



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

Evaluación antibacteriana de nanotubos de
haloisita natural mediante dos técnicas
diferentes.

TESIS Y EXAMEN PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

P R E S E N T A:

MAURICIO MERCADO ESQUIVEL

ASESORAS:

DRA. RAQUEL GÓMEZ PLIEGO

DRA. YOLANDA MARINA VARGAS RODRÍGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación antibacteriana de nanotubos de haloisita natural mediante dos técnicas diferentes.

Que presenta el pasante: **Mauricio Mercado Esquivel**

Con número de cuenta: **309193348** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Química Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Noviembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zuñiga Cruz	
VOCAL	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
SECRETARIO	Dra. Raquel Gómez Pliego	
1er. SUPLENTE	Q. I. Griselda Ávila Enríquez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Moisés Missael Martínez Mejía	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de **Microbiología Industrial L-502 Anexo**, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, a cargo de la Dra. Raquel Gómez Pliego.

La investigación fue financiada con fondos de la **UNAM-DGAPA** del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica **PAPIIT RT101815**.

Agradecimientos

Agradezco a la UNAM y a sus profesores por el conocimiento brindado durante estos años de formación, por haberme dado las condiciones para mi desarrollo personal y profesional, así como las aptitudes necesarias para mi incursión en el ámbito laboral.

Gracias a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán aprendí muchas cosas además de Química, conocí a excelentes profesores y compañeros con los que he compartido maravillosos momentos durante mi experiencia como alumno de esta magnífica institución.

Dedicatorias

Gracias a Dios por brindarme la oportunidad de estar aquí.

A mis padres:

Quiero dedicarles este trabajo, yo se que a pesar de que a veces pasaron situaciones complicadas a lo largo de todos estos años y que el camino parecía cada vez mas difícil nunca se dieron por vencidos conmigo, ya que en algunas ocasiones no les di los suficientes motivos para brindarles la confianza que necesitaban aún así estuvieron conmigo y para mi es un orgullo decirles que he culminado una de las partes más importantes en mi vida y esta solo es la primera parte, apenas es el comienzo de esta vida que ustedes hicieron posible y espero poder darles aunque sea un pequeño fragmento de todo lo que me han brindado, gracias por todo los quiero y siempre voy a estar para ustedes.

A mi hermano Cristian:

Hermano gracias por siempre estar ahí para mi, siempre que te he necesitado has estado ahí y yo se que siempre vas a estar asi como yo para ti ya que pase lo que pase siempre seremos hermanos y nunca nada lo va a cambiar, eres el mejor y siempre has sido el mejor ejemplo de ser humano para mi. Gracias hermano.

A mi directora:

Dra. Raquel gracias por aceptarme bajo su tutela a pesar de que no fui uno de los mejores alumnos usted se tomó parte de su tiempo para enseñarme un poco de lo mucho que sabe y sin su guía yo no podría haber culminado esta parte de mi formación, gracias por no dejar que yo abandonara este proyecto. Siempre estaré agradecido con usted.

A Karla Maldonado:

Gracias amor por haberme ayudado a culminar mi trabajo y espero que siempre estemos juntos para apoyarnos y como siempre te lo he dicho vamos a crecer juntos y así saldremos siempre adelante.

ÍNDICE

Título	Páginas
Índice de Abreviaturas	9
Índice de Figuras	11
Índice de Tablas	12
Índice de Gráficas	12
Índice de Esquemas	15
RESUMEN	16
1.OBJETIVOS	18
1.1.General	19
1.2.Particulares	19
2.INTRODUCCIÓN	20
3.MARCO TEÓRICO	22
3.1.Definición de antimicrobianos	23
3.2.Historia de los antibióticos	23
3.3.Clasificación de los antibióticos	24
3.3.1. Clasificación de los agentes antimicrobianos por su origen	26
➤ Sintéticos	
➤ Naturales	
➤ Semisíntesis	
3.3.2. Clasificación de los agentes antimicrobianos por su efecto	26
➤ Bacteriostático	
➤ Bactericida	
3.3.3. Clasificación de los agentes antimicrobianos en base a su espectro de acción	26
➤ Amplio espectro	
➤ Espectro reducido	
3.3.4. Clasificación de los agentes antimicrobianos en base a su estructura	26
➤ Aminoglucósidos	
➤ Cefalosporinas	

➤ Cloranfenicol	
➤ Macrólidos	
➤ Quinolonas	
➤ Penicilinas	
➤ Sulfonamidas	
➤ Tetraciclinas	
3.3.5. Clasificación de los agentes antimicrobianos en base a su mecanismo de acción	31
➤ Inhibidores de la síntesis de la pared celular	
➤ Dañan a la membrana plasmática	
➤ Inhiben la síntesis de proteínas	
➤ Inhiben o alteran la síntesis de ácidos nucleicos	
➤ Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	
➤ Inhibidores de β -lactamasas	
3.4. Métodos de producción de nuevos antibióticos	33
3.5. Resistencia a antibióticos	34
3.6. Mecanismo de resistencia antimicrobiana	35
3.6.1. Causas genéticas de las resistencia a los antimicrobianos	35
3.6.2. Causas bioquímicas de las resistencia a los antimicrobianos	36
3.6.3. Impacto producido por resistencia a agentes antimicrobianos (RAM)	36
3.6.4. Factores que aceleran la aparición y propagación de la RAM	37
3.7. Generalidades de los microorganismos utilizados	38
➤ <i>Escherichia coli</i>	
➤ <i>Salmonella typhimurium</i>	
➤ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
➤ <i>Staphylococcus aureus</i>	
➤ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
➤ <i>Shigella flexneri</i>	
3.8. Arcillas	42
3.8.1. Historia	42
3.8.1. Clasificación	44
3.9. Halosita	45
3.9.1. Definición	45
3.9.2. Estructura y morfología	46

3.9.3. Usos	47
3.10 Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana	47
3.10.1 Método de Kirby Bauer o método de difusión en agar	48
3.10.2 Indicaciones y limitaciones	49
3.10.3 Método de macrodilución en agar	50
3.10.4 Indicaciones y limitaciones	50
4.HIPÓTESIS	51
5.METODOLOGÍA	53
5.1. Preparación de medios de cultivo	55
5.1.1. Agar nutritivo	55
5.1.2. Agar Mueller Hinton	55
5.1.3. Caldo nutritivo	55
5.2. Activación de las cepas en estudio	56
5.3. Ajuste de la turbidez a la escala 5 de McFarland	56
5.4. Método de Kirby Bauer o método de difusión en agar	56
5.5. Método de macrodilución en agar	58
5.6. Diagrama de flujo	60
6.RESULTADOS	63
6.1. Resultados de la actividad antimicrobiana de la haloisita por el método Kirby Bauer	64
6.2. Resultados de la actividad antimicrobiana de la haloisita por el método macrodilución en agar	71
7.ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
7.1. Análisis por el método de difusión en disco Kirby Bauer	78
7.2. Análisis por el método de macrodilución en agar	82
8.CONCLUSIONES	84
9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
10. ANEXOS	96

Índice de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
[CE₅₀]	Concentración efectiva cincuenta
50S	Un Svedberg es una unidad no incluida en el sistema internacional de unidades, que se usa en ultracentrifugación. Se nombró en homenaje al físico y químico sueco Theodor Svedberg.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AKN	Amikacina 30 µg.
AM-AFM	Microscopio de Fuerza Atómica de Amplitud Modulada.
AMP	Ampicilina 10 µg.
ATCC	Por sus siglas en Inglés American Type Culture Collection.
a_w	Acrónimo en Inglés activity water.
CHL	Cloranfenicol 30 µg.
CIM	Concentración inhibitoria mínima.
Di	Dioctaédrico.
FAO	Acrónimo en Inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations.
NCCLS	Se conocía anteriormente con el nombre de Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (conocido ahora solo por su sigla), el NCCLS es una organización internacional, interdisciplinaria, educacional y no lucrativa que anualmente elabora, por consenso, actualizaciones y lineamientos estándares para la atención de salud.
RAM	Resistencia a agentes antimicrobianos.

SOS	Señal de socorro mayormente utilizada a nivel mundial.
SPP	Terminología utilizada para referirse a todas las especies individuales dentro de un género taxonómico.
TET	Tetraciclina 30 µg.
Tr	Trioctaedrico.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
WHO / OMS	Acrónimo en inglés World Health Organization.

Índice de Figuras

No. Figuras	Título	Páginas
Figura 1	Estructura de la amikacina.	27
Figura 2	Núcleo <i>cefem</i> (núcleo básico de las cefalosporinas).	27
Figura 3	Estructura base del cloranfenicol.	28
Figura 4	Estructura de la eritromicina, donde se aprecia el anillo lactónico macrocíclico.	29
Figura 5	Estructura de la 4-quinolona, base para la mayoría de las quinolonas.	29
Figura 6	Ácido 6-aminopenicilánico núcleo básico de las penicilinas.	30
Figura 7	Estructura del ácido para-aminobenzoico.	30
Figura 8	Estructura de la tetraciclina donde se aprecia el tetraciclo.	31
Figura 9	Sitios de acción de los antibióticos y algunos mecanismos de resistencia.	33
Figura 10	Mecanismos de transferencia genética.	36
Figura 11	Representación de la estructura de los nanotubos de haloisita.	46
Figura 12	Imagen de haloisita tomada con Microscopio de Fuerza Atómica de Amplitud Modulada (AM-AFM) acoplada a espectroscopia RAMAN, sistema N8 NEOS SENTERRA, ESM-IPN.	46

Índice de Tablas

No. de Tabla	Título	Páginas
Tabla 1	Clasificación de la familia de las arcillas (Di: dioctaédrico; Tr: tioctaédrico) en relación con su mineralogía.	45
Tabla 2	Valores promedio de los halos de inhibición (mm) de las diferentes bacterias estudiadas a distintas cantidades de haloisita (μg).	66
Tabla 3	Concentración efectiva 50 [CE] ₅₀ calculada de la haloisita para las diferentes bacterias.	70
Tabla 4	Resultados del método de macrodilución en agar.	72

Índice de Gráficas

No. de Gráfica	Título	Páginas
Gráfica 1A	Efecto inhibitorio de la haloisita probada en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. Cada punto representa la media de $n=7 \pm \text{SEM}$, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.	65
Gráfica 1B	Resultados del método de difusión en disco.	67
Gráfica 1C	Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	68
Gráfica 1D	Dosis respuesta para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	69

Gráfica 1E	Efecto inhibitorio de la haloisita probada en <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.	98
Gráfica 1F	Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022.	99
Gráfica 1G	Dosis respuesta para <i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022.	99
Gráfica 1H	Efecto inhibitorio de la haloisita probada en <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.	101
Gráfica 1I	Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	102
Gráfica 1J	Dosis respuesta para <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	102
Gráfica 1K	Efecto inhibitorio de la haloisita probada en <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.	104
Gráfica 1L	Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	105
Gráfica 1M	Dosis respuesta para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	105
Gráfica 1N	Efecto inhibitorio de la haloisita probada en <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.	107

Gráfica 1Ñ	Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	108
Gráfica 1O	Dosis respuesta para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	108
Gráfica 1P	Efecto inhibitorio de la haloisita probada en <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.	110
Gráfica 1Q	Log de la cantidad de haloisita vs log del diámetro de los halos para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883.	111
Gráfica 1R	Dosis respuesta para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883.	111
Gráfica 2A	Efecto inhibitorio de la haloisita para el método de macrodilución en agar. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Tukey. Literales diferentes $p < 0.05$, diferencias significativas.	73
Gráfica 2B	Log de la concentración vs el log de las UFC/ml <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	74
Gráfica 2C	Gráfico de dosis respuesta para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	75
Gráfica 2D	Perfil de sensibilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 a la haloisita natural.	76
Gráfica 2E	Log de la concentración vs el log de las UFC/ml <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	113
Gráfica 2F	Dosis respuesta para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	113
Gráfica 2G	Perfil de sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a haloisita natural.	114
Gráfica 2H	Log de la concentración vs el log de las UFC/ml <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	115

Gráfica 2I	Dosis respuesta para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	116
Gráfica 2J	Perfil de sensibilidad de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a haloisita natural.	117
Gráfica 2K	Log de la concentración vs el log de las UFC/ml <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	118
Gráfica 2L	Dosis respuesta para <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028.	118
Gráfica 2M	Perfil de sensibilidad de <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 a haloisita natural.	119

Índice de Esquemas

Esquemas	Título	Páginas
Esquema 1	Clasificación de diferentes antibióticos	25
Esquema 2	Método de Kirby-Bauer (difusión en agar)	57
Esquema 3	Método de macrodilución en agar	59

RESUMEN

En la actualidad uno de los principales problemas a los que se enfrenta la sociedad es el desarrollo de resistencia de los microorganismos a los diversos agentes antimicrobianos presentes en el mercado, ya sea por el uso indiscriminado o la incorrecta administración de los mismos, para lo cual, el desarrollo de nuevos agentes con actividad antimicrobiana se hace necesaria.

El uso de arcillas con fines medicinales es una práctica antigua y generalizada, por las características que posee: alta capacidad adsorbente, bajos costos de producción, de venta y una amplia distribución a lo largo del mundo. Sin embargo, su uso moderno en la elaboración y desarrollo de nuevos productos químicos, farmacéuticos o cosméticos necesita un estudio más profundo sobre los procesos de preparación y las técnicas de evaluación de las mismas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de una haloisita como agente antibacteriano, mediante dos técnicas diferentes, por el método de difusión en disco Kirby-Bauer, y el de macrodilución en agar, en diferentes cepas microbianas, las cuales fueron obtenidos de la American Type Culture Collection (**ATCC**): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

En el Método de Kirby Bauer para conocer la $[CE]_{50}$ los resultados fueron analizados mediante la construcción de curvas-concentración-respuesta graduales, porcentajes de resistencia y sensibilidad para cada uno de los microorganismos probados, estos mostraron que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 presentó una alta sensibilidad a la haloisita y la menor $[CE]_{50}=1.05 \mu\text{g}$, mientras que *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, presentó la menor sensibilidad a la haloisita y la mayor $[CE]_{50}=4.30 \mu\text{g}$ comparados con el control. Por otro lado, los resultados por el método de macrodilución en agar indicaron que la mayor capacidad inhibitoria que presentó la haloisita fue para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (1.1×10^{10} UFC/ mL), seguido de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (1.7×10^{10} UFC/ mL).

Finalmente, los resultados mostraron que el mejor método para evaluar materiales como las haloisitas fue el de macrodilución en agar ya que cuando se realiza por el Método de Kirby Bauer se tiene la desventaja de que al ser un material insoluble se pierde la capacidad de difusión disminuyendo su actividad, mientras que por macrodilución la haloisita se encuentra uniforme en toda la superficie, lo que lo hace más eficiente.

1. OBJETIVOS

1.1. General.

Evaluar y comparar el efecto antibacteriano de una haloisita natural mediante dos métodos de susceptibilidad a los antimicrobianos, Kirby Bauer y macrodilución en agar para comprobar su capacidad de inhibición.

1.2. Particulares

- ❖ Evaluar el efecto de una haloisita natural en diferentes grupos de bacterias (Gram + y Gram -) mediante el método de Kirby Bauer.
- ❖ Evaluar el efecto de una haloisita natural en diferentes grupos de bacterias (Gram + y -) mediante el macrodilución en agar.
- ❖ Determinar la concentración efectiva cincuenta, de la haloisita natural para cada uno de los microorganismos en estudio por el método de Kirby Bauer
- ❖ Determinar el porcentaje de sensibilidad y resistencia, de la haloisita natural para cada uno de los microorganismos en estudio por el método de macrodilución en agar.
- ❖ Comparar cuál de los dos métodos es mejor para evaluar la actividad antimicrobiana de muestras de arcillas (haloisita).

2. INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO), el número de muertes causadas por enfermedades infecciosas (respiratorias, gastrointestinales, etc.), contribuyen de manera relevante en las cifras de mortalidad no tan solo en México sino a nivel mundial. Así mismo la OMS declaró que *en todo el mundo aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia microbianas a los antibióticos los cuales desafían nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas habituales causando muertes y discapacidades cuando, hasta hace poco, podían tratarse para permitir que las personas afectadas siguieran su vida con normalidad.*

Por lo anterior el desarrollo, producción y la correcta administración de nuevos agentes antimicrobianos, son las herramientas con las que se puede mitigar la resistencia antimicrobiana, existen compuestos tales como las haloisitas cuya característica principal es su alto poder de adsorción. Para comprobar el estudio de la actividad antimicrobiana existen diversos métodos de análisis con los cuales se puede analizar la capacidad que tienen las diversas sustancias para inhibir el crecimiento de los microorganismos, estos pueden ser el método de difusión en disco Kirby-Bauer, el de macrodilución en caldo y macrodilución en agar, siendo estos los más empleados para este propósito ya sea por su simplicidad o por los bajos costos en la realización de dichas técnicas.

Lo que se pretende en el presente trabajo es comparar la capacidad antimicrobiana de una haloisita natural frente a diversos microorganismos los cuales son importantes en el entorno hospitalario ya que se conoce que estos son microorganismos de carácter oportunista, por lo que tienden a infectar a pacientes inmunosuprimidos.

3. MARCO TEÓRICO

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Definición de antimicrobianos

Los antimicrobianos se definen como moléculas naturales producidas por organismos vivos tales como las plantas y microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), sintéticas o semisintéticas, capaces de inducir la muerte o la inhibición del crecimiento de bacterias, levaduras, hongos, etc. (Bado I et al., 2017). Es decir, es una sustancia secretada por un microorganismo, que tiene la capacidad de afectar a otros.

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ya que ejercen una acción específica sobre algún organelo o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica, actúan a bajas concentraciones, y la toxicidad es selectiva con una toxicidad mínima para las células del huésped (Pasberg GC., 2014).

3.2. Historia de los antibióticos

La industria de los antibióticos parte del descubrimiento de dos vertientes muy importantes, las cuales revolucionaron los tratamientos existentes en la época de los 40's (FAO., 2017). El primer descubrimiento importante con características de un antibiótico fue el del prontosil el cual es un compuesto azoico, que tiene efecto en la inhibición de las infecciones producidas por *estreptococos*; la importancia de este descubrimiento radica en ser el precursor de las sulfonamidas (Bentley R., 2009).

