 75% de las cepas de *S. epidermidis* son resistentes a la nafcilina (Martínez y Pérez, 2001; Chaves *et al.*, 2008; Brooks *et al.*, 2013).

En cuanto a las bacterias Gram negativas, seis de las siete cepas evaluadas con los compuestos por separados y diez de las once cepas evaluadas con los compuestos en combinación presentaron CMI > 4.0 mg/mL, esto contrasta con lo reportado por Pepeljnjak y colaboradores en el 2005. Estos autores encontraron que en el aceite esencial de *Juniperus communis* (enebro común) los compuestos mayoritarios fueron  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno y limoneno, dicho aceite esencial no mostró actividad inhibitoria en *Citrobacter freundii* ni en *E. coli*, ambas bacterias Gram negativas.

Gallucci y colaboradores en el 2009 evaluaron la actividad antimicrobiana de algunos terpenos en cepas de importancia alimenticia, entre ellas *E. coli* y reportan que el mirceno no posee actividad, lo cual concuerda con el presente trabajo ya que tampoco se pudo determinar CMI para las dos cepas de *E. coli* que se evaluaron. Candelaria-Dueñas (2016) evaluó diversos compuestos terpénicos, entre ellos el mirceno y el ocimeno en diversas cepas, al contrario de este trabajo, este autor registro CMI en cepas de *E. aerogenes* FES-C (O=4 mg/mL) y *E. coli* ATCC 53228 (M=2 mg/mL).

Las cepas Gram positivas fueron más susceptibles a los efectos de los constituyentes de los aceites esenciales, esto se debe a la naturaleza física de sus paredes y membranas celulares. La pared celular de las bacterias Gram positivas está constituida principalmente por una capa gruesa de peptidoglicano y usualmente no es una barrera que impida la penetración de los antibióticos. Por el contrario, las bacterias Gram negativas presentan además una doble membrana la cual representa una barrera difícil de penetrar y que varía según las diferentes especies (Patiño, 2003; Pérez y Mota, 2006; Lujan-Hidalgo *et al.*, 2012).

Autores como Medina (2011) mencionan que tanto el mirceno como el ocimeno son terpenos hidrocarburoados los cuales presentan principalmente actividades biológicas tales como estimulante, descongestionante, antivírico y antitumoral. Los terpenos con mayor actividad antimicrobiana son el eugenol, timol y carvacrol, los cuales son de naturaleza fenólica y químicamente diferentes a los utilizados en el presente trabajo. Algunos autores mencionan que la presencia de alcoholes u oxígenos en la estructura química de los terpenos fenólicos está asociada con una alta actividad antimicrobiana (Davidson, 2005; Koroch *et al.*, 2007).

La única cepa Gram negativa que presentó CMI <4 tanto en los compuestos por separado como con las combinaciones fue *V. cholerae* ATCC 39440, se ha comprobado que el aceite esencial de *Origanum vulgare* tiene actividad antibacteriana contra otras bacterias Gram negativas incluyendo a *V. cholerae* y que entre sus componentes principales se encuentra el mirceno (Albado *et al.*, 2001; Arcila *et al.*, 2004). La eficacia de los componentes de aceites esenciales es diferente en bacterias Gram negativas, sin embargo, al igual que en las Gram positivas, los aceites esenciales y sus componentes, como resultado de su carácter lipofílico, pueden interactuar en la membrana externa provocando daño a la estructura y disminuyendo la viabilidad celular dependiendo de sus concentraciones relativas y de la susceptibilidad de los microorganismos (Helander *et al.*, 1998; Sikkema *et al.*, 1995 y Cox *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001).

La importancia de que los compuestos presenten actividad en *V. cholerae* radica en que este es un patógeno para humanos, constituye la causa específica de cólera, produce diarrea acuosa y en los casos graves, la muerte. Los líquidos intestinales se expulsan en evacuaciones voluminosas; a la larga esto conduce a la deshidratación y al desequilibrio de electrólitos, estos efectos provienen de la acción de la toxina del cólera (Valdés-Dapena, 2001; Madigan *et al.*, 2003; Ryan y Ray, 2011).

*V. cholerae* se transmite casi exclusivamente por vía hídrica, sin embargo, también se asocia con el consumo de alimentos. En América, el cólera se ha relacionado con el consumo de moluscos bivalvos y vegetales crudos (Madigan *et al.*, 2003).

La terapia del cólera es a base de ingestión de líquido oral e intravenoso para corregir la deshidratación grave y la hiponatremia. Muchos antimicrobianos son eficaces contra *V. cholerae* como la estreptomicina, tetraciclinas como la doxiciclina, eritromicina y ciprofloxacino, estos pueden reducir el curso de la enfermedad, tienden a disminuir la emisión de heces y abrevian el periodo de excreción de vibrios (Valdés-Dapena, 2001; Madigan *et al.*, 2003; Winn *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2013). Actualmente la resistencia de la familia *Vibrio* a los antimicrobianos de uso frecuente está creciendo y se ha convertido en un problema mundial. El aumento de la tasa de resistencia a los antibióticos de *Vibrio* es de suma importancia ya que esta se puede transmitir a otras bacterias de importancia clínica (Oladokun y Okoh, 2016).