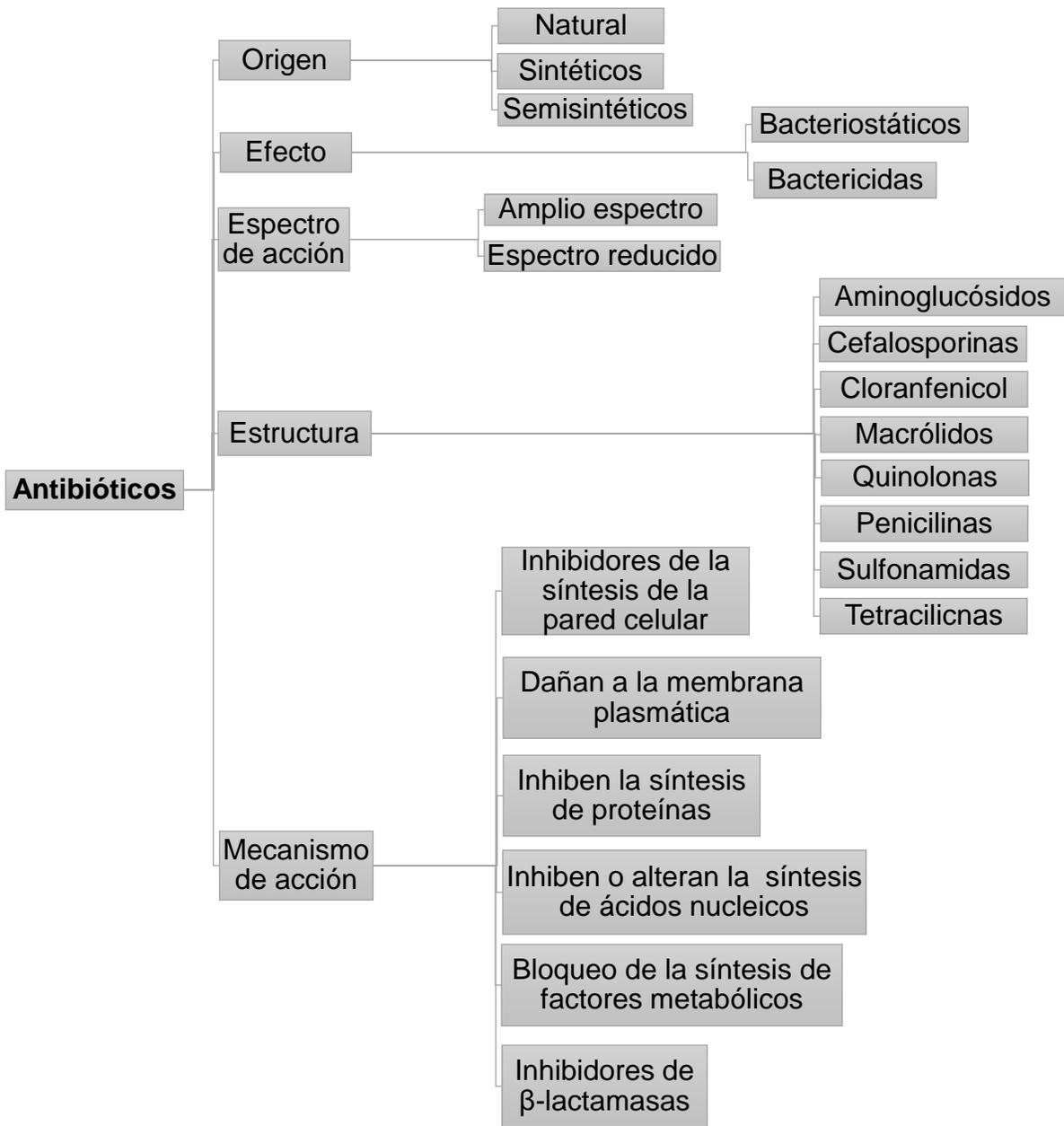
La segunda vertiente importante fue el descubrimiento de la penicilina por Fleming en 1929 (Trigos A et al., 2005), y no fue sino hasta 1940, cuando Florey, Chain publicaron un informe acerca de su enorme importancia, potencial y su extracción a partir de los cultivos del hongo *Penicillium nonatum*.

En la actualidad el desarrollo de los antibióticos se basa en el conocimiento de la fisiología, metabolismo y genética de los microorganismos a los que van dirigidos,

buscando que los nuevos antibióticos sean cada vez más selectivos y específicos para un sitio de acción previamente establecido, además de que sean capaces de evadir los mecanismos de defensa propios de cada microorganismo. (Wencewicz AT., 2016).

3.3. Clasificación de antibióticos

Existen numerosos y diversos tipos de agentes antimicrobianos de acuerdo a lo descrito por Molina LJ., 2017, Cordiés JL, et al., 1998 los antibióticos se pueden clasificar de diversas maneras las más comunes se presentan en el **Esquema 1**.



Esquema 1. Clasificación de los diferentes antibióticos. (Molina LJ., 2017, Cordiés JL, et al., 1998)

3.3.1 Clasificación de los agentes antimicrobianos por su origen

Estos pueden ser sintéticos, naturales, o producidos a partir de una semisíntesis (Muñoz DK, et al 2004).

- Sintéticos: Son aquellos agentes antimicrobianos que se sintetizan a partir de moléculas sencillas por medio de reacciones químicas.
- Naturales: Son obtenidos como subproductos del metabolismo de los seres vivos, como pueden ser, plantas, hongos, bacterias, etc. Siempre y cuando el ser humano no interfiera en la obtención de los mismos.
- Semisíntesis: Los agentes antimicrobianos pertenecientes a este grupo son aquellos que son obtenidos de los seres vivos y que posteriormente son modificados mediante diversas reacciones químicas

3.3.2 Clasificación de los agentes antimicrobianos por su efecto

- Bacteriostáticos: Son aquéllos que inhiben el crecimiento bacteriano, el cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento.
- Bactericidas: Poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica e *irreversible*. (Cordiés JL & Machado RLA., 1998, Cué Brugueras M, Morejón García M., 1998).

3.3.3 Clasificación de los agentes antimicrobianos en base a su espectro de acción

Bajo esta clasificación se encuentran:

- Los de amplio espectro, los cuales se definen como aquellos antibióticos que son activos en un amplio número de especies y géneros de microorganismos (Gram + y Gram -).
- Los de espectro reducido, los que se definen como aquellos antibióticos que son activos ante un grupo reducido de especies de microorganismos o Gram + o Gram -, pero no ambos.

3.3.4 Clasificación de los agentes antimicrobianos en base a su estructura

Otra clasificación muy utilizada agrupa a los antibióticos sobre la base de su estructura química y los denomina como familias o clases de antibióticos:

- Aminoglucósidos: Se caracterizan por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol (**Figura1**), según los aminoazúcares, son altamente polares, policationes solubles en agua y generalmente estables al calor y cambios de pH entre 5 y 8. (Horcajada JP & Cantón R., 2014, Molina J et al., 2009; Mella MS et al., 2004, Mingeot LMP et al., 1999).

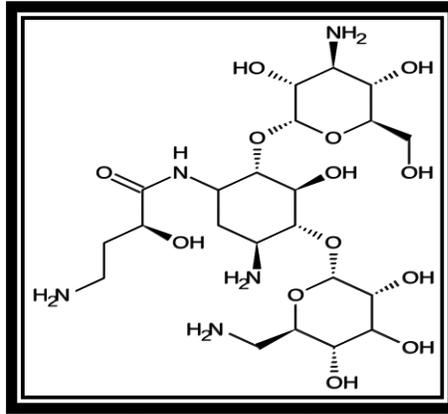


Figura 1. Estructura de la amikacina.

- Cefalosporinas: Son productos de origen natural, contienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino (**Figura 2**), constituyendo el núcleo *cefem*, a partir del cual se derivan todas las cefalosporinas (Rodríguez RZ, et al., 2010, Mella MS et al., 2001).

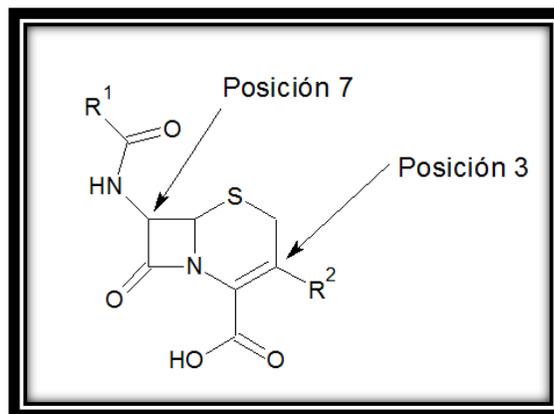


Figura 2. Núcleo *cefem* (núcleo básico de las cefalosporinas).

- Cloranfenicol: Este agente antimicrobiano es único entre los compuestos naturales ya que contiene un grupo nitrobenzenceno conectado a un grupo propanol, así como un grupo amino conectado a un derivado del ácido. Los grupos propanol y ácido dicloroacético deben estar intactos para una buena actividad antimicrobiana, no obstante, algunas sustituciones son posibles (**Figura 3**) (Morales GYE et al., 2007).

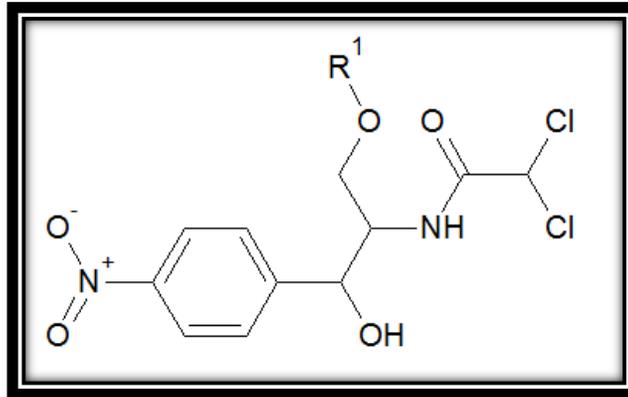


Figura 3. Estructura base del cloranfenicol.

- Macrólidos: Son antibióticos que se caracterizan por tener un anillo lactónico macrocíclico:
- De 14 átomos: Eritromicina, claritromicina, oleandomicina, etc.
 - De 15 átomos: Azitromicina.
 - De 16 átomos: Espiramicina y josamicina.

Todos ellos actúan inhibiendo la síntesis de proteínas por unión a la subunidad 50S (Svedberg), del ribosoma bacteriano y bloquean el proceso de translocación. (Sevilla SD et al., 2010, Cobos TN et al., 2009). (**Figura 4**).

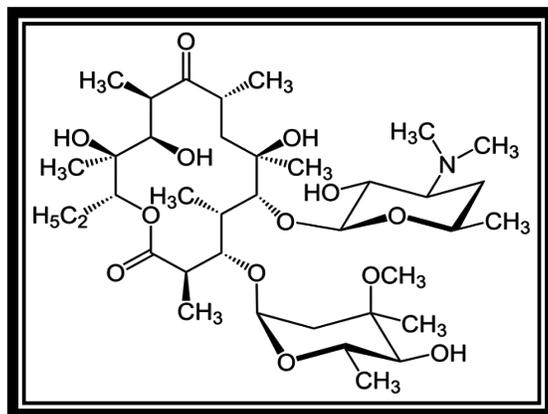


Figura 4. Estructura de la eritromicina, donde se aprecia el anillo lactónico macrocíclico.

- **Quinolonas:** Tienen una estructura formada por dos anillos, con un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo en la posición 3 (**Figura 5**). La potencia y el espectro aumentan de manera significativa cuando llevan un átomo de flúor en la posición 6, posiblemente porque mejora la penetración en tejidos y la unión a las topoisomerasas bacterianas. (Aldred KJ et al., 2014, Alós JI., 2009).

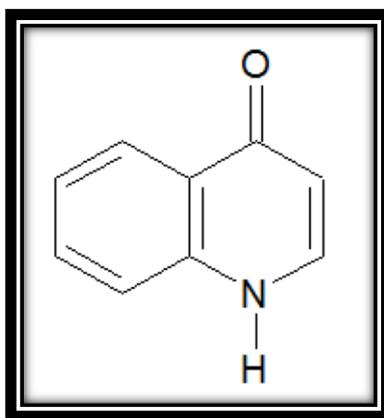


Figura 5. Estructura de la 4-quinolona, base para la mayoría de las quinolonas.

- Penicilinas: Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico (**Figura 6**), que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. son producidos por diferentes especies de *Penicillium spp.* (Seija V et al., 2006).

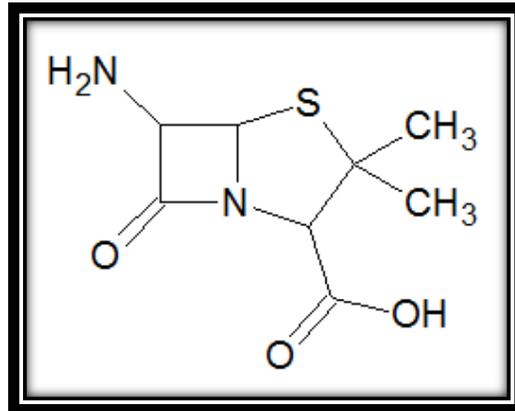


Figura 6. Ácido 6-aminopenicilánico núcleo básico de las penicilinas.

- Sulfonamidas: Son antimicrobianos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro, inicialmente con actividad frente a una gran variedad de microorganismos grampositivos y gram-negativos pero con posterior desarrollo de amplia resistencia.

Derivan de la sulfanilamida, su estructura es similar al ácido paraaminobenzoico (**Figura 7**), un factor requerido por las bacterias para la síntesis del ácido fólico (Vicente D & Pérez TE., 2010).

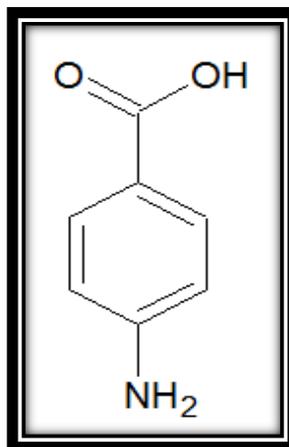


Figura 7. Estructura del ácido paraaminobenzoico.

- Tetraciclinas: Son un grupo de antibióticos, que se caracterizan por tener el mismo núcleo tetracíclico, naftaceno y propiedades similares (**Figura 8**). Actúan por interferencia de la síntesis proteica en microorganismos susceptibles al fijarse en la subunidad 30S del ribosoma. Tienen un espectro de acción amplio, que incluye bacterias grampositivas y gramnegativas, etc. (Guyen, YN & Baumard S., 2013, Brugueras MC & Morejón GM., 1999).

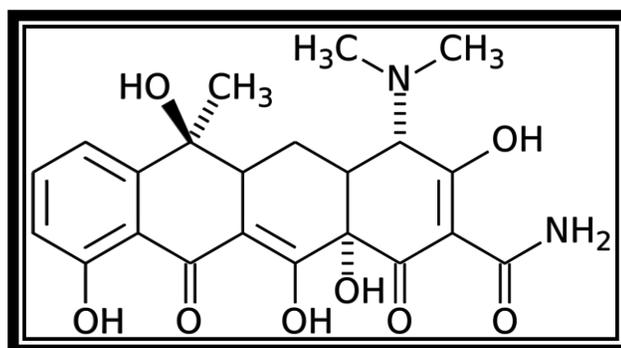


Figura 8. Estructura de la tetraciclina donde se aprecia el tetraciclo.

3.3.5 Clasificación de los agentes antimicrobianos en base a su mecanismo de acción

En la **Figura 9**, se presentan los diferentes mecanismos de acción de los agentes antibacterianos, cuyos blancos se encuentran en diferentes regiones de la célula u organelos estos pueden ser: pared celular, membrana plasmática, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de factores metabólicos y β -lactamasas (Calvo J & Martínez L., 2009; Martínez JA & Sánchez F., 2007, Sánchez RC., 2006).

- Inhibidores de la síntesis de la pared celular: Estos pueden actuar en cada una de las etapas de la síntesis de la pared celular; la pérdida de ésta los hace sensibles a cambios en la concentración del medio, lo que puede resultar en la destrucción del microorganismo, por efectos de un gradiente de osmolaridad que suele estar presente en el medio ambiente bacteriano y el citoplasma del microorganismo. (Gnansia ER. 2006).

- Dañan la membrana plasmática: La membrana citoplásmica es responsable de la integridad celular, al intervenir en los procesos de difusión y transporte activo, controlando de esta manera los componentes internos de la célula, las sustancias que alteran esta estructura modifican sus propiedades como la permeabilidad. Estos pueden tener una alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplásmica.

- Inhiben la síntesis de proteínas: La síntesis de las proteínas es afectada por la acción de los agentes antimicrobianos, su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y de las células eucariotas; los ribosomas bacterianos están formados por sub unidades, 30S y 50S en esta estructura los diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los diversos agentes antimicrobianos.

- Inhiben o alteran la síntesis de ácidos nucleicos: La replicación y la transcripción del ácido desoxiribonucleico (ADN) se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen las dianas para la acción de diversos agentes antimicrobianos; por lo general los agentes antimicrobianos pertenecientes a esta categoría, no son particularmente selectivos en su acción y tienden a tener cierta toxicidad para las células eucariotas.

- Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos: Para la obtención de determinados componentes esenciales como los aminoácidos o bases púricas, pirimídicas de los nucleótidos se requiere la síntesis de folatos, Los agentes antimicrobianos pertenecientes a este grupo actúan inhibiendo la enzima dihidropterrosintasa la cual es la encargada de la formación del ácido dihidrofólico (precursor de los folatos).

- Inhibidores de β -lactamasas: Los llamados inhibidores de las betalactamasas son moléculas que contienen en su estructura un anillo

betalactámico. Estas son enzimas producidas por las bacterias que destruyen la actividad de determinados betalactámicos (Rodríguez AC, et al., 2015, Scott G., 2009). Los efectos adversos son poco frecuentes ya que estos fármacos actúan sobre sustratos enzimáticos no presentes en las células eucariotas del hombre o de los animales (Suárez C & Gudiol F., 2009).

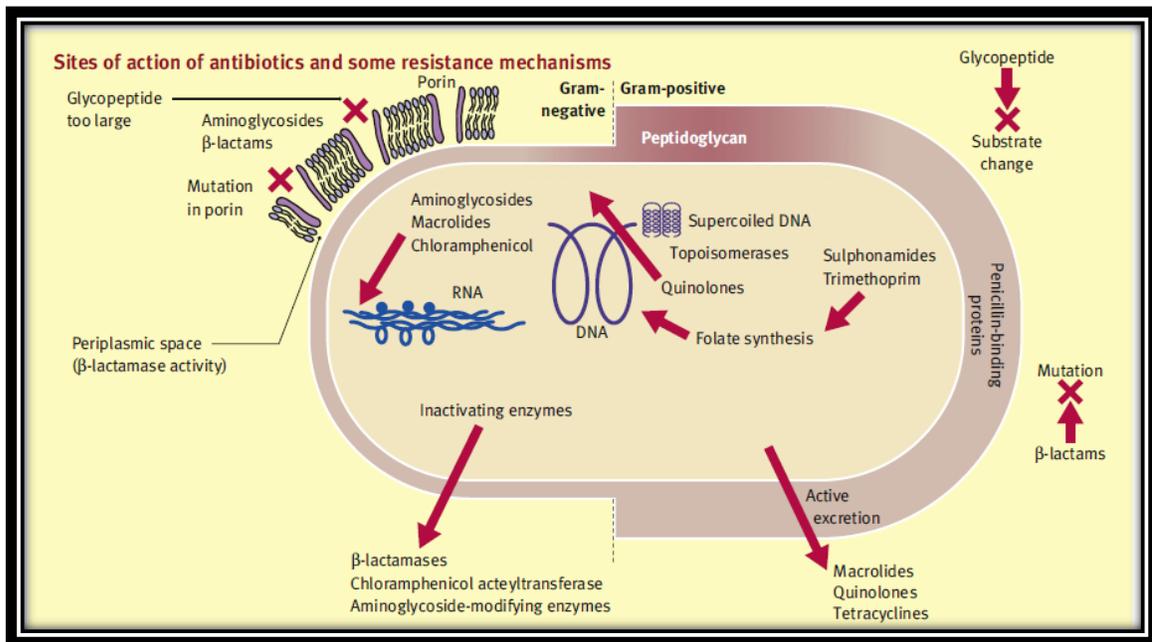


Figura 9. Sitios de acción de los antibióticos y algunos mecanismos de resistencia.

3.4. Métodos de Producción de nuevos antibióticos.

Los antibióticos pueden ser obtenidos por diferentes métodos, químicos, mediante modelado molecular en los que se utilizan como herramientas programas computacionales, donde, basándose en núcleos activos se obtienen moléculas derivadas, estas son obtenidas en la práctica por hemisíntesis o síntesis total para su evaluación biológica (Muñoz DK., 2004).

Desde el punto de vista microbiológico, los Actinomicetos son las principales grupos de bacterias esporuladas productoras de antibióticos aunque también pueden ser

obtenidos a partir de otros microorganismos, tales como los hongos (Wohlleben W et al., 2012).

Los genes que codifican las enzimas para su biosíntesis se organizan normalmente en grupos, que incluyen también la información de resistencia (en el caso de compuestos antibacterianos), regulación, y el transporte. Esto facilita la manipulación de tales vías (obtención de metabolitos secundarios) mediante técnicas de genética molecular (Atta HM., 2015).

Los recientes avances en la secuenciación del ADN y en la química analítica revelaron que la biología sintética ofrece ahora una nueva perspectiva para, generar nuevas vías de síntesis, y por lo tanto nuevos productos, combinando diferentes, etapas biosintéticas procedentes de diferentes bacterias.

El suministro de precursores, que posteriormente se incorporan al producto final, suelen estar organizados de manera modular en la naturaleza y pueden ser explotados directamente para la Biología Sintética (Lima Procópio et al., 2012).

3.5. Resistencia a antibióticos

Hoy en día existe gran dificultad en el tratamiento de cierto tipo de enfermedades, debido a la resistencia que han adquirido las bacterias a los antibióticos, convirtiéndose en un importante problema de salud a nivel mundial, ya que se requieren tratamientos más largos, más complejos, más caros y muchas veces ineficaces (Palacios SGC et al., 2017).

La resistencia a los antibióticos, es un problema del entorno hospitalario asociado con un aumento del número de pacientes, infectando usualmente a pacientes críticamente enfermos e inmunosuprimidos, causando en la comunidad infecciones graves, difíciles de diagnosticar y de tratar (WHO., 2018, Gudiol F., 2010, Finch Roger., 2009, Guillemot D., 1999).

Las bacterias han desarrollado resistencia a los diferentes antibióticos existentes. El tipo más frecuente es adquirido y transmitido horizontalmente por medio de la conjugación de un plásmido (**Figura 10**) (Andersson DI & Hughes D., 2015, Goldstein FW, et al., 1986). En los últimos tiempos esta resistencia ha dado como resultado el desarrollo de cepas bacterianas muy patógenas y resistentes a múltiples fármacos.

3.6 Mecanismo de resistencia antimicrobiana

3.6.1. Causas genéticas de las resistencias a los antimicrobianos

El proceso de replicación del ADN no es completamente seguro. Por término medio, se produce una mutación en un gen concreto en aproximadamente uno de cada 10⁸ bacterias de una población. Si el gen mutado proporciona una ventaja competitiva en términos de supervivencia cuando exista un antimicrobiano, la población natural (con el gen salvaje sensible) morirá o se inhibirá, pero la población mutante sobrevivirá y podrá reemplazar a la población original (Giedraitienė A et al 2011).

Éste es el principio básico que explica la capacidad de los antibióticos para seleccionar bacterias resistentes. Aun así, es interesante resaltar el hallazgo reciente de que algunos antimicrobianos, como las quinolonas, al activar la respuesta de emergencia (SOS), aumentan la tasa de mutación y de ese modo, más bien indirecto, favorecen la aparición de mutantes resistentes, tanto a sí mismos como incluso a otros compuestos. Además, esta respuesta favorece la diseminación horizontal de genes de resistencia (Rodríguez RA, et al., 2013, Calvo J & Martínez L., 2010).

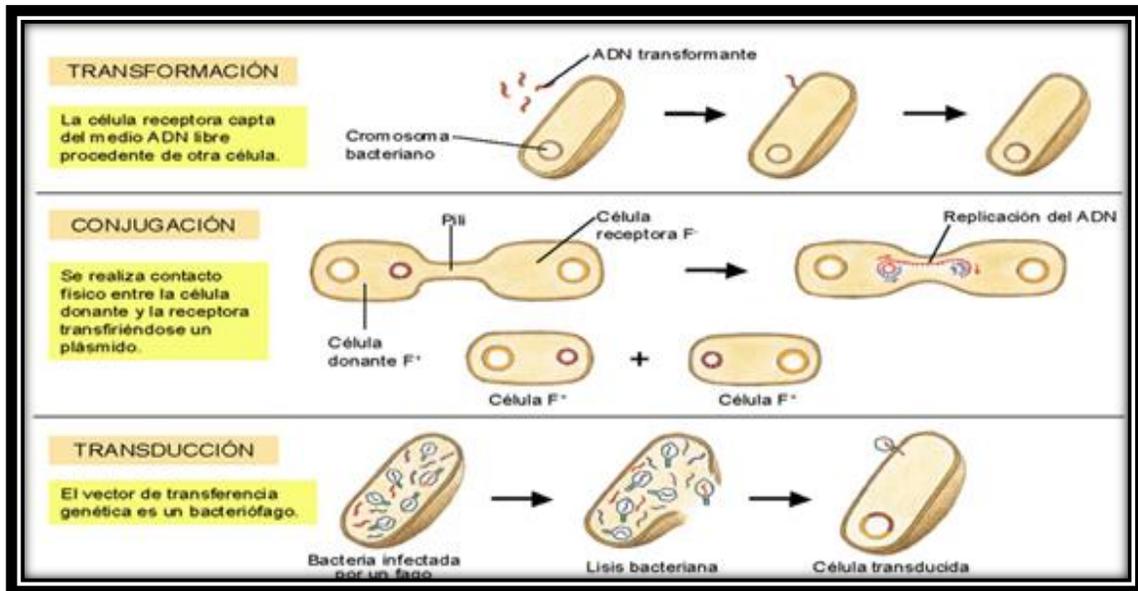


Figura 10. Mecanismos de transferencia genética.

3.6.2. Causas bioquímicas de la resistencia a los antimicrobianos.

La penetración de antimicrobianos a través de la membrana externa de las bacterias gramnegativas puede tener lugar a través del lipopolisacárido o a través de las porinas (canales hidrófilos). La pérdida de una o más porinas o su modificación estructural haciéndolas más estrechas (física o funcionalmente) disminuye la penetración de los antimicrobianos. Estas alteraciones pueden afectar a varios grupos de antimicrobianos hidrófilos, como en el caso de la pérdida de porinas en enterobacterias o a un grupo concreto de compuestos (Tafur JD, et al., 2008).

3.6.3. Impacto producido por resistencia a agentes antimicrobianos (RAM).

Datos emitidos por la OMS (2017) indican que la resistencia a los antibióticos afecta a todos los países y que los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacoresistentes corren mayor riesgo de tener peores resultados clínicos y morir.

Además, de que se incrementan los recursos sanitarios durante su tratamiento, comparados con los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias.

- La RAM pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por bacterias, hongos y virus y parásitos.
- La RAM supone una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial y requiere medidas por parte de todos los sectores del gobierno y la sociedad.
- El éxito de la cirugía mayor y la quimioterapia se vería comprometido en ausencia de antibióticos eficaces.
- La prolongación de la enfermedad, la necesidad de más pruebas y la utilización de fármacos más caros aumentan el costo de la atención sanitaria a los pacientes con infecciones resistentes en comparación con los no resistentes.

3.6.4. Factores que aceleran la aparición y propagación de la RAM.

La RAM es un fenómeno que aparece de forma natural al paso del tiempo (por modificaciones genéticas). Dentro de las causas que han generado y acelerado la RAM, se encuentran el uso indiscriminado e inapropiado de los antimicrobianos tanto en las personas como en los animales (su administración como estimulantes del crecimiento o para prevenir enfermedades), el mal uso en las clínicas en pacientes hospitalizados, así como su administración sin la supervisión de un profesional.

Los microorganismos resistentes a los antimicrobianos están presentes en las personas, los animales y el medio ambiente (agua, suelo y aire). Estos pueden transmitirse persona-persona o persona-animal, inclusive a través de la alimentación. El mal control de las infecciones, las condiciones sanitarias deficientes y la manipulación y uso inadecuado de los alimentos fomentan la propagación de la RAM y en la industria alimentaria es el más grande factor que conduce a la resistencia a los antibióticos (Viksveen P., 2003, Tünger Ö et al., 2000).

En los últimos años, el número de nuevos antibióticos autorizados para uso humano en diferentes partes del mundo ha ido disminuyendo. Además, ha disminuido la investigación y desarrollo para la innovación en el campo del descubrimiento de

nuevos antimicrobianos. Por todos estos motivos se hace necesario la búsqueda de diferentes fuentes de obtención de compuestos con actividad antimicrobiana tales como los minerales de silicato, como un sustituto de los antibióticos en las terapias (Wei JC, et al., 2014).

3.7. Generalidades de los microorganismos utilizados

Las infecciones bacterianas son altamente prevalentes en pacientes hospitalizados, especialmente en las unidades de cuidados intensivos. La multiresistencia representa un reto terapéutico que deja pocas posibilidades en el tratamiento de estas infecciones, ya que los mecanismos de defensa frente a los antibióticos están en constante evolución.

En el 2016 la SUIVE/DGE/Secretaría de Salud/Estados Unidos Mexicanos reportaron que en México se han registrado 21 800 casos de infecciones nosocomiales, así como, más de 20 millones de casos de enfermedades respiratorias agudas producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y más de 4.5 millones de casos de enfermedades gastrointestinales, causadas principalmente por *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*.

➤ *Escherichia coli* (*E. coli*):

Es un bacilo gramnegativo, pertenece a la familia de las enterobacterias que se encuentra en el tracto gastrointestinal de humanos y animales de sangre caliente, con dimensiones de, diámetro 1.1 a 1.5 μm , largo 2.0 a 6.0 μm (Nerino Allocati, et al 2016).

La mayoría de las cepas son inofensivas, como comensal, vive en una asociación mutuamente benéfica con los huéspedes, y rara vez causa enfermedades. Sin embargo, también es uno de los patógenos humanos y animales más comunes ya que es responsable de una amplia gama de enfermedades, tales como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden

causar graves enfermedades. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas (WHO., 2017).

E. coli productora de toxina Shiga, llamada así por su semejanza con las producidas por *Shigella dysenteriae*, puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4.4, y en alimentos con una actividad acuosa (a_w) de 0.95 (Nataro JP et al., 2011). Estas se destruyen durante la cocción de los alimentos a una temperatura de 70 °C o más. *E. coli* O157: H7 es el serotipo más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos.

Su resistencia a una de las clases de medicamentos más utilizadas en el tratamiento de las infecciones urinarias (las fluoroquinolonas) está muy generalizada. En el mundo hay países en los que este tratamiento es ineficaz en más de la mitad de los pacientes.

➤ *Salmonella typhimurium*:

El género *Salmonella* fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith, recibiendo el nombre por su jefe David Salmon. Estas se consideran bacterias entéricas, gram negativas, que se alojan en el intestino, y su taxonomía es compleja. Su morfología microscópica es de bacilos, o cilindros con puntas redondeadas, tiene un diámetro 0.7 a 1.5 μm largo 2.0 a 5.0 μm .

Actualmente, el género consiste de una sola especie, que ha sido denominada *Salmonella enterica*. Ésta, a su vez, está formada por siete subespecies, dependiendo de su capacidad para realizar diferentes reacciones bioquímicas. Esta subdivisión ha sido apoyada por varios

métodos de hibridación ADN y métodos serológicos (Valenzuela JR et al., 2016).

➤ *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*):

Es una bacteria gramnegativa, perteneciente a la rama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las Enterobacterias, tiene un diámetro 0.4 a 0.5 μm largo 1.5 a 3.0 μm (Young LJ, et al., 2017). Dentro del género *Pseudomonas* (*P.*) podemos citar algunas otras especies como: *fluorescens*, *putida*, *syringae* y *alcaligenes*.

P. aeruginosa, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas prístinas y contaminadas, así como de plantas y animales (Walkty A, et al., 2017). Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana* y a invertebrados como *Caenorhabditis elegans*. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer (más de cien), capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón.

➤ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*):

Es el agente etiológico responsable de la producción de diversas patologías, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia, endocarditis, infección del sistema nervioso central y del tracto genitourinario, Tiene un diámetro 0.8 a 1.5.

Por su ubicuidad y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se confiere especial énfasis a su aislamiento y estudio

epidemiológico considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales (Paz REL, et al 2008).

La resistencia a los fármacos de primera línea para el tratamiento de las infecciones (causa frecuente de infecciones graves en los centros sanitarios y en la comunidad) es generalizada. Se calcula que los pacientes con infecciones por *S. aureus* resistente a la meticilina tienen una probabilidad de morir un 64% mayor que los pacientes con infecciones no resistentes.

En los años 50's con la introducción de la penicilina y sulfonamidas fueron desplazados por los *estafilococos* como agentes principales de infección intrahospitalaria. Posteriormente en los años 70's, predominaron los bacilos Gram negativos, situación que se revirtió con la utilización de aminoglucósidos y cefalosporinas. El uso de catéteres endovenosos y terapia inmunosupresora favoreció la reaparición de infecciones por cocáceas Gram positivas, especialmente *S. aureus* resistente a meticilina

➤ *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*):

Es una bacteria gram negativa, tiene un diámetro de 0.3 a 1.0 μm largo 0.6 a 6.0 μm , pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, es un patógeno oportunista, asociado a infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica.

Las cepas de *K. pneumoniae* tienen el potencial para causar morbilidad y mortalidad, particularmente en las unidades de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos, dentro de los tratamientos utilizados para éste tipo de infecciones se encuentran los antibióticos carbapenémicos, sin embargo, datos emitidos por la OMS en el 2017 indican que debido a la resistencia, en algunos países los antibióticos carbapenémicos ya no son

eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*.

➤ *Shigella flexneri*

El género *Shigella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*; está constituido por bacilos cortos gramnegativos sin agrupación, miden de 0.3 a 1.0 μ de diámetro y de 1.0 a 6.0 μ de largo; son inmóviles, no esporulan, no presentan cápsula y su DNA alcanza una similitud de hasta 70-75% en comparación con el de *Escherichia coli*, lo cual indica una gran relación con esta última especie.

En el 2017 la OMS declaró que se ha detectado resistencia a la colistina en varios países y regiones, la cual es usada como último recurso para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales por enterobacteriáceas resistentes a los antibióticos carbapenémicos, lo que hace que las infecciones por estas bacterias dejen de ser tratables.

3.8 Arcillas

Se consideran como un mineral natural complejo constituido, principalmente, por una mezcla de aluminosilicatos cristalinos, a los que se denominan minerales arcillosos, y de otros silicatos y minerales de hierro, calcio, titanio, etc., acompañados frecuentemente por materia orgánica. Actualmente se conoce que los minerales arcillosos son numerosos y difieren entre sí por su forma, estructura, apilamiento de capas y por la simetría que presenta su red cristalina (Muñoz MRA, et al 2007).

3.8.1 Historia

Las arcillas han sido objeto de considerables estudios por el hombre desde los tiempos más remotos, ya que se trata de un mineral ligado a la arquitectura y la cerámica. El conocimiento de su constitución y la sistematización de sus propiedades comenzaron lentamente en el siglo XVIII, pero sólo a mediados del

siglo XIX con el descubrimiento del microscopio petrográfico es cuando inicia un decisivo progreso en el conocimiento de los minerales de arcilla.

El progreso ha sido bastante difícil ya que son un conjunto de minerales, los cuales cada uno posee propiedades características en cuanto a su constitución, composición química, etc., pero ninguno de estos conocimientos en particular, puede dar una constante de caracterización; esto es, ni el análisis químico, ni su cristalinidad, etc. La composición química era completamente variable y la estructura cristalina no fue considerada en los primeros tiempos ya que se suponía que eran cuerpos amorfos. (Klein C, et al 1996).

El concepto de “arcilla” hacia 1920 era que se trataba de un coloide, o un gel, semejante a la caolinita. En 1923 Hadding en Suecia y Rinne, en 1924 en Alemania, publicaron los primeros análisis de difracción de rayos X en arcillas.

En 1924, en el servicio Geológico de USA, Ross y Shannon comenzaron a estudiar un cuerpo que no era arcilla pura: la bentonita, ya que podía tomarse como una roca también. Mediante cuidadosos análisis químicos y estudios ópticos mediante el microscopio petrográfico, llegaron a la conclusión que sus componentes eran esencialmente cristalinos. En el primer congreso de la ciencia del suelo, Ross presentó estos trabajos y constituyó una gran novedad saber que en la arcilla existían minerales cristalinos. Ross y Kerr, en 1931, dan a conocer sus investigaciones aplicando la difracción de rayos X con lo cual se dio un notable impulso a estos trabajos.

A los pocos años el interés había superado todas las expectativas y existían enormes instalaciones en Gante, Bélgica, destinadas al estudio de estos problemas. Posteriormente en 1930 se van introduciendo sucesivamente los distintos grupos de minerales. Históricamente le corresponde el primer lugar a la caolinita y en este grupo, Mehmel introduce a la haloisita. Grim, por su parte entre 1930-1937 establece el conjunto de los minerales micáceos y los llama illitas.

A partir de aquí han sido notables las contribuciones de Pauling, quien determinó las dimensiones del retículo y la estructura del motivo cristalino de las cloritas; Hendricks, en sus trabajos sobre el intercambio de cationes; Kelley, quien estudió sistemáticamente los minerales de arcilla y los diferentes grupos de suelos y en 1934, Von Borris y Ruska desarrollan el microscopio electrónico y Eitel lo aplica a las arcillas en 1936.

Las posibilidades actuales de la mineralogía de las arcillas han crecido enormemente. Toda una tecnología de análisis altamente refinada, permite ir resolviendo problemas que hace poco tiempo parecían no tener solución. Dado que a la difracción de rayos X se ha sumado la espectrografía de rayos X, la difracción de electrones, la microdifracción, la microscopia electrónica, espectrofotometría infrarroja de alta resolución, así como el análisis térmico de alta precisión. (Besoain E., 1970).

3.8.2 Clasificación

Las arcillas se pueden clasificar considerando su armazón estructural como un polímero inorgánico constituido por dos estructuras monoméricas. Una de ellas es un tetraedro de $[\text{SiO}_4]^{4-}$ abreviado como "T" y la otra un octaedro de alúmina $[\text{AlO}_3(\text{OH})_3]^{6-}$ abreviado como "O". Cuando un conjunto de tetraedros comparte entre sí tres vértices formando una hoja continua, se obtendrá una hoja tetraédrica, mientras que se obtendrá una hoja octaédrica cuando dichos octaedros estén en contacto unos con otros conformando una cara triangular. Además, cuando el catión octaédrico es de tipo Al^{3+} o Fe^{3+} el balance de carga dentro del retículo del mineral arcilloso requiere que sólo dos de cada tres posiciones octaédricas estén llenas y la hoja se denomina dioctaédrica. Por el contrario, cuando el catión predominante es de tipo Mg^{2+} o Fe^{2+} todas las posiciones octaédricas presentan un balance de cargas completo y la hoja se denomina trioctaédrica; resultando siete categorías las cuales se observan en la **Tabla 1**. (Bernal I, et al., 2003, Rodríguez LD & Torrecillas R., 2002, Konta J., 1995).