La presencia de actividad significativa en la cepa de *V. cholerae* puede hablarnos de una posible toxicidad selectiva de los compuestos hacia este patógeno. El concepto de toxicidad

selectiva alude a las diferentes respuestas de las distintas estructuras celulares a los agentes químicos. Refleja una capacidad del tóxico para actuar sobre las diferentes células, este fenómeno de toxicidad selectiva exige al menos, dos condiciones. La primera es la existencia de órganos diana susceptibles al tóxico (receptores) y la segunda, es la existencia de mecanismos que modifiquen las concentraciones del agente en forma activa, en la proximidad de los lugares efectores. Estos mecanismos han de modificar la molécula para originar un producto más tóxico, o liberarlo de su unión con las proteínas transportadoras (Repetto y Repetto, 2009). Esta "toxicidad selectiva" va a depender de la acción que tenga la droga, sobre estructuras del microbio, el blanco debe estar ausente en otras células, o si está presente, debe diferir suficientemente para permitir una inhibición selectiva del blanco (Morales, 1986; Lambert, 2005).

La toxicidad selectiva en *V. cholerae* puede estar relacionada con su estructura celular. De manera general, las bacterias Gram negativas tienen varias zonas: la membrana plasmática, el espacio periplásmico, una fina capa de peptidoglicano y una membrana externa. Esta última zona está constituida por lipopolisacáridos (LPS), fosfolípidos y proteínas (Pérez y Mota, 2006). De acuerdo con el antígeno O de su LPS capsular *V. cholerae* tiene más de 200 serogrupos (Pérez *et al.*, 2006; Cabrera-Rodríguez *et al.*, 2008). Por ello, más específicamente la diferencia en los serotipos podría explicar la susceptibilidad de la cepa de *V. cholerae*, muchos investigadores han reportado en estudios que algunas cepas de *V. cholerae* son resistentes a antibióticos comunes tales como cloranfenicol, doxiciclina, tetraciclina, ampicilina, sulfametoxazol, trimetoprima, ácido nalidíxico, estreptomina y eritromicina utilizadas para el tratamiento de diferentes enfermedades bacterianas (Beceiro *et al.*, 2013; Oladokun y Okoh, 2016) y la cepa *V. cholerae* ATCC 39440 que se utilizó en el presente trabajo si fue susceptible a los compuestos (por separado y en combinación) incluso al control positivo (cloranfenicol).

### **Actividad antimicrobiana cuantitativa en cepas de levaduras**

El hecho de que ambos compuestos presentaron actividad en las tres cepas de *Candida* evaluadas, es de suma importancia ya que a pesar de que las candidas forman parte de la flora normal de la piel, las membranas mucosas, el tracto gastrointestinal y la vagina pueden causar infecciones cuando las defensas del paciente son afectadas por algún factor externo (Macola, 2001; Brooks *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los obtenidos por Candelaria-Dueñas (2016), este autor registró CMI con

mircenol en cepas de levaduras (*C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*) que van de 1 a 4 mg/mL, sin embargo no registro actividad antifúngica en cepas de levaduras con ocimeno.

Varias especies del género *Candida* son capaces de causar candidiasis, que es una enfermedad cosmopolita que afecta a todas las edades y sexos. La mayoría de las infecciones por *Candida* provienen de una fuente endógena, pues esta se desarrolla a partir de los sitios donde habita como comensal, se considera un hongo oportunista ya que causa enfermedad cuando las defensas del paciente son afectadas (Macola, 2001).

Se han reportado más de 17 especies patógenas de levaduras, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis*. (Vazquez y Sobel, 2011). Aunque *C. albicans* posee la mayor capacidad patógena, la presión antifúngica empleada en el tratamiento de los episodios de candidiasis oral, ha inducido una selección de las especies implicadas etiológicamente. Esto ha favorecido que otras especies (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) se reporten en número creciente como agentes etiológicos de cuadros de candidiasis, poco se sabe con respecto a la patogenia de estas especies diferentes a *C. albicans*, con excepción de *C. tropicalis*, la cual es muy virulenta, produce proteinasas extracelulares similares a las de *C. albicans*, lo que puede incrementar su invasividad (Macola, 2001; Ryan y Ray, 2011).

### **Efecto sobre curvas de sobrevivencia microbiana**

El efecto de ambos compuestos y de la combinación 2:8 mircenol/ocimeno es bacteriostático y fungistático, términos que hacen referencia a la propiedad en la que un compuesto es capaz de inhibir la multiplicación; y después de que el efecto de este termina, la multiplicación se reanuda (Brooks *et al.*, 2013). Esto puede deberse a que los individuos resistentes a la acción de estos compuestos son seleccionados, manteniendo su capacidad replicativa y reemplazando a la población original con una nueva población resistente. Esta capacidad de resistir el efecto de algún antimicrobiano está presente en forma infrecuente en una población bacteriana antes de la exposición al compuesto (Fica, 2014).

El uso racional de los medicamentos requiere un diagnóstico correcto, conocimiento de la enfermedad, selección del fármaco idóneo y el diseño de una pauta de administración, este último establece la dosis, la frecuencia de administración y la duración que debe tener el tratamiento. El diseño de una pauta de administración requiere predecir cuál será el curso temporal de la concentración plasmática de un fármaco para saber cuándo comenzará a

observarse el efecto terapéutico, cuál será su intensidad y cuánto tiempo durará la acción, y cuál será el riesgo de que se produzcan efectos tóxicos (Del Arco y Flórez, 2008).