Tabla 1. Clasificación de la familia de las arcillas (Di: dioctaédrico; Tr: trioctaédrico) en relación con su mineralogía correspondiente.

Tipo de capa	Grupo (X= carga)	Subgrupo	Minerales
1:1	Caolin/serpentina X≈0	Caolines (Di) Serpentinas (Tr)	Caolinita, Haloisita, Crisotilo, etc.
2:1	Talco/pirofilita X≈0	Talcos (Tr) Pirofilitas (Di)	Talco, pirofilita
	Esmectita X≈0.2-0.6	Montmorillonitas(Tr) Saponitas (Di)	Montmorillonita saponita
	Vermiculita X≈0.6-0.9	Vermiculitas dioctaédricas y trioctaédricas	Vermiculita dioctaédrica Vermiculita trioctaédrica
	Miica X≈1-2	Micas y micas frágiles dioctaédricas y trioctaédricas	Biotita, moscovita, clintonita
2:1:1	Clorita X≈Variable	Cloritas dioctaédrica y trioctaédricas	Clinocloro, chamosita, sudoita, nimita
2:1 Capas invertidas	Sepiolita/ palygorskita	Sepiolitas Palygorskitas	Sepiolita, loughlinita palygorskita

3.9. Haloisita

3.9.1 Definición

La haloisita está definida como una arcilla tipo 1:1 dioctaédrico con una amplia distribución en suelos tropicales muy húmedos y regiones subtropicales, se forma por la meteorización de varios tipos de rocas ígneas y no ígneas. Puede ser considerada como un polimorfo hidratado de la caolinita con láminas curvadas que es capaz de ubicar moléculas de agua en el espaciado interlamilar, cuya fórmula general es la siguiente $\text{Si}_2\text{Al}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 11**) (Carrillo AM et al., 2014).

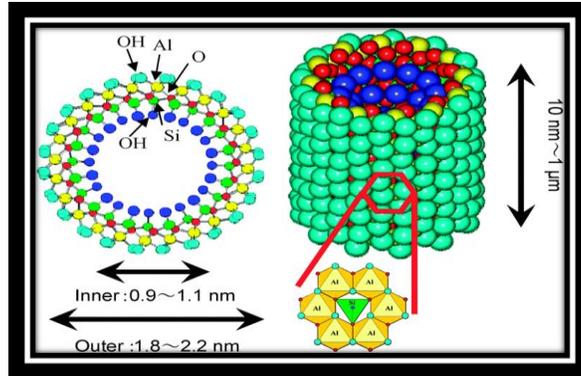


Figura 11. Representación de la estructura de los nanotubos de haloisita.

3.9.2 Estructura y morfología.

Puede adoptar diferentes morfologías como esferas, tubos placas o listones (**Figura 12**). La forma tubular alargada está relativamente mejor cristalizada, por lo que es la morfología más comúnmente encontrada generando una estructura con cavidad nanotubular (Pandey G, et al., 2017).



Figura 12. Imagen de haloisita tomada con Microscopio de Fuerza Atómica de Amplitud Modulada (AM-AFM) acoplada a espectroscopia RAMAN, sistema N8 NEOS SENTERRA, ESM-IPN.

La forma cilíndrica a causa de la curvatura de las láminas 1:1, es ocasionada por un desplazamiento en la alineación de la capa tetraédrica de sílice unida a la capa octaédrica de alúmina. Las caras interior y exterior de las paredes del túbulo llevan

normalmente una carga negativa neta, que funciona como un anión polivalente, mientras que sus bordes son anfóteros con cargas negativas a pH alto y carga positiva a un pH bajo, así mismo, los nanotubos de haloisita poseen una estructura altamente porosa y una gran superficie específica, dándole propiedades adsorbentes específicas (Tsoufis T, et al., 2017).

3.9.3 Usos

La haloisita en general es particularmente apreciada para su uso en la fabricación de cerámica de color blanco de alta calidad, ya que contiene un bajo contenido de cationes de hierro y otros, que tienden a reemplazar los iones de aluminio en la capa de gibsita, lo que provoca una decoloración en estos materiales. Se ha investigado también en la industria automotriz para formar el material soporte en convertidores catalíticos de sistemas de escape. Sus nuevas propiedades físicas y químicas, derivadas de la versatilidad estructural que involucra una doble capa (aluminosilicatos), generan oportunidades para aplicaciones avanzadas en los campos de la electrónica, la catálisis heterogénea, materiales biológicos y sistemas funcionales; particularmente en catálisis heterogénea, la haloisita es un material utilizado como soporte catalítico debido a las características químicas de la doble capa de tipo sílica-alúmina que conforma el material y a sus propiedades texturales.

3.10 Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

El principal objetivo de estas pruebas *in vitro* es el proporcionar una guía para el manejo terapéutico de enfermedades infecciosas a través de la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a diferentes compuestos antimicrobianos.

Debido a que es imposible predecir la susceptibilidad de una bacteria responsable de una determinada infección a los antimicrobianos, las pruebas efectuadas en el laboratorio microbiológico se convierten en un instrumento esencial para el estudio de la sensibilidad de un microorganismo a un agente antimicrobiano.

Existen diferentes técnicas de laboratorio que pueden ser utilizadas para evaluar *in vitro* la resistencia de las bacterias a diferentes agentes antimicrobianos. Entre estas técnicas, la prueba de susceptibilidad de difusión en disco (método de Kirby-Bauer de difusión en agar) es la más común, así como las pruebas de macrodilución en caldo y macrodilución en agar.

3.10.1 Método de Kirby Bauer o método de difusión en agar

Una variedad de métodos pueden ser utilizados para medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos a los antimicrobianos, el de uso más común en los laboratorios de microbiología es la técnica de *difusión en agar* estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido y algunos de crecimiento lento (Cona T., 2002).

El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de antimicrobiano en un reservorio (disco de papel, pastillas con fármacos en estado cristalino, etc.) en la superficie del agar sobre la cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en cuestión; se formará así, por difusión, un gradiente de concentración de antimicrobiano alrededor del reservorio y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar Mueller Hinton, de su composición, del pH, de la capacidad de difusión del compuesto o fármaco en ese medio, de la temperatura, de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, del tamaño del inóculo, la fase de crecimiento de la bacteria, etc. Todas estas son las variables más importantes que afectan el resultado del antibiograma.

Una vez colocado el disco en la superficie del agar, la difusión del antibiótico se inicia de forma instantánea y sigue hasta alcanzarse un gradiente continuo de

concentraciones alrededor del reservorio. Este gradiente se alcanza aproximadamente a las 6 hrs. El tamaño de la zona de inhibición dependerá del equilibrio entre la difusión del antibiótico y la velocidad de crecimiento del microorganismo. Las recomendaciones del Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, 2002) son: colocar los discos dentro de los 15 minutos de inoculada la placa y proceder a la incubación de la misma dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos. Cualquier variación en estos tiempos ocasionará un desplazamiento del equilibrio antes mencionado que se traduce en errores en el tamaño de la zona de inhibición. Como la difusión del disco comienza instantáneamente después de apoyado sobre el agar, estos nunca deben levantarse para cambiarlos de lugar en el antibiograma porque seguramente ya no tendrán la carga de antibiótico o del compuesto original en estudio (Herrera ML., 1999).

3.10.2 Indicaciones y limitaciones

El antibiograma está indicado cuando se aísla una bacteria responsable de un proceso infeccioso, especialmente si se sabe que este tipo de bacteria puede presentar resistencia a los antimicrobianos más habituales. Estas pruebas de sensibilidad también son útiles en estudios epidemiológicos ya que el resultado del antibiograma puede ser considerado como el primer marcador epidemiológico de que se dispone.

El método de difusión en agar es fácil de realizar, rápido y barato. Es una metodología aplicable a una amplia variedad de bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido como *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, etc. Además, con ligeras modificaciones, puede ser aplicado a *Haemophilus spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus spp.* (Perilla MJ., 2004)

3.10.3 Método de macrodilución en agar

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar 18 a 24 h a 35 ± 05 . °C y se determina el porcentaje de sensibilidad y resistencia del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. (Derita M, et al 2017).

3.10.4 Indicaciones y limitaciones

Los métodos de dilución se consideran de referencia para la determinación cuantitativa de la actividad de los antimicrobianos. Son los métodos indicados cuando, además de la actividad inhibitoria, se quiere determinar también la actividad bactericida. (NCCLS, 2002)

La gran cantidad de variables (dependientes del microorganismo, del medio de cultivo del inóculo) que influyen en estos métodos son responsables de oscilaciones en el resultado final, por lo que para su correcta evaluación es necesario que se realicen de forma estandarizada.

En comparación con los métodos de difusión, los métodos de dilución son técnicamente más complejos y casi siempre más caros, en particular cuando se utilizan paneles comerciales de microdilución.

4. HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

4.1. Considerando que la estructura de haloisita es una doble capa formada por aluminosilicatos y que esta adopta una forma nanotubular, la cual le confiere una alta propiedad adsorbente, entonces al probarla en diferentes grupos de bacterias se espera que presente actividad antimicrobiana.

4.2. Si las haloisitas se caracterizan por ser insolubles en agua y en disolventes no polares, entonces al probar dos diferentes métodos de evaluación antibacteriana se espera que el de macrodilución comparado con el de Kirby-Bauer permita observar de manera más clara la inhibición del crecimiento bacteriano.

5. METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

Los medios de cultivo utilizados en este estudio fueron marca Becton Dickinson®, mientras que los reactivos y la nanoarcilla utilizados fueron marca Sigma Aldrich®, los antibióticos usados como controles positivos fueron unidiscos marca BIO-RAD® a diferentes concentraciones, ampicilina (AMP) 10 µg, amikacina (AKN) 30 µg, tetraciclina (TET) 30 µg y cloranfenicol (CHL) 30 µg.

Las cepas en estudio fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 *Shigella flexneri* ATCC 12022. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Se colocaron diferentes cantidades de haloisita (2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 µg), los análisis se realizaron en cinco repeticiones (n=5), la actividad antibacteriana de la haloisitas fue determinada por dos métodos de Kirby Bauer o método de difusión en gar descrito por Perilla MJ, et al., 2004, y por el método de macrodilución en agar descrito por Malbrán GC., 2012.

Cálculos

La concentración efectiva cincuenta [CE₅₀] de la haloisita para cada uno de los microorganismos probados y los controles positivos empleados se calcularon a través de la construcción de curvas-concentración-respuesta graduales.

Análisis estadístico.

Todos los datos se presentan como la media +/- del error estándar (n=7), la actividad antibacteriana fue calculada usando una ANOVA bifactorial, seguida por una prueba post hoc de Student Newman-Keuls, las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el programa Sigma Plot 13 (Jandel Corp., SPSS Inc., San Rafael, CA, USA).

5.1 Preparación de medios de cultivo

La preparación de los medios de cultivo es específica para cada uno de ellos y de acuerdo a las indicaciones dadas por el proveedor.

5.1.1 Agar nutritivo

Se pesaron 64 g de medio de cultivo liofilizado/L, se hidrató con el 80% del volumen total a preparar y una vez hidratado se completó el volumen final a preparar, se calentó lentamente hasta que se clarificó el medio, se esterilizó a una presión de 15 psi por 15 min, una vez que se terminó de esterilizar se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C y se depositó en las cajas Petri formando una capa de aproximadamente 7 mm de grosor, se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que se solidificara, una vez solidificado se resguardaron en refrigeración a una temperatura de aproximadamente 5 °C.

5.1.2 Agar Mueller Hinton

Para la preparación del medio de agar Mueller Hinton se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor el cual nos indica que para preparar un litro de agar Mueller Hinton es necesario pesar 38 g del medio liofilizado e hidratarlo en el 80% del volumen a preparar de agua destilada, una vez hidratado se completó el volumen a preparar y se calentó lentamente hasta que se clarificó el medio, y una vez clarificado se tapó el matraz y se esterilizó a 15 psi por 15 min, transcurrido éste tiempo se dejó enfriar aproximadamente a 50 °C y se depositó en las cajas Petri formando una capa de aproximadamente 7 mm de grosor. Enfriar hasta solidificar a temperatura ambiente y se resguardaron en refrigeración a una temperatura de aproximadamente 5 °C.

5.1.3 Caldo nutritivo.

Para la preparación del caldo nutritivo se pesaron 26 g del polvo por cada litro de medio a preparar, se disolvió y colocó en tubos con tapón de rosca 5 mL de medio, se esterilizó 15 psi por 15 min, se enfriaron y mantuvieron a temperatura ambiente.

5.2 Activación de las cepas en estudio

La activación de las cepas se realizó tomando una pequeña muestra del liofilizado con un asa bacteriológica estéril, posteriormente esta se introdujo en un tubo de ensaye que contiene el caldo nutritivo, y se depositó la muestra del liofilizado en un tubo de ensaye, se esterilizó el asa bacteriológica en el mechero calentándola al rojo vivo, se incubó a 37 ± 1 °C durante 24 horas, una vez transcurrido el tiempo de incubación, con un asa bacteriológica se tomó una pequeña muestra del tubo anterior y se inoculó una placa de agar nutritivo por medio de la técnica de estría cruzada, para su utilización en la siguientes etapa.

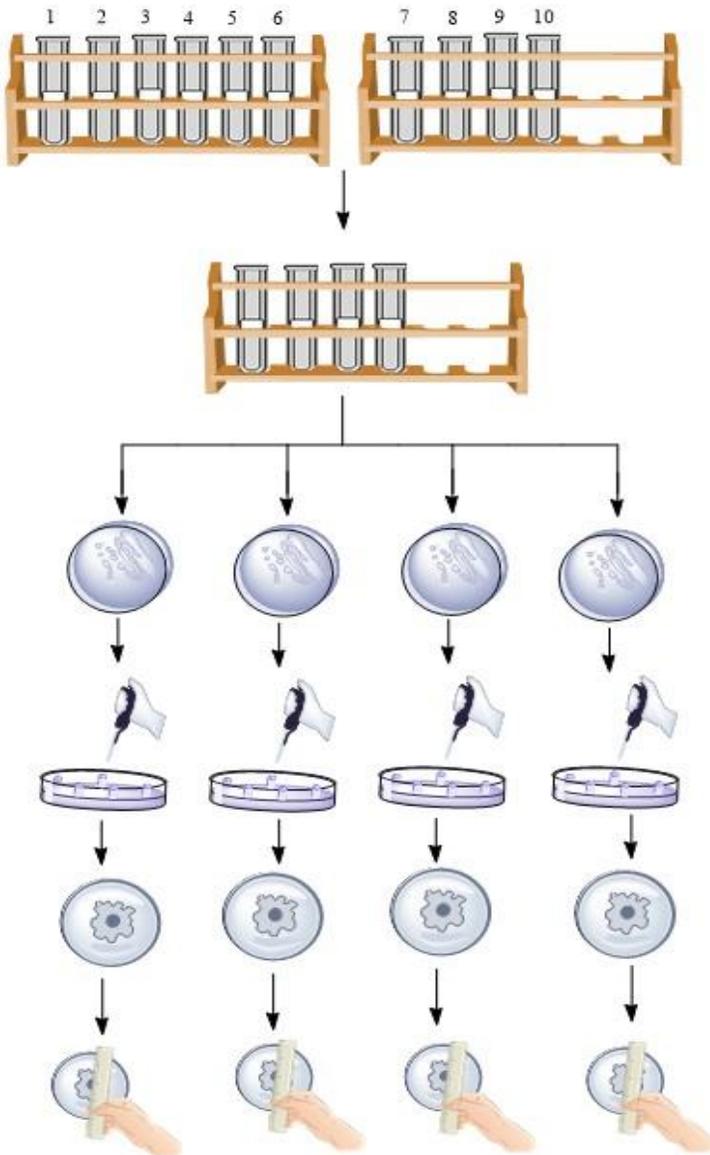
5.3 Ajuste de la turbidez a la escala 5 de McFarland

Las cepas recién activadas (12 a 24 horas) se suspendieron en tubos con solución salina fisiológica estéril hasta alcanzar la turbidez equivalente al estándar 5 de la escala de McFarland (1.5×10^9 UFC/mL), este ajuste se realizó, sosteniendo la suspensión en estudio y el estándar de 5 de la escala de McFarland frente a una luz blanca, contra un fondo blanco, hasta igualar la turbidez.

5.4 Método de Kirby Bauer o método de difusión en agar

Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión del tubo 5, se eliminó el exceso de suspensión presionando y rotando el hisopo contra la pared del tubo, luego con el hisopo se inocularon las placas de medio agar Mueller Hinton en toda la superficie rotando la placa con un giro de 60 grados entre cada inoculación, una vez hecho esto se dejó secar el inóculo durante 2 min y se colocaron discos de celulosa en las placas inoculadas, y en cada uno de estos discos se agregaron 25 µL para alcanzar las cantidades de 2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 µg una vez colocada la haloisita se dejaron reposara las placas a temperatura ambiente para que se adsorbiera la haloisita (aproximadamente 5 min) se procedió a incubar durante 24 horas a 37 ± 0.5 °C en posición invertida, transcurrido este tiempo se midieron los diámetros de los halos de inhibición en las cajas en las que se formaron, y registrando las dimensiones de dichos halos. En el **Esquema 2** se resume la metodología descrita

Esquema 2. Método de Kirby-Bauer (difusión en agar).



Ajustar las diferentes cepas de los microorganismos en estudio a una turbidez equivalente al tubo 5 del Nefelómetro de McFarland (1.5×10^9 UFC/mL)

Inocular las placas de medio agar Mueller Hinton con los microorganismos en estudio.

Colocar la haloisita a diferentes cantidades 2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 μg . en cada uno de los discos

Incubar por 24 hrs a 34 ± 1 °C

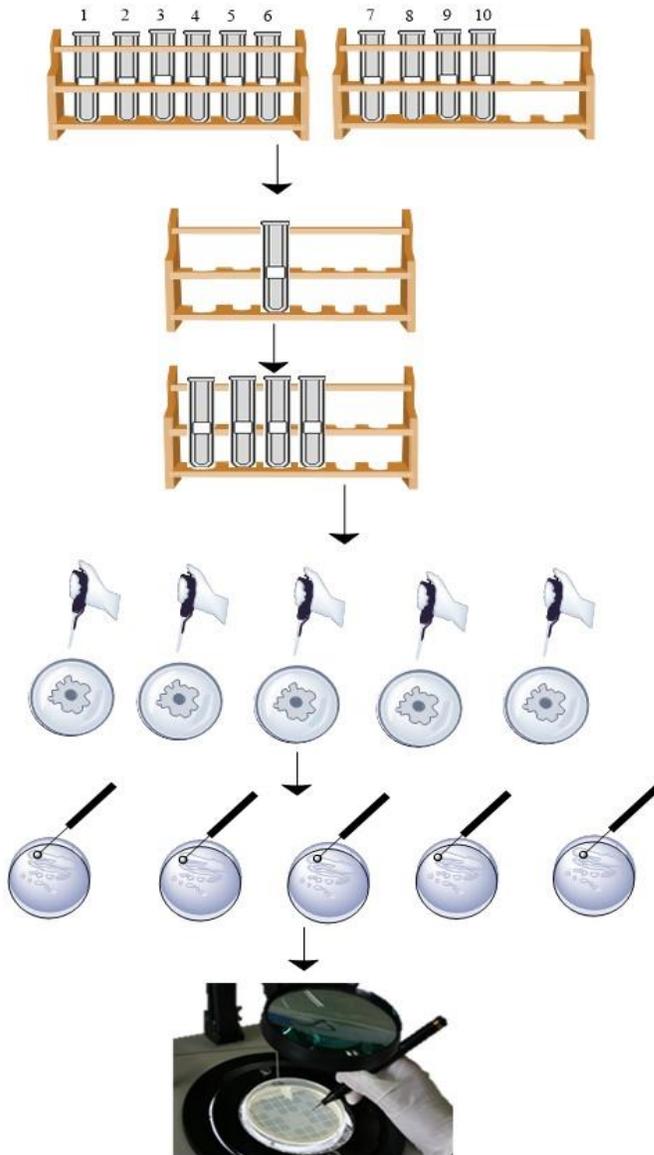
Registrar el diámetro de los halos formados

5.5 Método de macrodilución en agar

La preparación del medio de cultivo que se empleó durante esta metodología se realizó de la misma forma en que se describe, una vez que el agar Mueller Hinton se encontraba fundido se adicionaron las diferentes concentraciones de haloisita hasta alcanzar las cantidades deseadas las cuales fueron de 2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 µg en cada una de las placas, esta mezcla agar-haloisita se esterilizó a 15 psi durante 15 min, una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzara aproximadamente 60°C y se depositó en cajas Petri con una profundidad de 4.0-5.0 mm, posteriormente se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se colocaron en la incubadora a 37 ± 0.5 °C durante 12 horas para comprobar la esterilidad.

Para esta prueba se utilizaron las cepas mencionadas con anterioridad, se activaron y se ajustaron al tubo 5 de la escala de McFarland y se realizaron las siguientes diluciones, de la misma forma descrita con anterioridad. Una vez ajustadas las cepas se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-12} , posteriormente con una pipeta automática se tomó 0.1 ml de la dilución de 10^{-12} y por sembrado masivo se esparció la muestra en toda la superficie de la placa. Esto se realizó por triplicado para cada una de las cepas. Una vez inoculadas las placas incubaron en posición invertida durante 24 horas a 37 ± 0.5 °C. **Esquema 3.**

Esquema 3. Método de macrodilución en agar.



Ajustar las diferentes cepas de los microorganismos a una turbidez equivalente al tubo 5 del Nefelómetro de McFarland (1.5×10^9 UFC/mL)

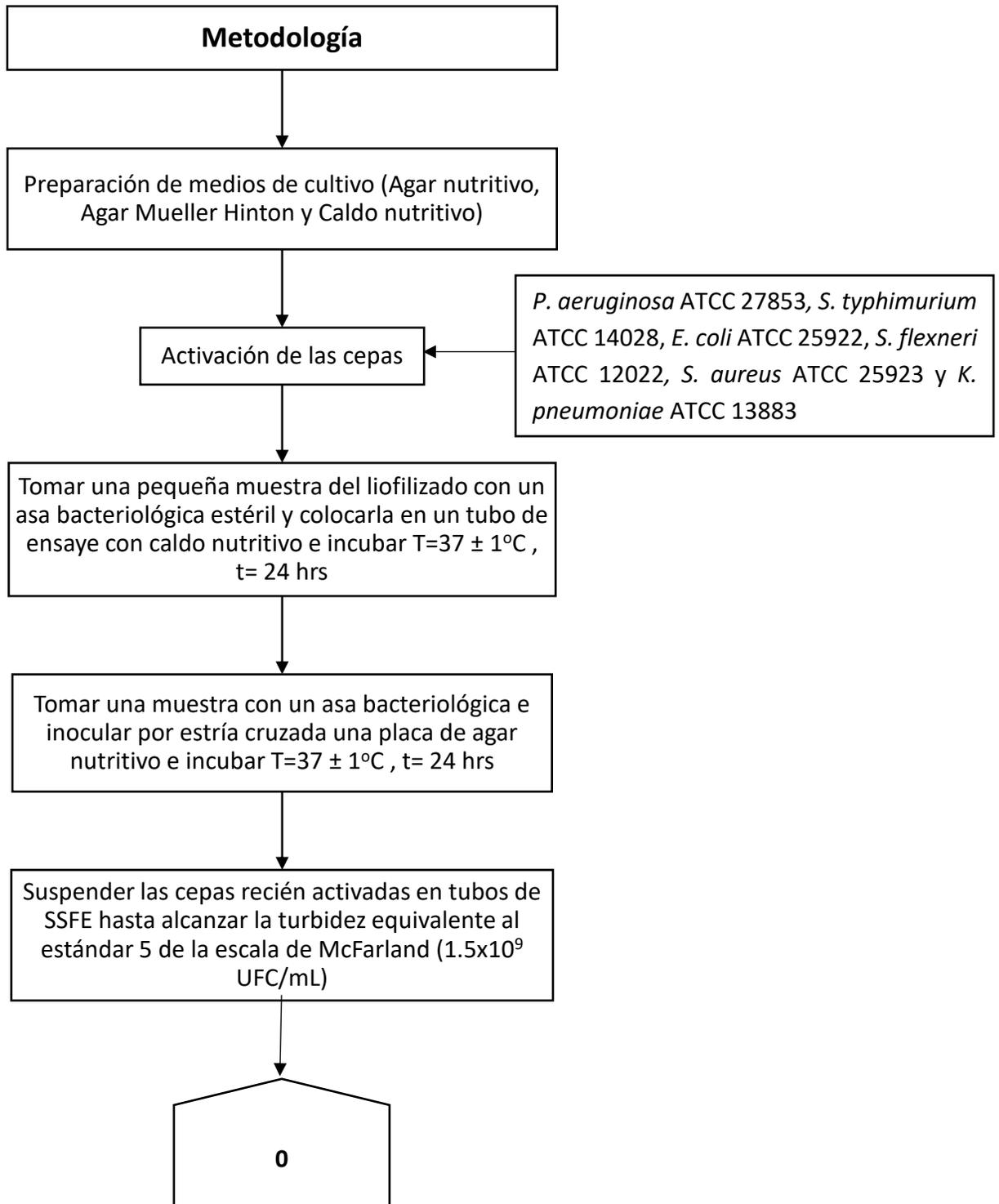
Realizar diluciones seriadas hasta 1×10^{-12}

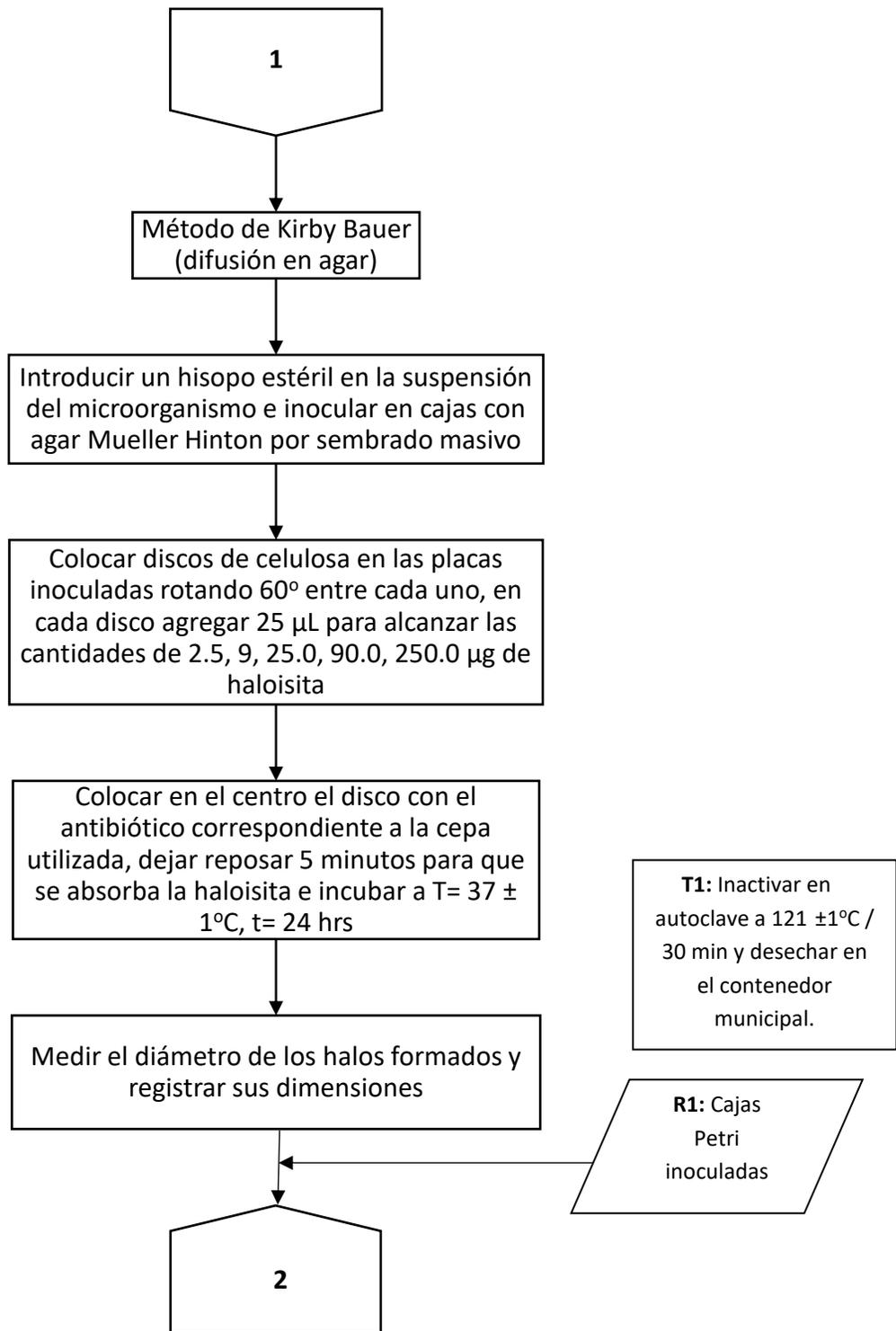
Las placas con medio de cultivo agar Mueller Hinton y diferente cantidad de haloisita (2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 μ L), se Inocularon con 0.1 mL de la dilución 1×10^{-12}

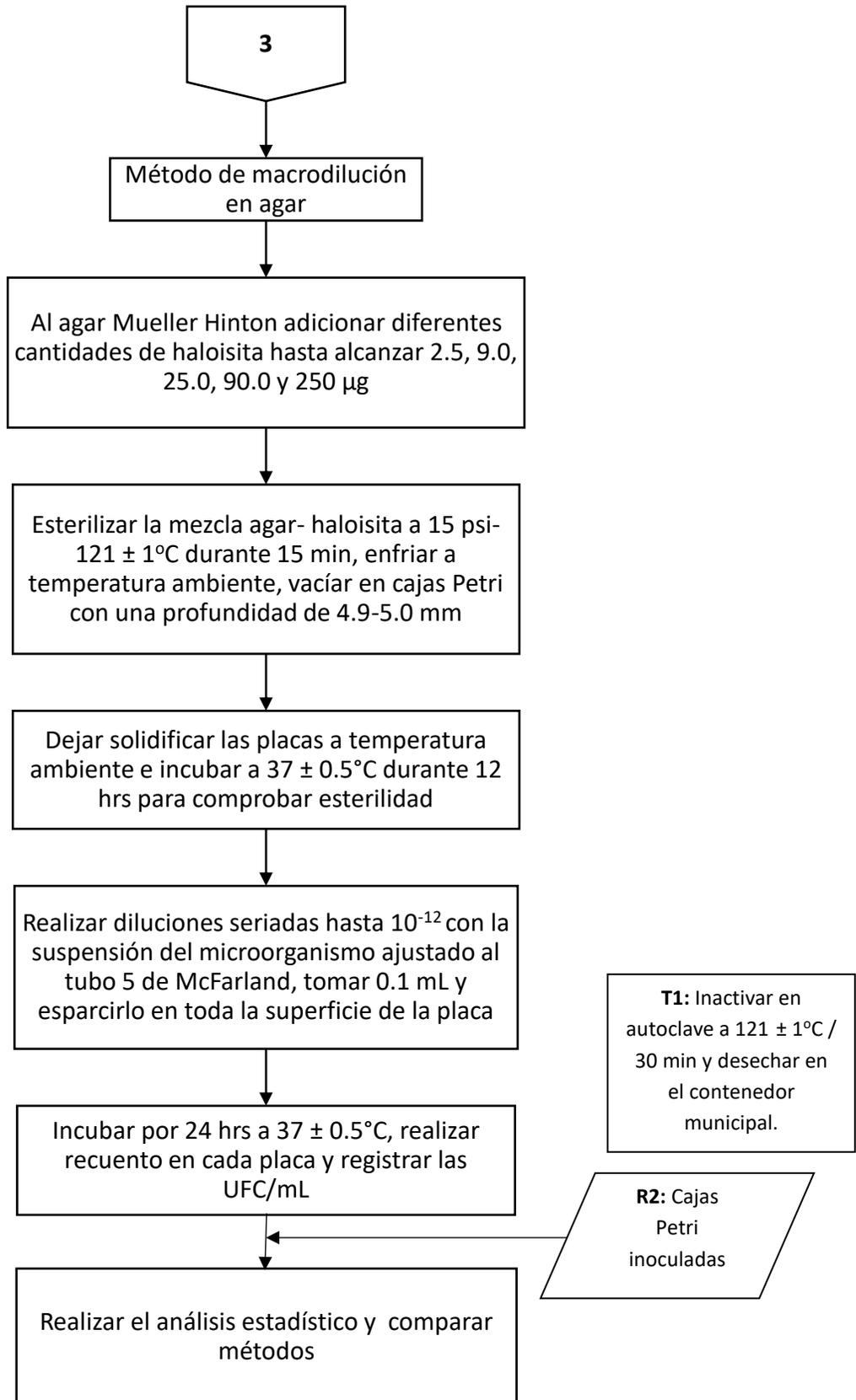
Incubar por 24 hrs a $34 \pm 0.5^\circ\text{C}$

Realizar un recuento de las unidades formadoras de colonias en cada una de las placas y registrar los resultados en UFC/mL.

5.6 Diagrama de flujo







6. RESULTADOS

6.1 Resultados de la actividad antimicrobiana de la haloisita por el método de Kirby Bauer.

A continuación, se presentan los cálculos de la actividad antimicrobiana expresada como [CE]₅₀, para cada microorganismo en estudio (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883). Las cantidades de haloisita utilizadas en todos los experimentos fueron: (2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 µg), mientras que los antibióticos usados como controles positivos fueron diferentes de acuerdo a la bacteria analizada.

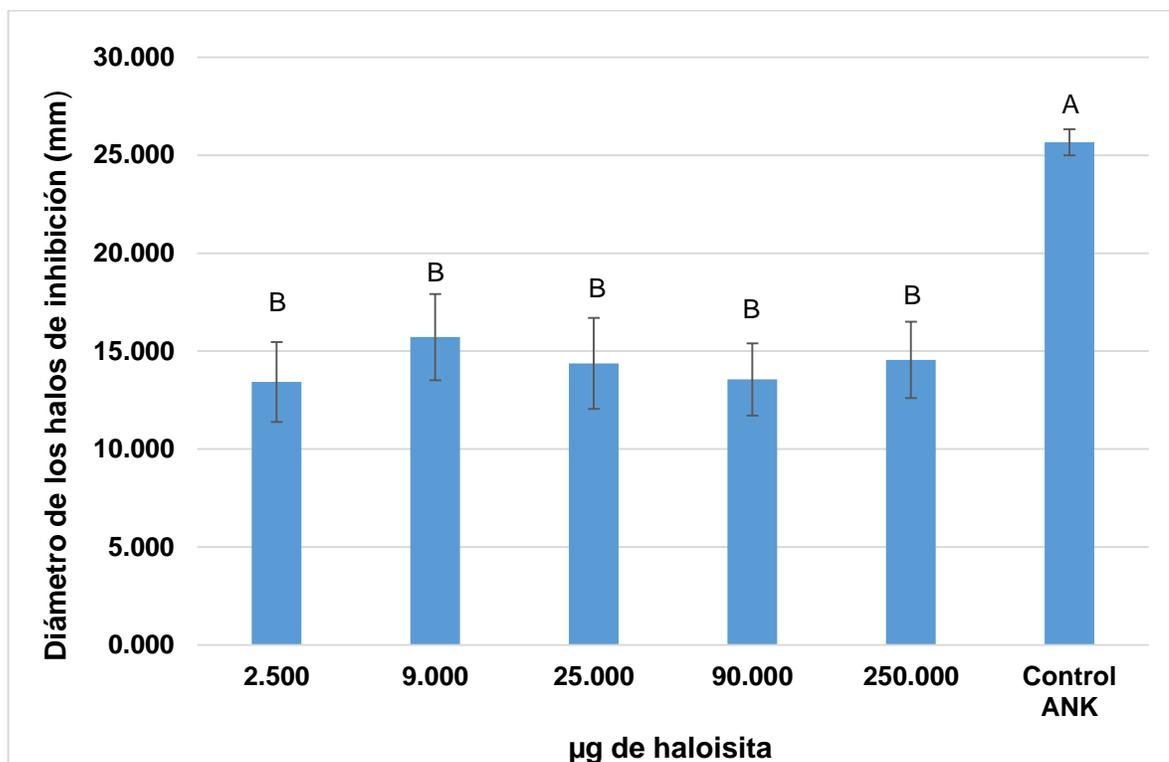
A modo de ejemplo se muestran los cálculos realizados para conocer la [CE]₅₀ para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Cálculo de la Concentración efectiva cincuenta para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la **Gráfica 1A**, se pueden observar los valores promedio de los halos de inhibición: (13.428 ± 2.04, 15.714 ± 2.20, 14.375 ± 2.32, 13.555 ± 1.84, 14.555 ± 1.95, 25.666 ± 0.667 mm), en función de la cantidad de haloisita (2.0, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 y control positivo 30 µg de amikacina), nótese, que en ninguna de las concentraciones probadas hubo diferencia significativa, sin embargo, al compararlas con el control, éste presentó una actividad antimicrobiana de 1.6 veces mayor que la haloisita (A vs B, p < 0.05), así mismo, se puede observar que la actividad antimicrobiana no fue dependiente de la cantidad de haloisita.