El seguimiento de la cinética de crecimiento de microorganismos expuestos a la acción de antimicrobianos permite comprobar la persistencia en la inhibición del crecimiento bacteriano de los supervivientes en un medio libre de antibióticos. Este Efecto Pos-Antibiótico (EPA) es variable en su duración en dependencia del microorganismo de que se trate y el antimicrobiano que se utilice. El EPA es la capacidad de un antimicrobiano de generar una inhibición prolongada del desarrollo de los microorganismos. Esto significa que aun cuando no se erradiquen por completo los microorganismos, éstos no proliferan nuevamente durante varias horas después de exponerlos a la CMI. Se ha demostrado además que, en la fase de EPA, los microorganismos son más sensibles a la destrucción por parte de los leucocitos (Cordiés *et al.*, 1998; Noda y Vidal, 2010). Walker (2000) y Mediavilla y García-Lobo (2008), mencionan que la aplicación de los microbioestáticos exige la participación y refuerzan el sistema inmunológico del paciente para eliminar los patógenos microbianos, lo cual ayuda también en un futuro a que la respuesta inmune sea más rápida.

#### **Determinación de la interacción con el valor de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF)**

Del total de las interacciones, se determinó que un 62.32% fue indiferencia. No se han realizado estudios donde se combinen dos monoterpenos hidrocarbonados. La mayoría de los estudios se han centrado en la interacción de monoterpenos fenólicos (como el timol, carvacrol) y fenilpropanoides (eugenol) con otros que tienen diferentes grupos funcionales, mientras los hidrocarburos se utilizan en menor medida (Bassolé, 2012), sin embargo Saut-Reyes en el 2016 evaluó la actividad antimicrobiana del  $\alpha$  y (-)  $\beta$  pineno, que al igual que el mirceno y el ocimeno son isómeros, los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con lo reportado por este autor, ya que determinó que los tipos de interacciones que ejercen al combinarse en proporción 1:1 ( $\alpha$ : $\beta$ ) son principalmente indiferencia, aunque reporta un número importante de interacciones antagónicas (11 antagonismos en las 17 cepas que evaluó).

Se determinó que el 27.54% del total de las interacciones fue sinergismo, es importante mencionar que en la mayoría se registró así ya que al evaluar los compuestos por separado no presentaron actividad y al evaluarlos en combinación sí. Santiesteban-López y

colaboradores en el 2007 mencionan que hay un número limitado de trabajos relacionadas con el mecanismo de acción de combinaciones de aceites esenciales o de sus componentes. Sin embargo, existen algunos mecanismos de acción generalmente aceptados que producen sinergismo. Éstas incluyen la inhibición secuencial de una vía bioquímica en común, la inhibición de las enzimas protectoras de la pared celular y el uso de agentes activos para mejorar la captación de otros antimicrobianos.

Delgado y colaboradores en el 2004, propusieron una explicación para el sinergismo entre timol y cimeno. Estos autores mencionan que debido a que los compuestos son hidrófobos, al igual que el mirceno y el ocimeno, ambos se difunden en las membranas de las células, entonces la acción de un compuesto puede facilitar la captación del otro en la bicapa lipídica de la membrana citoplásmica.

Un 4.35% de las interacciones fue antagonismo, esta solo se presentó en las cepas de levaduras, en estos microorganismos los mecanismos de interacción pueden producir efectos antagónicos los cuales han sido poco estudiados. En algunos trabajos se menciona que estas interacciones se pueden presentar al usar combinaciones de agentes microbiostáticos y microbicidas, al utilizar compuestos químicos que actúan sobre los mismos sitios diana del microorganismo y las interacciones químicas (directas o indirectas) entre los compuestos (Goñi *et al.*, 2009).

El 5.8% de las interacciones fue adición (o sinergismo parcial para autores como Gallucci y colaboradores, 2009). La interacción (sinergia, antagonismo o adición) entre dos compuestos depende de las concentraciones de los componentes individuales (Goñi *et al.*, 2009) y, en general, la susceptibilidad de los microorganismos de destino (Cox *et al.*, 2001). Esto puede explicar la variación de la interacción observada entre combinaciones y cepas.

Las diferencias en la actividad antimicrobiana pueden estar asociadas con variaciones en los mecanismos de acción, las estructuras químicas de los componentes activos, el tipo de microorganismos y la permeabilidad de los mismos a las sustancias activas, entre otras razones (Paredes y Roca, 2004).

Los aceites esenciales y los compuestos que los constituyen son una excelente fuente de antimicrobianos; sin embargo, es difícil comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en diferentes estudios, esto se debe principalmente a las diferentes metodologías, cepas microbianas y fitoquímicos empleados (Méndez-Pérez *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES

- ◆ Los compuestos mirceno y ocimeno presentaron actividad antimicrobiana por separado y en combinación, teniendo mayor actividad en cepas Gram positivas.
- ◆ Los compuestos mirceno y ocimeno no presentaron actividad en cepas de hongos filamentosos.
- ◆ La cepa Gram positiva que presentó mayor sensibilidad frente a los compuestos por separado y en combinación fue *S. epidermidis* ATCC 122298.
- ◆ *V. cholerae* ATCC 39440 fue la cepa Gram negativa que presentó mayor sensibilidad frente a los compuestos por separado y en combinación.
- ◆ La levadura que presentó la menor CMI en ambos compuestos fue *C. tropicalis* cc.
- ◆ El efecto que presentan los compuestos mirceno y ocimeno en las cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 y *V. cholerae* ATCC 39440 en las curvas de sobrevivencia es bacteriostático y en *C. tropicalis* es fungistático.
- ◆ La interacción que se presentó con mayor frecuencia fue indiferencia.
- ◆ El resultado de sinergismo más relevante se presentó en la cepa de *V. cholerae* ATCC 39440 con las combinaciones 8:2 y 2:8.
- ◆ *C. tropicalis* cc fue en la única cepa donde se presentó antagonismo en las tres combinaciones utilizadas.