En el **Anexo 1**, se presentan los cálculos realizados para calcular la [CE]₅₀, así como las gráficas y resultados completos de las cepas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Cabe resaltar que los cálculos se realizaron de la misma forma como se llevaron a cabo

en el ejemplo que se muestra a continuación para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



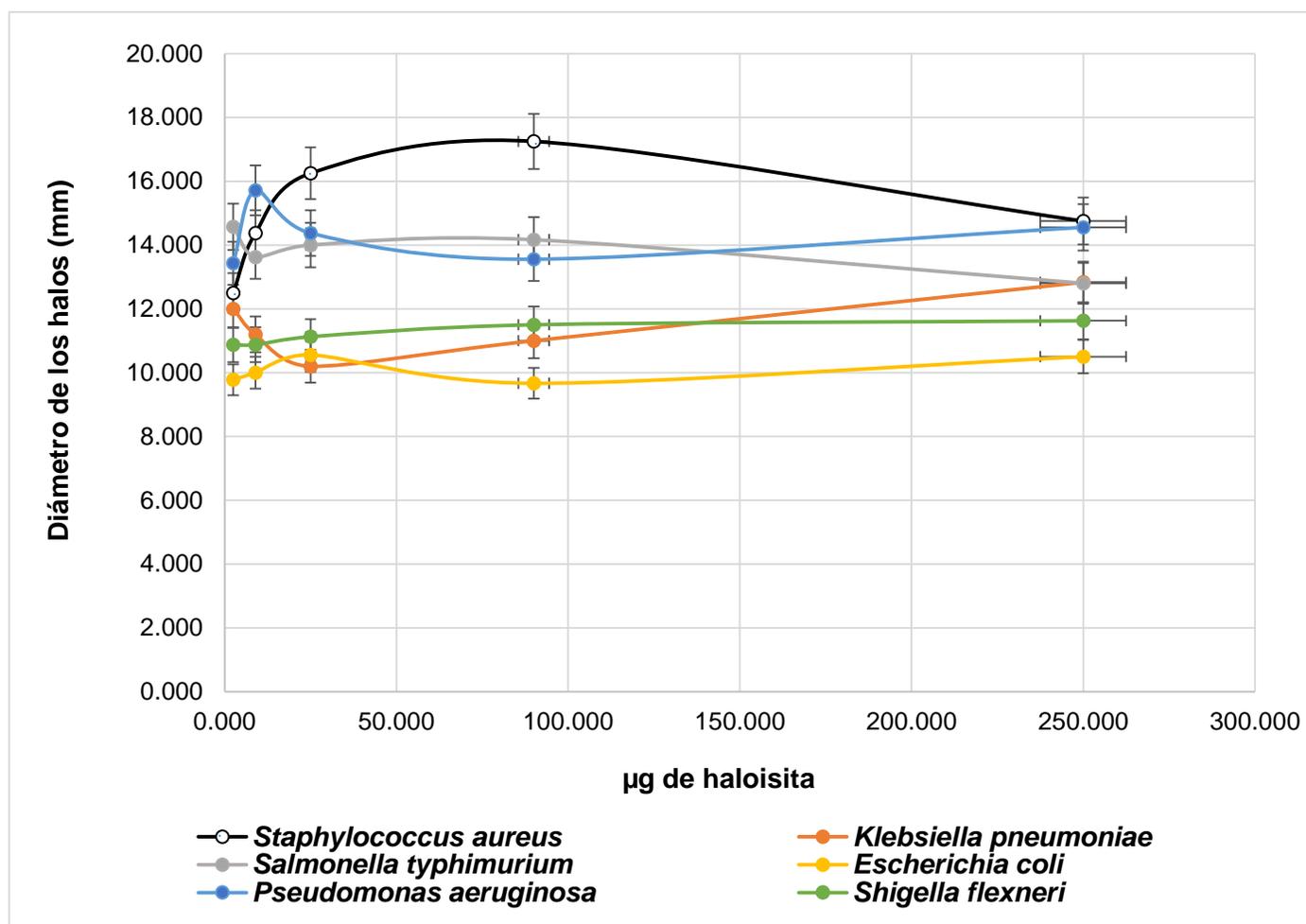
Gráfica 1A. Efecto inhibitorio de la haloisita probada en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.

En la **Tabla 2**, se presentan los resultados promedio de los halos de inhibición formados \pm el error estándar (EE) a diferentes cantidades de haloisita evaluadas, para las diferentes cepas en estudio. los cálculos y resultados para todas las cepas se pueden ver en el **Anexo 1**.

Tabla 2. Valores promedio de los halos de inhibición (mm) de las diferentes bacterias estudiadas a distintas cantidades de haloisita (μg).						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853						
Haloisita (μg)	2.500	9.000	25.000	90.000	250.0	Control
Media (mm)	13.428	15.714	14.375	13.555	14.555	Amikacina 30 μg 25.666
Media del Error Estándar (mm)	2.040	2.200	2.320	1.840	1.950	0.667
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022						
Media (mm)	10.875	10.875	11.125	11.500	11.625	Ampicilina 10 μg 21.666
Media del Error Estándar (mm)	0.295	0.295	0.718	0.189	0.620	0.333
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028						
Media (mm)	14.571	13.625	14.000	14.166	12.800	Tetraciclina 30 μg 18.666
Media del Error Estándar (mm)	2.440	1.750	2.370	2.460	2.080	1.430
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922						
Media (mm)	9.777	10.000	10.555	9.666	10.500	Ampicilina 10 μg 13.750
Media del Error Estándar (mm)	0.547	0.471	0.669	0.667	0.655	2.10
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923						
Media (mm)	12.500	14.375	16.250	17.250	14.750	Cloranfenicol 30 μg 31.500
Media del Error Estándar (mm)	0.860	1.600	1.670	1.780	1.550	2.990
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883						
Media (mm)	12.000	11.200	10.200	11.000	12.833	Tetraciclina 30 μg 5.101
Media del Error Estándar (mm)	1.030	1.070	1.320	0.960	1.510	0.140

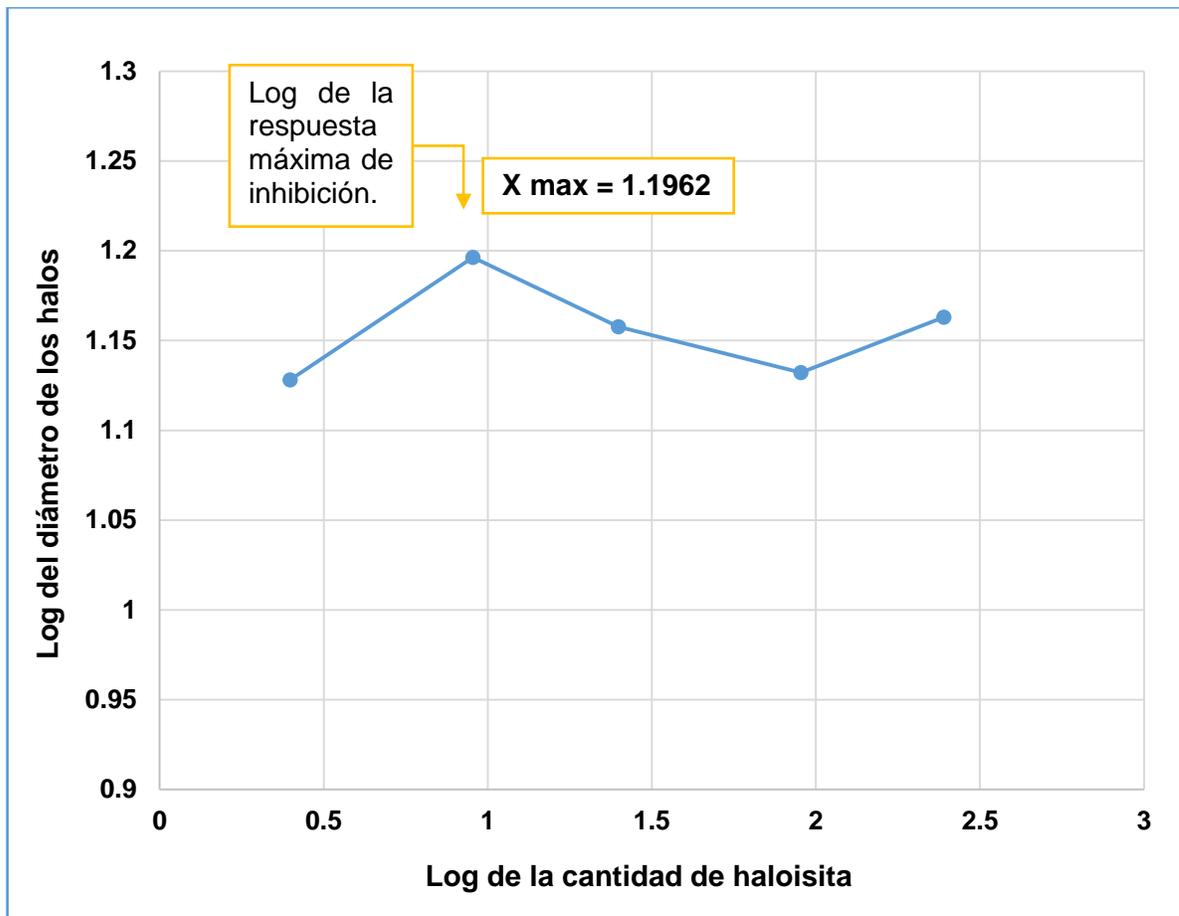
La **Gráfica 1B** fue construida con los resultados de la **Tabla 2**, en donde se pueden observar los valores promedios de los diámetros de los halos de inhibición \pm EE, en función de la cantidad de haloisita para cada cepa bacteriana en estudio.

Nótese que en ésta misma gráfica la respuesta inhibitoria para *Shigella flexneri* ATCC 12022 fue dependiente de la cantidad de haloisita, mientras que para las cepas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 no se presentó éste mismo comportamiento.



Gráfica 1B. Resultados del método de difusión en disco.

La **Gráfica 1C**, fue construida para conocer el punto máximo de inhibición de la haloisita para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, en donde se muestran los logaritmos de la media de los halos de inhibición formados (1.1280, 1.1962, 1.1576, 1.1321, 1.1630) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita usada (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 1C. Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la **Gráfica 1D**, se presentan los valores de Y corregida en función del log de la cantidad de haloisita para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, donde el valor de la ordenada fue calculado con la **Ecuación 1**. Una vez conociendo la ecuación de la recta se calculó la $[CE]_{50}$, es decir, la cantidad de haloisita que se requiere

para inhibir el 50% del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y ésta fue de 1.24 µg.

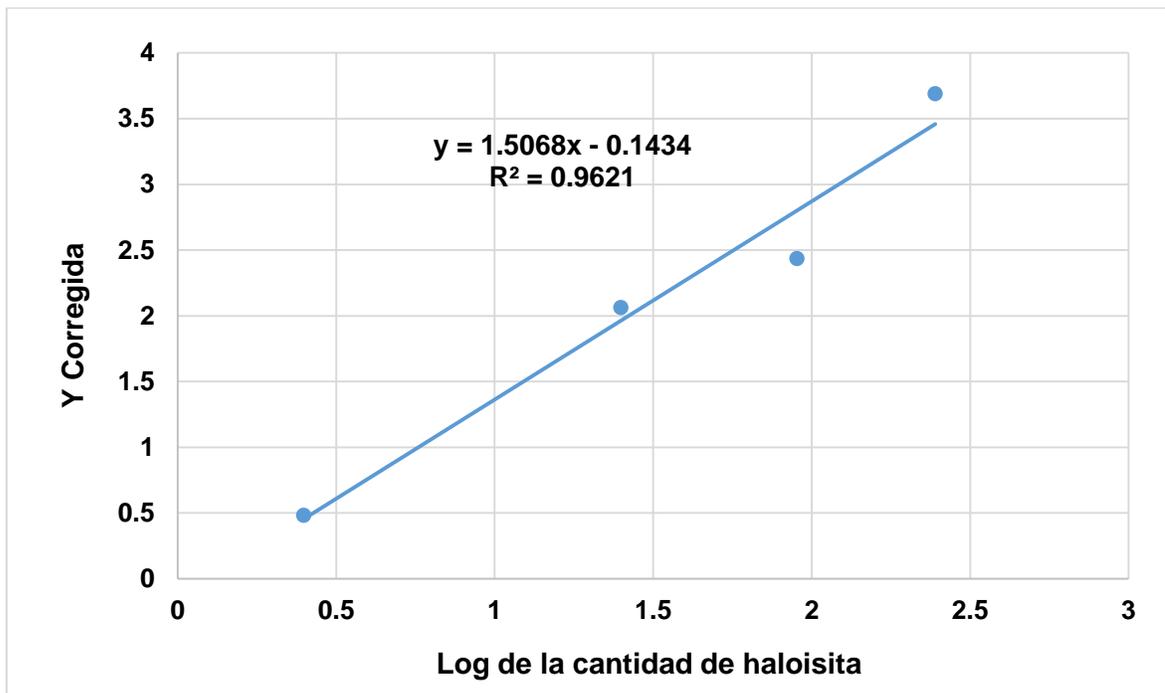
$$Y \text{ corregida} = \text{Log} \left[\frac{X_0}{X_{\text{max}} - X_0} \right] \cdot (H) \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

X_0 = corresponde a los logaritmos de los halos formados a las diferentes cantidades de haloisita, (1.1280, 1.1576, 1.1321, 1.1630).

X_{max} = El log del valor de la respuesta máxima (log del halo de inhibición mayor fue de 1.1962).

H = El logaritmo de la cantidad de haloisita empleada en cada uno de los halos formados fueron: 0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39.



Gráfica 1D. Dosis respuesta para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En la **Tabla 3**, se muestra el concentrado de los resultados de las $[CE]_{50}$ de haloisita, calculadas para cada microorganismo, así como la $[CE]_{50}$ de los

antibióticos usados, la sensibilidad, la inhibición, y la resistencia reportados por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) en 2017.

Cabe resaltar que en el **Anexo 1** se presentan los cálculos realizados para conocer la [CE]₅₀ de cada cepa estudiada y que éstas fueron calculadas de la misma forma como se explicó en este ejemplo.

Tabla 3. Concentración efectiva 50 [CE] ₅₀ calculada de la haloisita para las diferentes bacterias.					
Microorganismo	Dimensiones del microorganismo (µm)	[CE]₅₀ de haloisita en (µg) (ver Anexo 1)	µg de control utilizado por método de sensidisco	[CE]₅₀ para el antibiótico usado como control en µg (NCCLS, 2017)	Sensibilidad del antibiótico usado como control S/I/R (NCCLS, 2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Ø de 0.4 a 0.5 L de 1.5 a 3.0	1.24	Amikacina 30 µg	2.0	S
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Ø de 0.3 a 1.0 L de 1.0 a 6.0	1.86	Ampicilina 10 µg	1.0	S
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Ø de 0.7 a 1.5 L de 2.0 a 5.0	4.30	Tetraciclina 30 µg	4.0	S
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ø de 1.1 a 1.5 L de 2.0 a 6.0	2.01	Ampicilina 10 µg	2.0	I
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Ø de 0.8 a 1.5	1.05	Cloranfenicol 30 µg	4.0	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	Ø de 0.3 a 1.0 L de 0.6 a 6.0	1.40	Tetraciclina 30 µg	0.5	R

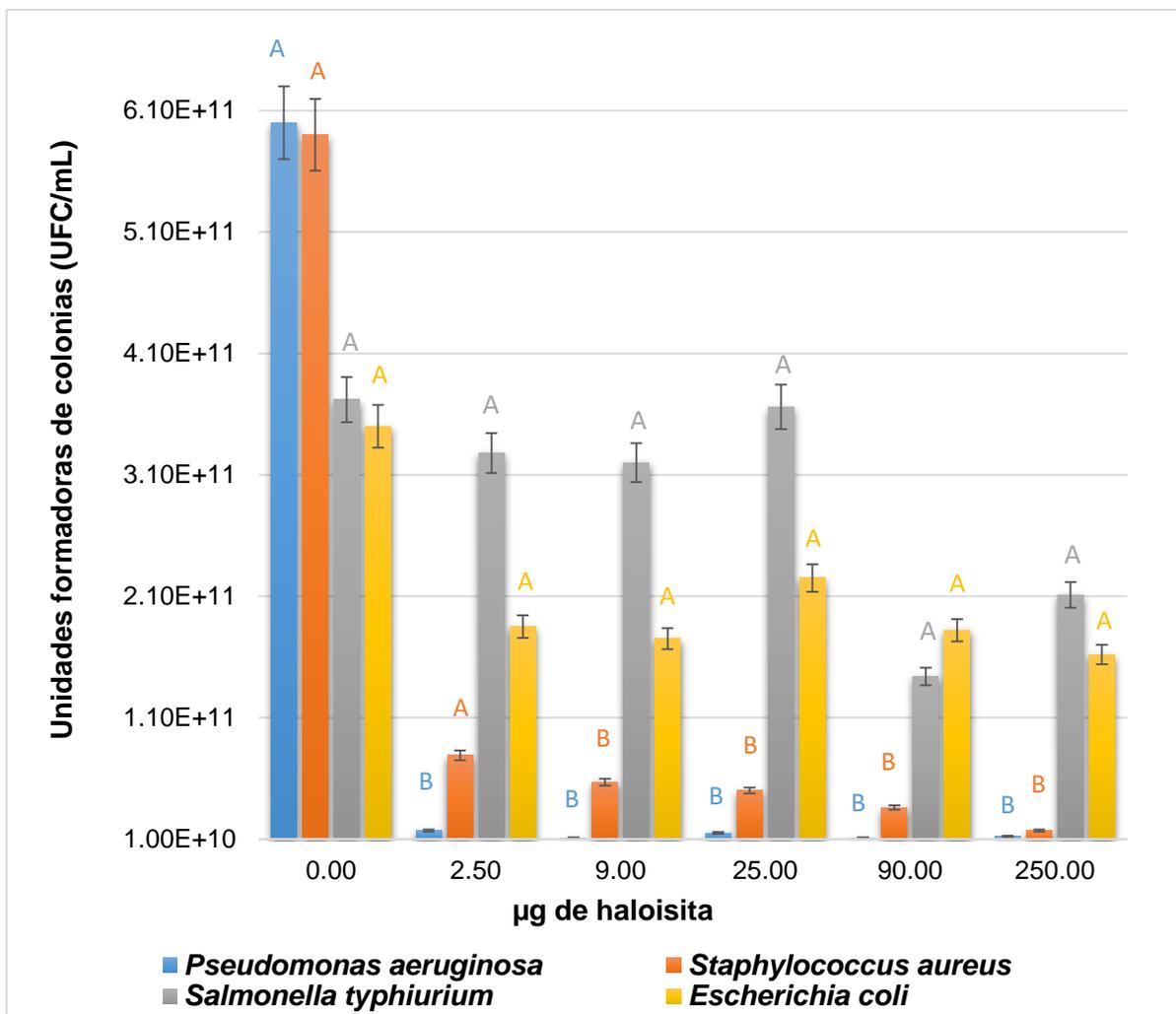
6.2 Resultados de la actividad antimicrobiana de la haloisita por el método Macrodilución en agar.

Para calcular la $[CE]_{50}$ por el método macrodilución en agar se realizaron los mismos calculos que se presentaron por el método de sensidiscos, para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, mientras que los cálculos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 se muestran en el **Anexo 2**.

En la **Tabla 4** se presenta el crecimiento del microorganismo en unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en función de las cantidades de haloisita adicionadas: (2.5, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 μ g) \pm SEM.

Tabla 4. Resultados del método de macrodilución en agar.						
Microorganismo de prueba	Blanco	Haloisita 2.0 µg	Haloisita 9.0 µg	Haloisita 25 µg	Haloisita 90 µg	Haloisita 250 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	6x10 ¹¹ UFC/mL	1.7x10 ¹⁰ UFC/mL	1.7x10 ¹⁰ UFC/mL	1.5x10 ¹⁰ UFC/mL	1.1x10 ¹⁰ UFC/mL	1.2x10 ¹⁰ UFC/mL
Media del Error Estándar	1.6x10 ⁹ UFC/mL	3.18 x10 ⁹ UFC/mL	2.603x10 ⁹ UFC/mL	3.18 x10 ⁹ UFC/mL	4.667x10 ⁹ UFC/mL	2.8 x10 ⁸ UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	5.9x10 ¹¹ UFC/mL	7.9x10 ¹⁰ UFC/mL	5.7x10 ¹⁰ UFC/mL	5x10 ¹⁰ UFC/mL	3.6x10 ¹⁰ UFC/mL	1.7x10 ¹⁰ UFC/mL
Media del Error Estándar	8.95x10 ¹⁰ UFC/mL	1.832x10 ¹⁰ UFC/mL	4.807x10 ⁹ UFC/mL	2.0 x10 ⁹ UFC/mL	3.646x10 ⁹ UFC/mL	2.028 x10 ⁹ UFC/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3.5x10 ¹¹ UFC/mL	1.85x10 ¹¹ UFC/mL	1.75x10 ¹¹ UFC/mL	2.25x10 ¹¹ UFC/mL	1.82x10 ¹¹ UFC/mL	1.62x10 ¹¹ UFC/mL
Media del Error Estándar	3.18x10 ¹⁰ UFC/mL	1.462x10 ⁹ UFC/mL	1.443x10 ⁹ UFC/mL	1.121x10 ⁹ UFC/mL	1.249x10 ⁹ UFC/mL	2.0881x10 ⁹ UFC/mL
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	3.72x10 ¹¹ UFC/mL	3.28x10 ¹¹ UFC/mL	3.2x10 ¹¹ UFC/mL	3.66x10 ¹¹ UFC/mL	1.44x10 ¹¹ UFC/mL	2.11x10 ¹¹ UFC/mL
Media del Error Estándar	1.128x10 ¹⁰ UFC/mL	1.165x10 ⁹ UFC/mL	6.92x10 ⁹ UFC/mL	1.936x10 ⁹ UFC/mL	1.0x10 ⁹ UFC/mL	3.797x10 ⁹ UFC/mL

La **Gráfica 2A**, muestra el comportamiento gráfico de los valores promedio del crecimiento (UFC/mL) microbiano, en función de la cantidad de haloisita utilizada por el método de macrodilución en agar.



Gráfica 2A. Efecto inhibitorio de la haloisita para el método de macrodilución en agar. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm \text{SEM}$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Tukey. Literales diferentes $p < 0.05$, diferencias significativas.

Los resultados muestran un efecto inhibitorio de la haloisita a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en todas las dosis probadas, observándose la máxima respuesta inhibitoria a 90.0 µg ($1.1 \times 10^{10} \pm 4.667 \times 10^9$ UFC/mL) y la menor a 9.0 µg ($1.7 \times 10^{10} \pm 2.603 \times 10^9$ UFC/mL), así mismo, se puede observar que la respuesta fue independiente de las cantidades de haloisita probadas (2.5, 9.0, 25.0, 90.0 y 250.0 µg). El análisis estadístico mostró que existen diferencias significativas al compararse con el control ($p < 0.05$) pero no entre las concentraciones de haloisita.

Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en la **Gráfica 2B**. Se presentan los logaritmos de la media de las UFC/mL (11.7781, 10.23, 10.23, 10.176, 10.0413, 10.07918) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39),

En la **Gráfica 2C**, se muestra la gráfica dosis respuesta, donde la ordenada está dada por la **Ecuación 1**.

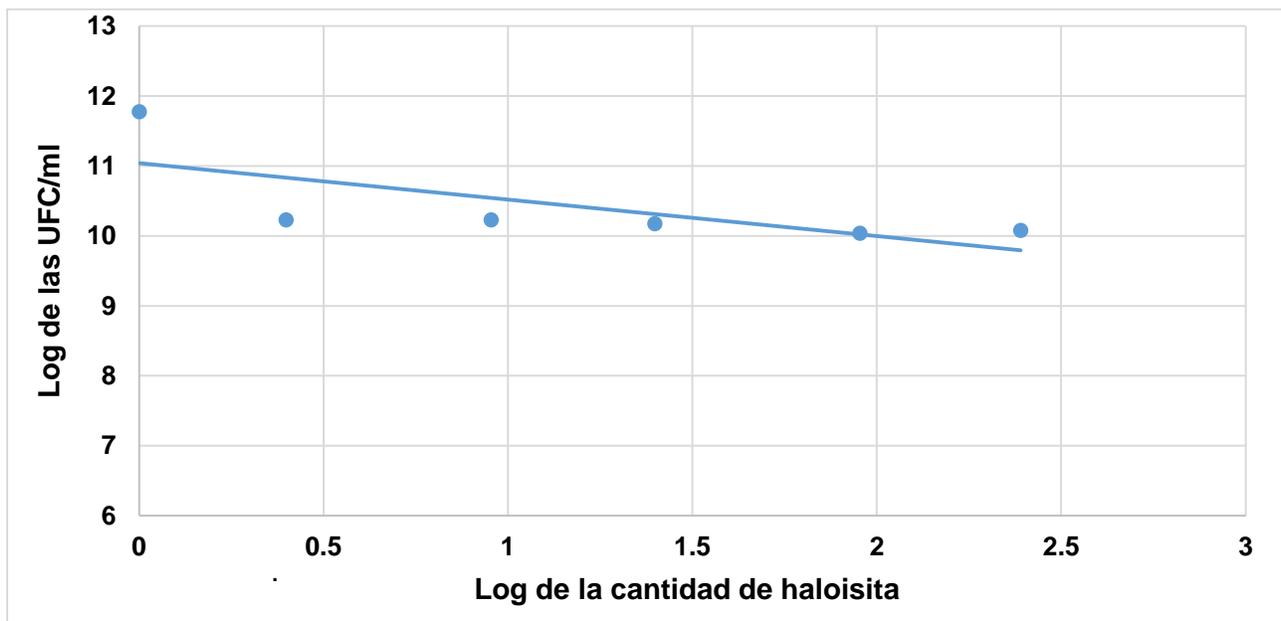
$$Y \text{ corregida} = \text{Log} \left[\frac{X_0}{X_{\max} - X_0} \right] \cdot (H) \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde:

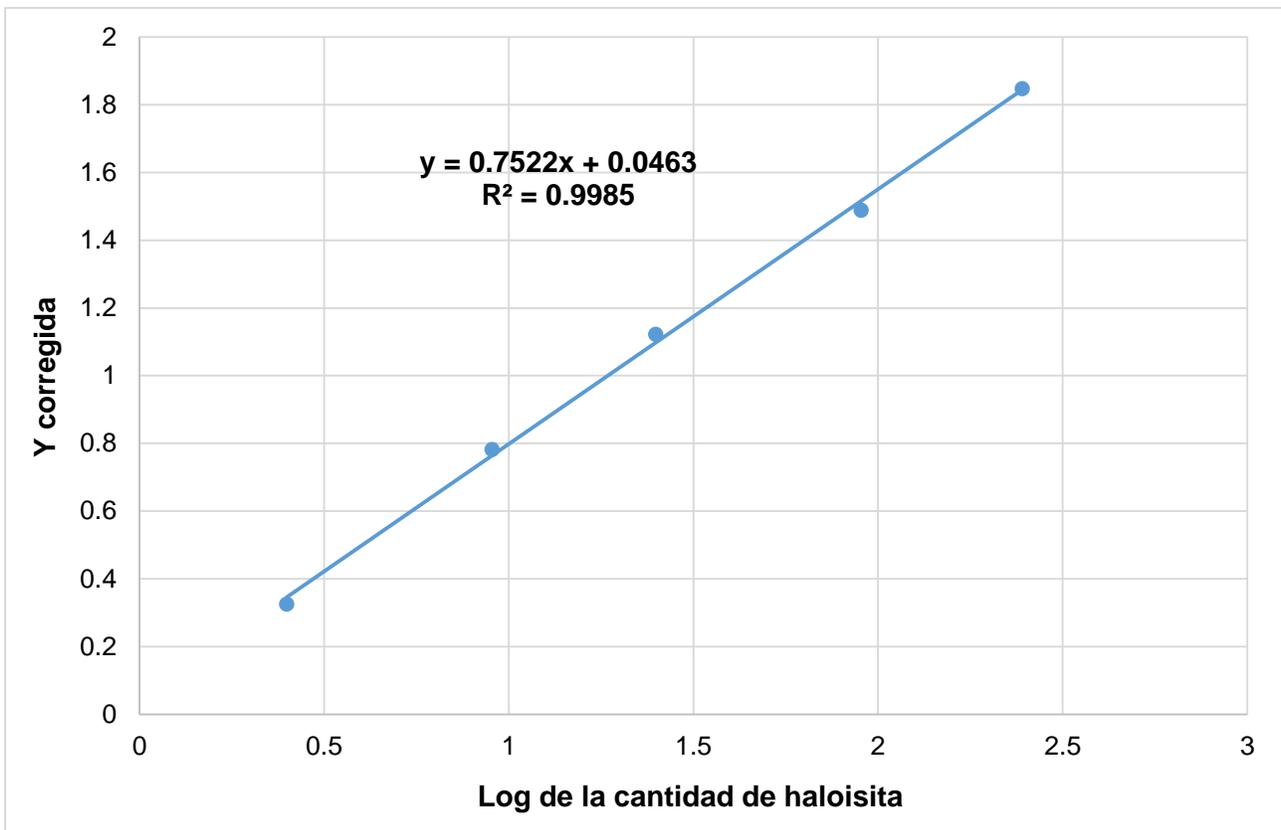
X_0 = logaritmo de la media las UFC/mL (10.23, 10.23, 10.176, 10.0413, 10.07918).

X_{\max} = El log valor de la máxima respuesta (11.7781).

H = el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 2B. Log de la concentración vs el log de las UFC/ml *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



Gráfica 2C. Gráfico de dosis respuesta para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Con los resultados de la **Ecuación 2** (porcentajes de resistencia), se construyó la **Gráfica 2D** en la cual se muestra el perfil de sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a la haloisita. Los resultados del resto de las bacterias en estudio calcularon de la misma forma y se presentan en el **Anexo 2**.

$$\% \text{ de resistencia} = \frac{X_0}{X_{max}} \cdot 100 \dots \text{Ecuación 2}$$

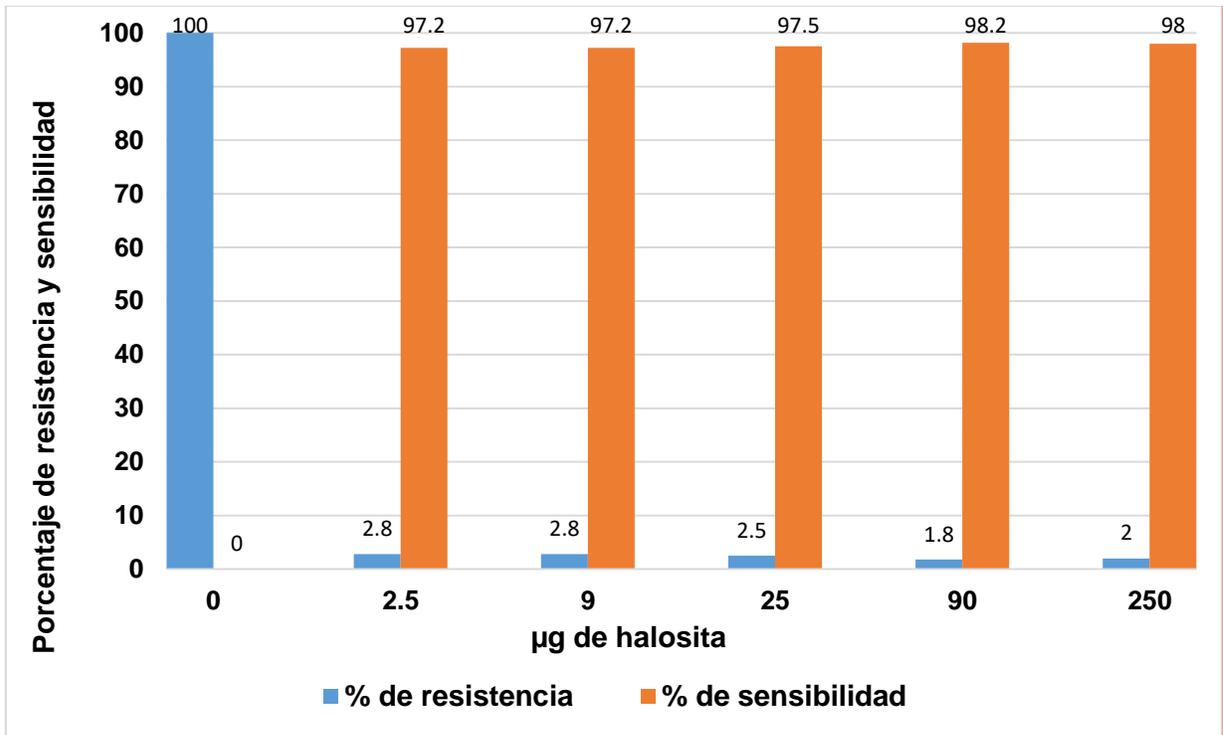
Donde:

X_0 = Las UFC/mL para cada una de las cantidades de haloisita empleadas (6x10¹¹, 1.7x10¹⁰, 1.7x10¹⁰, 1.5x10¹⁰, 1.1x10¹⁰, 1.2x10¹⁰ UFC/mL).

X_{max} = Las UFC/mL en el blanco (6x10¹¹ UFC/mL).

$$\% \text{ de sensibilidad} = 100 - \% \text{ de resistencia} \dots \text{Ecuación 3}$$

Los porcentajes de resistencia para cada una de las cantidades de haloisita empleadas para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 son 100.0, 2.8, 2.8, 2.5, 1.8, 2.0 %, mientras que los porcentajes de sensibilidad para cada una de las cantidades de haloisita son 0.0, 97.2, 97.2, 97.5, 98.2, 98 %.



Gráfica 2D. Perfil de sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a la haloisita natural.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Análisis para el método de difusión en disco Kirby-Bauer.

El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos es de suma importancia ya que es una propuesta de solución para mitigar el creciente desarrollo de resistencia de los microorganismos patógenos para el ser humano, por lo cual en este trabajo se estudia la capacidad de los nanotubos de haloisita natural como un posible nuevo agente antimicrobiano.

Como se ha mencionado en este proyecto se evaluó la capacidad antimicrobiana de la haloisita mediante dos métodos de análisis, primero por el método de difusión en discos conocido como Kirby Bauer, y como segundo método el de macrodilución en agar en diferentes microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883).

Los resultados presentados para *Pseudomonas aeruginosa* indicaron que a pesar de que la haloisita presentó cierta capacidad inhibitoria, ésta no fue estadísticamente mejor que la amikacina (30 µg) usada como control, así mismo, la respuesta a la inhibición presentada no fue dependiente de la cantidad de haloisita.

En el **Anexo 1** y en las **Tablas 2 y 3** se puede ver el comportamiento gráfico para cada cepa estudiada, que fue como se describe a continuación:

Shigella flexneri ATCC 12022. Ésta cepa presentó la mayor inhibición en 250 µg de haloisita con un halo de 11.625 ± 0.620 mm, mientras que, comparado con el control positivo utilizado, ampicilina a una concentración de 10 µg es 1.86 veces menor ya que ésta presentó un halo mayor de 21.666 ± 0.333 mm, mostrando diferencias significativas entre las cantidades de haloisita probadas y el control ($p < 0.05$), pero no entre las diferentes cantidades probadas, también se observa que conforme se incrementó la cantidad de haloisita aumentó el halo de inhibición por lo que hay un efecto dependiente de las concentraciones de haloisita utilizadas.

Para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. La máxima inhibición se presentó a 2.5 µg de haloisita y fue de 14.571 ± 2.44 mm, sin embargo, a medida que se incrementó la cantidad de haloisita no se observa un efecto dependiente de las cantidades de haloisitas probadas, así mismo, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa entre las cantidades de haloisita probadas, ni con el control, y que a pesar de que la $[CE_{50}] = 4.3$ µg fue ligeramente mayor para la haloisita comparada con el control (tetraciclina, $[CE_{50}] = 4.0$ µg), no fueron significativamente diferentes $p > 0.05$, pudiendo resultar la haloisita una alternativa para aquellas personas que presentan cierta resistencia a tetraciclina, para tratar enfermedades producidas por *Salmonella typhimurium*, ya que su efecto inhibitorio es prácticamente igual que el de la tetraciclina.

Escherichia coli ATCC 25922. Para ésta cepa se utilizó como control ampicilina a 10 µg, el cual formó un halo de 13.750 ± 2.10 mm, mientras que la haloisita alcanzó la máxima inhibición a 25 µg y un halo de 10.555 ± 0.669 mm, esto es 1.3 veces mayor la ampicilina, sin embargo, el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas entre las cantidades de haloisita probadas ni el control, por lo que, aunque la $[CE_{50}]$ para el control es de 2.0 µg y para la haloisita de 2.01 µg, no son significativamente diferentes entre sí $p > 0.05$, de modo que la haloisita probada podría ser una alternativa para la ampicilina en el tratamiento de enfermedades producidas por *E.coli*.

Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La máxima inhibición se observó a 90 µg, con un halo de inhibición de 17.250 ± 1.780 mm, la respuesta inhibitoria no fue dependiente con las cantidades de haloisita probadas, sin embargo, el análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre éstas y el control ($p < 0.05$) cloranfenicol a una concentración de 30 µg, formó un halo de 31.500 ± 2.990 mm siendo 1.83 veces mayor. Con respecto a la $[CE_{50}]$ calculada para la haloisita muestran que fue por debajo (1.05 µg) de la presentada por cloranfenicol, usado como control (4.0 µg), esto puede deberse a la morfología de la bacteria en forma de cocos, que permite mayor adsorción debido a mayor contacto entre ésta y la haloisita, inhibiendo de manera más efectiva.

Klebsiella pneumoniae ATCC 13883. Para esta cepa se usó como control tetraciclina a una concentración de 30 µg, que de acuerdo a lo reportado en NCCLS en el 2017, es una cepa resistente a este antibiótico, esto se comprobó en la **Gráfica 1P**, en la que se observa un pequeño halo de inhibición (5.101 ± 0.140 mm), que comparada con la cantidad de haloisita que presentó mayor halo de inhibición, es 2.5 veces menor (12.833 ± 1.510 mm), la respuesta de la bacteria a las diferentes cantidades de haloisita no fue dependiente de la cantidad usada y los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa entre las diferentes cantidades probadas, ni con respecto al control. En relación a la $[CE_{50}]$ calculada de haloisita para esta bacteria, los resultados mostraron que ésta fue mayor (1.40 µg), mientras que la tetraciclina fue de 0.5 µg, esto es lo lógico ya que como se comentó anteriormente *Klebsiella pneumoniae*, es resistente a tetraciclina.