## REFERENCIAS

- Albado, E.; Saez, G. y Grabiell, S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana* 12(1):17-19.
- Arcila, C. C.; Loarca, G.; Lecona, S. y González, E. 2004. Orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(1):100-111.
- Avila, J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México. 111 pp.
- Avila, R. M. 2016. Efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del sistema arrecifal veracruzano. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México. 91 pp.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46(2):446–475.
- Bandoni, A. L.; Retta, D.; Di Leo Libra, P. M. y Baren, C. M. 2009. ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(5):317-322.
- Barragán-Solís; A., 2006. La práctica de la auto atención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas. *Archivos en Medicina Familiar* 8(3):155-162.
- Barrera-Necha, L. L. y García-Barrera, L. J. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* *Revista UDO Agrícola* 8(1):33-41.
- Barry, A. L. 1976. Methods for testing antimicrobial combinations. En: *The Antimicrobial Susceptibility Test: Principles and Practices*. Lea and Febiger. Philadelphia. 105–116 pp.
- Bassolé, I. H. N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Tirogo, S.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R. C.; Dicko, M. H. 2010. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their



major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules* 15(11):7825–7839.

Bassolé, I. H. N.; Lamien-Meda, A.; Bayala, B.; Obame, L. C.; Ilboudo, A. J.; Franz, C.; Novak, J.; Nebié, R. C.; Dicko, M. H. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. *Phytomedicine* 18(12):1070–1074.

Bassolé, I. H. N. y Juliani, H. R. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* 17(4):3989-4006.

Beceiro, A.; Tomás, M. y Bou, G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews* 26(2):185-230.

Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S.; Morse, A. H.; Mietzner, T. A. y Morse, S. A. 2013. Jawetz, Melnick y Adelberg's Medical microbiology. 26° edición. Editorial McGraw-Hill. USA. 815 pp.

Bueno-Sánchez, J. G.; Martínez-Morales, J. R. y Stashenko, E. 2009. Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Revista Salud UIS* 41(3): 231-235.

Cabrera-Rodríguez, L. E.; Bravo-Fariñas, L.; Ramírez-Álvarez, M. M.; Llop-Hernández, A.; Fernández-Abreu, A.; Morier, L. y Borrego-Hernández, G. 2008. Susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de virulencia en cepas de *Vibrio cholerae* no-O1 aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda. *Revista Biomédica* 19(3):138-144.

Candelaria-Dueñas, S. 2016. Evaluación de la actividad antimicrobiana de algunos componentes de los aceites esenciales de plantas utilizadas en la medicina tradicional del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 45 pp.

Carson, C. F.; Mee, B. J. y Riley, T. V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46(6):1914–1920.

- Chaves, S. F.; Daskalaki, M. y Otero, J. R. 2008. Epidemiología de las infecciones por grampositivos multirresistentes. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 26(2):4-12.
- Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Hermans, N.; Totte, J.; Pieters, L. y Vlietinck, A. J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79(2):213–220.
- Cohen, J. 1992. Antimicrobial therapy in the inmunocompromised host. En: Lambert, H. y O'grady, P. (eds) *Antibiotic and chemotherapy*. 6° edición. Churchill Livingtone. Londres. 321-335 pp.
- Conner, D. E. y Beuchart, L. R. 1984. Sensitivity of heat-atressed yeast to esencial oils of plants. *Applied Environmental Microbiology* 47(2): 229-233.
- Consejo Europeo (1974). Natural Flavouring Substances. Their Sources, and Added Artificial Flavouring Substances. Partial Agreement in the Social and Public Health Field. List 3, Section A. no. 4022, 354 p.
- Cordies, L. L.; Machado, R. L. A. y Hamilton, C. M. L. 1998. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *ACTA MEDICA* 8(1):13-27.
- Cox, S. D.; Mann, C. M.; Markham, J. L.; Bell, H. C.; Gustafson, J. E.; Warmington, J. R. y Wyllie, S. G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88(1):170-175.
- Cox, S. D.; Mann, C. M. y Markham, J. L. 2001. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology* 91(3):492–497.
- Dalleau, S.; Cateau, E.; Bergés, T.; Berjeaud, J. M. y Imbert, C. 2008. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31(6):572–576.
- Davidson, P. M. 2005. Parabens. En: Davison P. M. y Sofos, J. N. y Branen, A. L. (Eds). 2005. *Antimicrobials in Food*. Tercera edición. CRC Press Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida 291-303 pp.

- Davidson, P. M. y Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 43(1):148-155.
- Del Arco, C. y Flórez, J. 2008. Metabolismo de los Fármacos. En: Flórez, J. (ed). *Farmacología Humana*. 5° edición. Editorial Masson. 87-100 pp.
- Delgado, B.; Fernandez, P.; Palop, A. y Periago, P. 2004. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiology* 21(3):327-234.
- Fica, A. 2014. Resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos, cocáceas Gram positivas y anaerobios. Implicaciones terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes* 25(3):432-444.
- Flórez, J. 2008. *Farmacología Humana*. 5° edición. Editorial Masson. Barcelona, España. 165 pp.
- Friedman, M.; Henika, P. R. y Mandrell, R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* 65(10):1545–1560.
- Gallucci, M. N.; Oliva, M.; Casero, C.; Dambolena, J.; Luna, A.; Zygodlob, J. y Demoa, M. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal* 24(6):348–354.
- Goñi, P.; López, P.; Sánchez, C.; Gómez-Lus, R.; Becerril, R. y Nerín, C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry* 116(4):982–989.
- Guenther, E. 1949. *The Essential Oils*. Editorial Van Nostrand, Inc. Princeton, NJ. 427 p.
- Gustafson, J. E.; Liew, Y. C.; Chew, S.; Markham, J. L.; Bell, H. C.; Wyllie, S. G. y Warmington, J. R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26(3):194–198.

- Helander, I. M.; Alakomi, H. L.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L. G. M. y Wright, A. V. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9):3590–3595.
- Hernández, T.; Canales, M.; Avila, G.; Durán, A.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; y Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology* 88(2-3):181-188.
- Hernández, T.; Canales, M.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; Durán, A. y Lira, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75:21–43.
- Hulin, V.; Mathot, A.; Mafart, P. y Dufossle, L. 1998. Antimicrobial properties of essential oils and flavor compounds. *Sciences des aliments* 18(6):563–582.
- Juven, B. J.; Kanner, J.; Scheved, F. y Weisslowics, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76(6):626-631.
- Kalembe, D. y Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10(10):813-829.
- Kolicheski, M. B.; Cocco, L. C.; Mitchell, D. A. y Kaminski, M. 2007. Synthesis of myrcene by pyrolysis of b-pinene: Analysis of decomposition reactions. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 80:92–100.
- Koroch, A.; Juliani, H. R. y Zygadlo, J. A. 2007. En: Berger, R. G. (ed). *Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer-Verlag. Berlin. 87 p.
- Kulijanabhadgavad, T.; Sriubolmans, N. y Ruangrunsi, N. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Heracleum siamicum*. *Journal of Health Research* 24(2):55-60.

- Lambert, P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(10):1471-1485.
- Liu, K.; Rossi, P.; Ferrari, B.; Berti, L.; Casanova, J. y Tomi, F. 2007. Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolina corsica* Jordan et Fourr. *Phytochemistry* 68:1698-1705
- López-Malo, A.; Alzamora, S. M. y Guerrero, S. 2000. Natural antimicrobials from plants. En: Alzamora, S. M.; Tapia, M. S y López-Malo, A. (eds). *Minimally processed fruits and vegetables-fundamental aspects and applications*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, MD, USA. 237-263 pp.
- Lujan-Hidalgo, M.; Guitiérrez-Miceli, F.; Ventura-Canseco, L.; Devdooven, L.; Mendoza-López, M.; Cruz-Sánchez, S.; García-Barradas, O.; Abud-Archila, M.; 2012. Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. *Gayana Botánica* 69 (Número Especial):7-14.
- Macola, O. S. 2001. Candida. En Llop, H. A.; Valdéz-Dapana, V. y Zuazo, S. J. L. (Eds). *Microbiología y Parasitología Médicas*. Editorial de Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. 501-507 pp.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. B. 2003. Biología de los Microorganismos de Brock. 10° edición. Editorial Prentice-Hall. Madrid. 1011 pp.
- Manzano-Gayosso, P.; Méndez-Tovar, L. J.; Hernández-Hernández, F. y López-Martínez, R. 2008. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gaceta Médica de México* 144(1):23-26.
- Marín-Loaiza, J. C. y Céspedes, C. L. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30(4):327-351.
- Martínez, I. A. y Pérez, A. J. 2001. Estafilococos. En: Llop, H. A.; Valdéz-Dapana, V. y Zuazo, S. J. L. (Eds). *Microbiología y Parasitología Médicas*. Editorial de Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. 153-163 pp.

- McMurry, J. 2012. Química orgánica. Brooks/Cole, Cengage Learning, 8° edición. Belmont, USA. 299, 530 pp.
- Mediavilla, J. F. y García-Lobo, J. M. 2008. Farmacología de las enfermedades infecciosas principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. En: Flórez, J. (ed). *Farmacología Humana*. 5° edición. Editorial Masson. 1175-1196 pp.
- Medina, A. M. 2011. Aceites esenciales: usos, composición química y actividades biológicas. Tesina de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 26 p.
- Méndez-Pérez, D.; Tostado-Quezada, J.; Hernández-Rodríguez, A.; González-Yañez, M G.; Martínez-Romero. A. y García-Luján, C. 2012. Sinergismo bactericida entre timol y carvacrol ante cepas bacterianas causantes de mastitis en ganado bovino. *Educación y asistencia técnica–AGROFAZ* 12(1):111-116.
- Mesa-Arango, A. C y Bueno-Sánchez, J. G. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia* 17(4):325-331.
- Morales, A. M. 1986. Antimicrobianos: una revisión sobre mecanismos de acción y desarrollo de resistencia. *Acta Médica Costarricense* 21(2):79-83.
- Neu, H. 1992. General therapeutic in infectious disease. En: Gorbach, S. L.; Bartlett, J. G. y Blacklou, N. R. (eds). *Infectious diseases*. WB Saunders. Philadelphia. 123-160 pp.
- Noda, A. y Vidal, A. 2010. Farmacocinética y farmacodinámica, implicación en un uso más racional de los antimicrobianos. *Revista Cubana de Farmacia* 44(4):533-546.
- Novgorodov, S. A. y Gudz, T. I. 1996. Permeability transition pore of the inner mitochondrial membrane can operate in two open states with different selectivities. *Journal of Bioenergetics Biomembranes* 28(2):139–146.
- Oladokun, M. O. y Okoh, I. A. 2016. *Vibrio cholerae*: A historical perspective and current trend. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6(11):895-908.
- Pai, M.; Acharya, L. y Udupa, N. 2004. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel – a 6-week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology* 90(1):99-103.

- Pandey, A. K., Kumar, S. 2013. Perspective on plant products as antimicrobial agents: A review. *Pharmacologia* 4(7):469-480.
- Paredes, F. y Roca, J. J. 2004. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Ámbito Farmacéutico Farmacología* 23(3):116-124.
- Patiño, C. D. 2003. ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos?. *Umbral Científico* 3:48-56.
- Pepeljnjak, S.; Kosalec, I.; Kalodera, Z. y Blazevic, N. 2005. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharmaceutica* 55(4):417-422.
- Pérez, J. L.; González, Y.; Año, G.; Cedré, B.; Valmaseda, T.; Alvarez, M.; Serrano, D.; Millán, E.; Fariñas, M.; Talavera, A. y García, L. 2006. Obtención de extractos de membrana externa de *Vibrio cholerae* O1, mediante el uso de diferentes detergentes. *VacciMonitor* 15(1):1-7.
- Pírez, M. y Mota, M. 2006. Morfología y estructura bacteriana. En: Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Universidad de la República. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del libro FEFMUR. 2° edición. 23-42 pp.
- Repetto, J. M. y Repetto, K. G. 2009. Toxicología fundamental. 4° Edición. Ediciones Díaz de Santos. 204 p.
- Reyes-Jurado, F.; Palo, E. y López-Malo, A. 2012. Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 6(1):29-39.
- Richter, C. y Schlegel, J. 1993. Mitochondrial calcium release induced by prooxidants. *Toxicology Letters* 67(1-3):119-127.
- Rodríguez, R. Z. 2010. Obtención de nuevas cefalosporinas derivadas de ácidos  $\alpha,\beta$ -insaturados con actividad frente a *Staphylococcus* spp. *Revista CENIC Ciencias Químicas* 41(3):195-196.
- Ryan, K. J. y Ray, C. G. 2011. Microbiología Médica de Sherris. 5 edición. Editorial McGraw-Hill. USA. 776 pp.

- Sacchetti, G., Maietti, S.; Muzzoli, M.; Scaglianti, M.; Manfredini, S.; Radice, M. y Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91(4):621-632.
- Santiesteban-Lopez, A.; Palou, E. y López-Malo, A. 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *Journal of Applied Microbiology* 102(2):486–497.
- Saut-Reyes, G. 2016.  $\alpha$  pineno y (-)  $\beta$  pineno: ¿Efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana?. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 59 pp.
- Sepúlveda, J. G.; Porta, D. H. y Rocha, S. M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(3):355-363.
- Sharm, A.; Flores-Vallejo, R.; Cardoso-Taketa, A.; Villarreal, M. 2017. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 208:264-329.
- Sikkema, J.; De Bont, J. y Poolman, B. 1994. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes. *The Journal of Biological Chemistry* 269(11):8022-8028.
- Sikkema, J.; De Bont, J. y Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59(2):201-222.
- Skočibušid, M., y Bezid N. 2004. Phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity of two *Satureja* species essential oils. *Phytotherapy Research* 18:967–970.
- Suppakul, P.; Miltz, J.; Sonneveld, K. y Bigger, S. 2003. Antimicrobial properties of Basil and its posible application in food packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(11):3197-3207.
- Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M. G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G. y Bisignano, G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents Chemother* 49(6):2474–2478.



- Usano-Aleman, J.; Palá-Paúl, J. y Díaz, S. 2014. Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología) Serie Botánica* 7(2):60-70.
- Valdés-Dapena, V. M. M. 2001. Vibrios. En: Llop, H. A.; Valdéz-Dapana, V. y Zuazo, S. J. L. (Eds). *Microbiología y Parasitología Médicas*. Editorial de Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. 333-339 pp.
- Van der Berghe, D. A. y Vlietinck, A. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. y Dey P. M. (eds) *Methods in plant biochemistry*. Vol.6 "Assays for Bioactivity". Series editor Academic Press New York, USA. 47-71 pp.
- Vazquez, J. A. y Sobel, J. D. 2011. Candidiasis. En: Kauffman, C. A.; Pappas, P. G.; Sobel, J. D. y Dismukes, W. E. (Eds.). *Essentials of Clinical Mycology*. 2° edición. Springer. 167-206 pp.
- Vercesi, A. E.; Kowaltowski, A. J.; Grijalba, M. T.; Meinicke, A. R. y Castilho, R. F. 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports* 17(1):43–52.
- Walker, T. S. 2000. Microbiology. Editorial McGraw-Hill Interamericana. USA. 532 pp.
- Wang, H. y Bun, N. T. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwifruits. *Phytochemistry* 61(1):1-6.
- Winn, C. W.; Allen, D. S.; Janda, M. W.; Koneman, W. E.; Procop, W. G.; Schreckenberger, C. P. y Woods, I. G. 2006. Koneman Diagnóstico microbiológico. 6° edición. Editorial Médica Panamericana, México. 290, 937-938 pp.
- Wyatt, T. D.; Passmore, C. M.; Morrow, N. C. y Reilly, R. M. 1990. Antibiotic prescribing: the need for a policy in general practice. *British Medical Journal* 300(6722):441-444.

## ANEXOS

### Anexo I. Estructura química de los compuestos mirceno y ocimeno

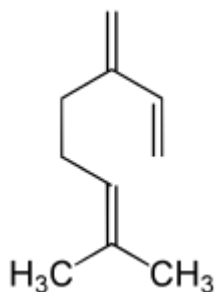


Figura 4. Estructura química del Mirceno

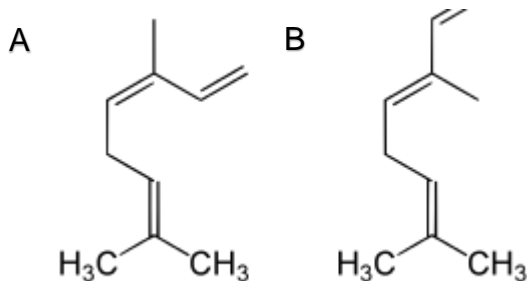


Figura 5. Estructura Estructura química del Ocimeno. A: Cis-Ociemeno B: Trans-Ociemeno

### Anexo II. Técnica de difusión en agar o Kirby-Baüer (modificada de Van der Berghe y Vlietinck, 1991)

El método de difusión por discos es la técnica más utilizada para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos herbales en bacterias y hongos de levaduras, la metodología es la siguiente:

Se utilizó como medio de cultivo agar Müeller-Hinton (MH) para las cepas bacterianas y agar papa y dextrosa (PDA), ya que promueven el desarrollo de la mayoría de los aislamientos microbiano clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los compuestos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

El inóculo se preparó tocado con un asa de siembra estéril las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo MH (cepas bacterianas) y caldo Sabouraud (cepas de levaduras), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo inoculado se incubaba a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland, lo equivale a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  organismos por mL.

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 mL de cloruro de bario a 99.5 mL de ácido sulfúrico 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o con un espectrofotómetro a 660 nm. Si la suspensión de organismos resulta ser más turbia se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas y por el contrario si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se incuba 24 horas más. Una vez logrado el estándar se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión y antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de la placa de agar MH o PDA (dependiendo el caso). El sembrado se realizará mediante estrías en por lo menos tres direcciones dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° de cada estría. Una vez seco el inoculo la placa de agar está lista para la aplicación de las muestras a evaluar.

Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del No. 5, los cuales serán previamente esterilizados. Una vez teniéndolos se colocan manualmente cinco sensidiscos sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril, se impregnaron con 4 µL de compuesto puro o de la combinación de compuestos realizando previamente mezclas en proporción 1:1, 8:2 y 2:8. Los sensidiscos deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa.

Como control positivo se evaluó la sensibilidad de las cepas bacterianas con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol y de las cepas de levaduras con sensidiscos impregnados con 56 µg de nistatina y como control negativo se utilizó aceite de oliva estéril.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para la interpretación de resultados, las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en mm. En todos los casos las pruebas se realizaron por triplicado y se reportara los valores promedio en mm ± la desviación estándar.

### **Anexo III. Técnica de dilución en caldo (modificada de Winn *et al.*, 2006)**

La prueba por dilución genera mayor cantidad de información cuantitativa que la de difusión con discos. Los aislamientos microbianos se exponen a diluciones seriadas de cada sustancia, después de lo cual la concentración de compuesto que inhibe el desarrollo se determina por observación visual.

El inóculo se preparó tocado con un asa de siembra estéril las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo MH (cepas bacterianas) y caldo Sabouraud (cepas de levaduras), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incubó el tubo inoculado se incubó a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland, lo equivale a aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  organismos por mL, de esta suspensión se tomaron 0.1 mL que fueron añadidos a 9.9 mL de solución salina al 0.08% obteniéndose así una concentración de  $10^5$  organismos por mL.

Al primer tubo con 2 mL de medio líquido estéril y se le agrega la concentración más alta de compuesto, se traspasa 1 mL de este a otro tubo con 1 mL de medio líquido, teniendo así una dilución que equivale a la mitad de la concentración inicial, esto se repite según las concentraciones que serán evaluadas, se utiliza también un tubo sin compuesto que nos servirá como punto de comparación. Una vez realizadas todas las diluciones cada tubo se inocula con 30  $\mu$ L de la suspensión microbiana. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas.

Para interpretar el resultado se compara la turbidez de los tubos con las diluciones y el tubo sin compuesto, marcando la Concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor dilución de antibiótico que inhibe el desarrollo del aislamiento. Puede determinarse mediante la observación de los tubos a simple vista, comparando el desarrollo de los tubos que contienen antibióticos con el del tubo control de desarrollo. La observación se facilita con un espejo de lectura, con el cual puede verse el fondo de los tubos. La CIM se expresa en mg/mL.

## **Concentración Mínima Bactericida (CBM) y Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Para lograr la determinación de la CBM, se requiere de subcultivos cuantitativos de los tubos con contenido claro en la prueba de dilución en caldo y de la comparación del número de bacterias viables al inicio y al final de la prueba. La menor cantidad requerida para eliminar una porción predeterminada del inoculo (en general, 99.9%) se denomina concentración bactericida mínima (CBM). La prueba bactericida directa es importante en la caracterización inicial y valoración clínica de los fármacos antimicrobianos, pero rara vez se necesita en casos individuales (Ryan y Ray, 2011)

Luego que se ha determinado la CIM se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 mL) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar MH y PDA. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/mL del cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano.

#### **Anexo IV. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos (Wang y Bun, 2002).**

En el ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas Petri, las cuales contenían 20 ml de agar PDA con las siguientes concentraciones del antimicrobiano: 4.0, 3.0, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.06 mg/mL de mirceno, ocimeno y de las combinaciones 1:1, 2:8 y 8:2; se inocularon 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Una vez realizado este procedimiento se incubaron las placas a 23°C. durante 72 horas o hasta que el crecimiento miceliar se desarrollara. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Ketoconazol y como control negativo sensidiscos impregnados con aceite de oliva estéril. Finalmente se midió con una regla calibrada en mm el crecimiento del hongo. El resultado se reporta en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a CFM; mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF<sub>50</sub>.

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

El crecimiento de las cepas microbianas se investigó mediante conteo de células viables del microorganismo sometido a los compuestos.

El desarrollo consiste:

Preparar y rotular un tubo con la solución problema para muestreo desde el tiempo después a intervalos de una hora, hasta las 6 horas. A partir de este muestreo, se preparan tubos para realizar lecturas cada 6 horas.

Preparar y rotular un tubo sin antimicrobiano que servirá como control del desarrollo.

Preparar el inóculo con aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo MH (cepas bacterianas) o caldo Sabouraud (cepas de levaduras), esta concentración bacteriana se obtiene en un período de 12-18 horas de incubación.

Con ayuda de una microipeta se inocula 0.1 mL de la suspensión de bacterias los tubos que contienen el antimicrobiano el cual estará a una concentración igual a la concentración bactericida mínima y sus múltiplos medios; esto es, la CMI, la mitad de la MIC. La concentración final debe ser aproximadamente de  $1 \times 10^5$  UFC/mL de caldo en cada tubo. Incubar en una estufa a 37°C sin presión de CO<sub>2</sub>.

Muestrear cada hora durante las 4 primeras horas, además se realizan diluciones en solución salina al 0.08%, para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, a partir de este tiempo se muestrea cada 2, 4 y 12 horas. Una vez inoculadas las placas se incuban durante 24 horas a 37°C.

Se realiza el conteo de las UFC en las placas y se grafica el Log<sub>10</sub> del número de sobrevivientes contra el tiempo en horas para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbecco, 1996; citado en Avila, 2016).

## Anexo VI. Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF)

La medición de las interacciones de agentes antimicrobianos, son hechas por difusión en agar y pruebas de dilución o por la determinación de curvas de inhibición; los resultados son visualizados por medio de isobogramas (López-Malo *et al.*, 2000).

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), con estos datos se obtuvieron las Concentraciones Inhibitorias Fraccionadas (CIF's) y el Índice de las Concentración Inhibitoria Fraccionada (índice CIF) con la finalidad de observar el tipo de efecto que presentan las mezclas; éste puede ser antagónico, aditivo, sinérgico o de indiferencia (Davidson y Parish, 1989). Si el efecto es aditivo, indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto no aumenta ni disminuye con la presencia de otro agente antimicrobiano; si el efecto es antagónico, indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto es reducida con la presencia de los otros agentes antimicrobianos y si el efecto es sinérgico indica que la actividad antimicrobiana de un compuesto se ve incrementada con la presencia de otro agente antimicrobiano (Barry, 1976) y la indiferencia es la falta de interacción entre los compuestos.

El índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$CFI = \left( \frac{[m] \text{ en comb}}{CMI_{m \text{ solo}}} \right) + \left( \frac{[o] \text{ en comb.}}{CMI_{o \text{ solo}}} \right)$$

Dónde:

[m] en combinación: es la concentración de mirceno en combinación con ocimeno.

CMI<sub>m solo</sub>: es la Concentración mínima inhibitoria de mirceno.

[o] en combinación: es la concentración de ocimeno en combinación con mirceno.

CMI<sub>o</sub>: es la Concentración Mínima Inhibitoria ocimeno.

Los valores serán interpretados de la siguiente manera: Sinergia (índice CIF <0.5), adición (0.5 ≤ índice CIF ≤ 1), indiferencia (1 < índice CIF ≤ 4), antagonismo (índice CIF > 4) (Bassolé *et al.*, 2010 y 2011).



### Ejemplo:

Cepa	Mirceno	Ocimeno	Combinación 2:8
	CMI	CMI	CMI
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 39440	3 mg/mL	2 mg/mL	0.25 mg/mL

### Calculo de CIF

100% - 0.25 mg/mL

20% - [mirceno]

80% - [ocimeno]

$$[\text{mirceno}] = \frac{(80\%) \left(0.25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{100\%} = 0.2 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

$$[\text{ocimeno}] = \frac{(20\%) \left(0.25 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{100\%} = 0.05 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

### Índice de la CIF

$$\text{Índice CFI} = \left(\frac{0.2 \text{ mg/mL}}{3 \text{ mg/mL}}\right) + \left(\frac{0.05 \text{ mg/mL}}{2 \text{ mg/mL}}\right) = (0.067) + (0.025) = 0.092$$

Tabla 1. Índice de la concentración para determinar el tipo de interacción farmacológica.

Rango (Valor índice CFI)	Tipo de interacción
<0.5	Sinergismo (SI)
$0.5 \leq \text{índice CIF} \leq 1$	Adición (AD)
$1 < \text{índice CIF} \leq 4$	Indiferencia (IN)
índice CIF > 4	Antagonismo (AN)