En la **Tabla 3**, se observa que la haloisita presenta un efecto inhibidor en todos los microorganismos estudiados, nótese que la $[CE_{50}]$ para *Staphylococcus aureus* (1.05 µg) < *Pseudomonas aeruginosa* (1.24 µg) < *Klebsiella pneumoniae* (1.4 µg) < *Shigella flexneri* (1.86 µg) < *Escherichia coli* (2.01 µg) < *Salmonella typhimurium* (4.3 µg), esto indica que el microorganismo con mayor sensibilidad a la haloisita fue *Staphylococcus aureus* y el que presentó menor sensibilidad fue *Salmonella typhimurium*.

Al comparar las $[CE_{50}]$ obtenidas para las diferentes cepas y los antibióticos usados como control se puede observar que para *Shigella flexneri* vs ampicilina (1.86 vs 1.0), *Klebsiella pneumoniae* vs tetraciclina (1.40 vs 0.5), *Pseudomonas aeruginosa* vs amikacina (1.24 vs 2.0), *Staphylococcus aureus* vs cloranfenicol (1.05 vs 4.0), fueron significativamente diferentes y que a pesar de que la haloisita tuvo cierta actividad antimicrobiana no fue estadísticamente mejor que los controles usados. En el caso de *Salmonella typhimurium* vs tetraciclina (4.30 vs 4.0), *Escherichia coli* vs ampicilina (2.01 vs 2.0), la respuesta inhibitoria de la haloisita fue prácticamente igual a los controles ya que no se encontraron diferencias significativas.

Considerando las dimensiones reportadas en la literatura para cada cepa evaluada, se observa que existe una relación entre la actividad y el tamaño de las bacterias estudiadas. Las bacterias de dimensiones pequeñas presentan una actividad mayor con respecto a las bacterias más grandes que presentaron una actividad menor, esto puede estar relacionado con la capacidad de adsorción de la haloisita, es decir, a menor tamaño existe una mejor interacción, un mejor acomodo y una mayor superficie de contacto, potenciando su efecto inhibitor gracias a sus características adsorbentes. Así mismo, es importante considerar la morfología de las bacterias estudiadas, las formas bacilares interactúan de manera diferente a la morfología de cocos o cocobacilar, las cuales, al acomodarse en torno a los nanotubos su adsorción pudiera ser diferente potenciando o inhibiendo su efecto.

Otros factores que pudieran estar relacionados con el efecto inhibitor de la haloisita, es que su capacidad adsorbente se modifique con las condiciones presentes en el medio ambiente microbiano (pH, temperatura, humedad relativa, etc.) el cuál está estrictamente relacionado al desarrollo de los microorganismos.

Finalmente, en relación a la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos controles se observa que como es el caso de *Staphylococcus aureus* han generado una resistencia a múltiples agentes antimicrobianos por el uso excesivo de los mismos, la [CE₅₀] es mayor que en el uso de la haloisita en cuyo caso se requiere una menor cantidad para inhibir en la misma medida el crecimiento, otro de los casos importantes a mencionar es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* el cual es un microorganismo que presenta múltiples resistencias a los antibióticos dificultando su tratamiento, donde se necesitan nuevas formas de contrarrestar dicha resistencia como es el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

7.2. Análisis para el método de macrodilución en agar.

En el **Anexo 2**, en la **Tabla 4** y en la **Gráfica 2A** se muestran gráficamente los resultados obtenidos para éste método y se describen a continuación:

Staphylococcus aureus ATCC 25923, para ésta cepa se observó la mayor respuesta inhibitoria a 250 µg ($1.7 \times 10^{10} \pm 2.028 \times 10^9$ UFC/mL) y la menor a 2.0 µg ($7.9 \times 10^{10} \pm 1.832 \times 10^{10}$ UFC/mL), también se observa que la respuesta inhibitoria de la haloisita frente a ésta cepa fue dependiente de la concentración, sin embargo, el análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas entre el blanco y las concentraciones 9.0 µg, 25 µg, 90 µg y 250 µg ($p < 0.05$) y entre la primera concentración (2.0 µg) y éstas.

Para *Escherichia coli* ATCC 25922, se observó que la mayor respuesta inhibitoria fue a la concentración de 250 µg ($1.62 \times 10^{11} \pm 2.0881 \times 10^9$ UFC/mL) y la menor respuesta se presentó a la concentración de 25 µg ($2.25 \times 10^{11} \pm 1.121 \times 10^9$ UFC/mL), demostrando que el comportamiento de esta cepa no es dependiente de la dosis y no existen diferencias significativas entre las dosis ni el control, por lo que, a pesar de que la haloisita si inhibe el crecimiento no es estadísticamente significativo ($p > 0.05$).

Salmonella typhimurium ATCC 14028 en este caso la mayor respuesta inhibitoria fue a la concentración de 90 µg ($1.44 \times 10^{11} \pm 1.0 \times 10^9$ UFC/mL), mientras que la menor respuesta inhibitoria corresponde a la concentración de 25 µg ($3.66 \times 10^{11} \pm 1.936 \times 10^9$ UFC/mL) de modo que el comportamiento de esta cepa no es dependiente la concentración y no hay diferencias significativas entre el control y las cantidades de haloisita utilizadas ($p > 0.05$).

En la **Tabla 4** se observan los resultados y como a mayor concentración de haloisita se presenta un efecto de inhibición notable en el crecimiento de los microorganismos en estudio donde el efecto es mayor para *Pseudomonas aeruginosa* > *Staphylococcus aureus* > *Escherichia coli* > *Salmonella typhimurium*,

esto concuerda con los resultados obtenidos con el método anterior donde se estableció la relación que presentan las dimensiones de los microorganismos con respecto al efecto de la haloisita, así mismo se observa de manera directa como es que la haloisita está inhibiendo el crecimiento de los diversos microorganismos en estudio.

Al realizar un análisis comparativo entre las $[CE_{50}]$ obtenidas por el método de difusión en agar, y las obtenidas por el método de macrodilución en agar, observamos que estas son diferentes a pesar de utilizar las mismas concentraciones de haloisita, esto puede ser debido a que la haloisita es un compuesto altamente insoluble, por lo que, interfiere en su capacidad de difusión, disminuyendo su actividad. En el método de macrodilución en agar, la haloisita se encuentra de manera uniforme en toda la superficie del agar, lo cual favorece su actividad, esto se puede apreciar en las gráficas de los perfiles de sensibilidad para cada uno de los microorganismos las cuales nos muestran que a pesar de utilizar una baja concentración de haloisita ésta tiene un alto potencial de inhibición en los microorganismos empleados.

8. CONCLUSIONES

Las arcillas se componen de partículas de aluminosilicatos y varios oligoelementos que promueven la acción absorbente, sanadora, antiséptica y diversos beneficios a la salud: procesos digestivos (emulsiones), en protección y limpieza de la piel (bloqueadores solares y exfoliantes).

Los minerales arcillosos pueden afectar el metabolismo bacteriano indirectamente mediante la alteración de las propiedades físico-químicas de un entorno específico o directamente a través de interacciones superficiales. Así, las propiedades fisicoquímicas de las arcillas hidratadas se centran en las extraordinarias propiedades adsorbentes de los minerales arcillosos y en su diminuto tamaño de partícula ($< 2,0 \mu\text{m}$), estos productos geológicos naturales tienen una gran superficie (cientos de m^2 / g de arcilla) con altas concentraciones de iones y compuestos situados en las superficies, lo que las hace atractivas como agentes antimicrobianos (Wei JC, et al., 2014, Dario GM, et al., 2014).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de una haloisita natural mediante dos métodos diferentes en los que, de acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el método de macrodilución fue mejor que el método de sensidiscos también conocido como Kirby Bauer, esto pudiera ser debido a que por el método de macrodilución se encuentra mejor distribuida la haloisita teniendo una mayor superficie de contacto con los microorganismos evaluados a diferencia del método Kirby Bauer, el cual se caracterizó porque la haloisita se encuentra soportada en un sensidisco, que aunado a su baja solubilidad existe una menor difusión ya que es insoluble en el material que lo soporta (agar Mueller Hinton).

La haloisita tuvo un efecto inhibitor similar o mejor que la tetraciclina usada como control en *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y que la ampicilina en *Escherichia coli* ATCC 25922 pudiendo ser una alternativa para el tratamiento de enfermedades producidas por estos microorganismos o para personas que presentan resistencia a éstos antibióticos.

Finalmente es importante mencionar que los objetivos planteados en este estudio se cumplieron ya que se pudo evaluar la capacidad antimicrobiana de nanotubos de haloisita natural mediante los dos métodos, así mismo se determinó la [CE₅₀], la sensibilidad y la resistencia de la haloisita en diferentes cepas bacterianas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.*, 53(10): 1565-1574.
2. Alós JI (2009) Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 27(5):290–297.
3. Andersson DI, Hughes D. (2015) Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates.*, 15: 162– 172.
4. Atta HM. (2015). Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces* sp.: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society.*, 19(1), 12-22.
5. Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V, Vignoli R. Universidad De La Republica Uruguay Instituto De Higiene. <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20grupos%20de%20antibi%C3%93ticos.pdf> (Acceso 20 de enero del 2018).
6. Bentley R. (2009). Different roads to discovery; Prontosil (hence sulfa drugs) and penicillin (hence β -lactams). *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(6), 775-786.
7. Bernal I, Cabezas H, Espitia C, Mojica J, Quintero J (2003). Análisis próximo de arcillas para cerámica. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 569-578.
8. Besoain E. *Curso de Mineralogía de suelos*. Instituto interamericano de ciencias agrícolas. <https://books.google.com.mx/books?id=IJMgAQAAIAAJ> (Acceso 8 de agosto 2018).
9. Brugueras MC, Morejón GM. (1999) Antibacterianos de acción sistémica. Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. *Rev Cubana Med Gen Integr.*, 15(2):156-67.
10. Calvo J, Martínez L. (2009) Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 27(1):44–52.
11. Calvo J, Martínez L. (2010) Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 28(Supl 4):4-9.
12. Carrillo AM, Urruchurto CM, Carriazo JG, Moreno S, Molina RA (2014) Caracterización estructural y textural de una haloisita colombiana. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 13(2):563-571.

- 13.Chain E, Florey HW, Abraham EP, Fletcher CM, Gardner AD, Heatley NG, Jennings MA, (1941). Further observations on penicillin. *The Lancet*, 238(6155), 177-189.
- 14.Cobos TN, Ateka O, Pitart C, Vila J (2009) Macrólidos y cetólidos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 27(7):412–418.
- 15.Cona T. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista chilena de infectología*, 19, 77-81.
- 16.Cordiés JL, Machado RLA. (1998) Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*. 8(1):13-27.
- 17.Cué Brugueras M, Morejón García M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-361.
- 18.Dário GM., Da Silva GG, Gonçalves DL, Silveira P, Junior AT, Angioletto E, Bernardin AM. (2014). Evaluation of the healing activity of therapeutic clay in rat skin wounds. *Materials Science and Engineering: C*, 43, 109-116.
- 19.Derita M, Castelli MV, Sortino M. Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. Método de dilución en agar. https://www.researchgate.net/profile/Marcos_Derita/publication/281811872_Metodo_de_dilucion_en_agar/links/55f92e6108aeafc8ac1fe54b.pdf (Acceso 5 abril del 2018).
- 20.Finch Roger (2009) Antimicrobial therapy: principles of use. *MEDICINE.*, 37(10): 545-550.
- 21.Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. (2011) Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina.*, 47(3):137-46.
- 22.Gnansia ER. (2006). Antibióticos y embarazo. *EMC-Ginecología-Obstetricia*, 42(4), 1-11.
- 23.Goldstein FW, Chumpitaz JC, Guevara JM, Papadopoulou B, Acar JF, Vieu JF. (1986). Plasmid-mediated resistance to multiple antibiotics in *Salmonella typhi*. *Journal of Infectious Diseases*, 153(2), 261-265.

24. Gudiol, F. (2010). Uso prudente de antibióticos y propuestas de mejora en los centros sociosanitarios. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 32-35.
25. Guillemot D. (1999). Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current opinion in microbiology*, 2(5), 494-498.
26. Guyen, YN, Baumard S. (2013). Tetraciclinas. Gliciliclinas. EMC *Tratado de medicina.*,17(1):1-6.
27. Haydel SE, Remenih CM, Williams LB. (2008). Broad-spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), 353-361.
28. Herrera ML. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.
29. Horcajada JP, Cantón R. (2014). Ceftarolina, un nuevo antimicrobiano de amplio espectro en la era de las multirresistencias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32, 1-7.
30. Klein C, y Hurlbut CS. (1996). *Manual de mineralogía* (Vol. 2). Reverté.
31. Konta J (1995). Clay and man: clay raw materials in the service of man. *Applied Clay Science*, 10(4), 275-335.
32. Lima Procópio RE, Reis da Silva I, Kassawara MM, Azevedo JL, Araújo JM. (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *braz j infect dis.*,16(5):466–471.
33. Malbrán GC (2012) Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Servicios Antimicrobianos – INEI*, 32(2), 1-43.
34. Martínez JA, Sánchez F. Mecanismo de acción de los antibióticos, Julio 13-septiembre 6, 2007. *Servicio de Enfermedades Infecciosas*. Hospital Clínic. Barcelona, España, 2007; pp.28-34.
35. Mella MS, Sepúlveda AM., González RG, Bellot H, Domínguez YM., Zemelman ZR, Ramírez GC. (2004) Aminoglucósidos-aminociclitolos:

- Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect.*, 21 (4): 330-338.
36. Mella MS, Zemelman MC, Bello TH, Dominguez YM, Gonzalez RG, Zemelman ZR. (2001) Microbiological properties, classifications and structure-activity relationships of cephalosporins and the importance of fourth generation cephalosporins. *Rev Chil Infect.*, 18 (1): 7-19.
 37. Mingeot LMP, Glupczynski Y, Tulkens PM (1999) Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 43(4): 727–737.
 38. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. (2009) Aminoglucósidos y polimixinas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 27(3):178–188.
 39. Molina LJ. Terapéutica. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de bacteriología y parasitología-recursos en bacteriología. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html> (Acceso 15 de enero del 2018).
 40. Morales GYE, Herrera MC, Muñoz RJ. (2007) Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.*, 38(1): 58-69.
 41. Muñoz DK, Gabriel J. Arango A, Maria C. Jaramillo F. (2004) los antibióticos y su situación actual. *Revista de la facultad de química farmacéutica.* 11 (1): 21-33.
 42. Muñoz MRA, Chaves JM, Mancilla P & Rodríguez PJE. (2007). Caracterización fisicoquímica de arcillas del municipio de Guapi–costa Pacífica Cauca (Colombia). *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 31(121), 537-544.
 43. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper, JB, Strockbine NA. (2011). *Escherichia, shigella, and salmonella.* In *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition* (pp. 603-626). American Society of Microbiology.
 44. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm#Contents> (Acceso 10 de enero 2018).

45. Organización mundial de la salud. E. coli. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> (Acceso 15 marzo del 2018).
46. Palacios SGC, Garza CM, Briones LE, Carmona GS, García CR, Islas EL, Muñoz MGE. (2017). Evaluación del uso de antibióticos e impacto de una intervención dirigida a modificar la conducta prescriptiva en profilaxis quirúrgica en 6 hospitales del área metropolitana de Monterrey. *Cirugía y Cirujanos.*, 303:1-12.
47. Pandey G, Mungambe DM, Tharmavaram M, Rawtani D, Agrawal YK. (2017). Halloysite nanotubes-An efficient 'nano-support' for the immobilization of α -amylase. *Applied Clay Science*, 136, 184-191.
48. Pasberg GC. (2014). A need for new generation antibiotics against MRSA resistant bacteria. *Drug Discovery today: technologies. Elsevier.*, 11: 109-116.
49. Paz REL, León PDP, Ramírez PR. (2008). Resistencia bacteriana en cuidados intensivos y tendencia actual: departamento de cuidados críticos, servicio de cuidados intensivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Essalud, Lima, Perú, 2004-2006. *Acta Médica Peruana*, 25(3), 140-147.
50. Perilla MJ, Ajello G, Bopp C, Elliot J, Facklam R, Knapp JS, Popovic T, Wells J, Dowell SF. (2004). Manual de Laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la Salud Pública en el mundo en desarrollo. *Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Salmonella serotipo Typhi y Vibrio cholerae. Atlanta, Georgia: OMS*, 49-67.
51. Rodriguez AC, Agudelo M, Zuluaga AF, Vesga O. (2016) In vivo pharmacodynamics of piperacillin/tazobactam: implications for antimicrobial efficacy and resistance suppression with innovator and generic products. *International Journal of Antimicrobial Agents.*, 40(2): 189–197.

52. Rodríguez LD, Torrecillas R. (2002). Arcillas cerámicas: una revisión de sus distintos tipos, significados y aplicaciones. *Boletín de la Sociedad española de Cerámica y Vidrio*, 41(5): 459-470.
53. Rodríguez RA, Rodríguez BJ, Couce A, Blázquez J (2013) Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*. 303: 293– 297.
54. Rodríguez RZ, Tolón MBI, López LMA. (2010). Cefalosporinas: métodos de síntesis y estudios de modelación molecular. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 41(3), 177-182.
55. Sánchez RC (2006) ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...? *Química Viva*. 2:63-77.
56. Scott G (2009) Antibiotic resistance. *Medicine*. 37(10): 551-556.
57. Seija V, Vignoli R (2006). Principales grupos de antibióticos. *Tema bacteriología y virología médica*, 631-47.
58. Sevilla SD, Soy MD, Soler PN. (2010) Utilidad de los macrólidos como antiinflamatorios en las enfermedades respiratorias. *Arch Bronconeumol.*, 46(5):244–254.
59. Suárez C, Gudiol F. (2009) Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 27(2):116–129.
60. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV (2008) Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asociación Colombiana de infectología.*, 12(3): 217-226.
61. Trigos A, Mendoza G, Luna M, Heredia G, Arias RM. (2005) Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología*. 20: 89-92.
62. Tsoufis T, Katsaros F, Kooi BJ, Bletsas E, Papageorgiou S, Deligiannakis Y, Panagiotopoulos I. (2017). Halloysite nanotube-magnetic iron oxide nanoparticle hybrids for the rapid catalytic decomposition of pentachlorophenol. *Chemical Engineering Journal*, 313, 466-474.

63. Tünger Ö, Dinc G, Özbakkaloglu B, Atman UC, Algün Ü (2000) Evaluation of rational antibiotic use. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 15: 131–135.
64. Valenzuela JR, Sethi AK., Aulik NA, Poulsen KP. (2016). Antimicrobial resistance patterns of bovine *Salmonella enterica* isolates submitted to the Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory: 2006–2015. *Journal of Dairy Science*. 100:1–12.
65. Vicente D, Pérez TE (2010) Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*,28(2):122–130.
66. Viksveen P. (2003). Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative?. *Homeopathy*, 92(2), 99-107.
67. Walkty A, Lagace WP, Adam H, Baxter M, Karlowsky J, Mulvey MR, Zhanel, GG. (2017). Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008–2015. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 87(1), 60-63.
68. Wei JC, Wang YT, Lin JJ. (2014). First evidence of singlet oxygen species mechanism in silicate clay for antimicrobial behavior. *Applied Clay Science*, 99, 18-23.
69. Wencewicz AT (2016) New antibiotics from Nature's chemical inventory. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24: 6227–6252.
70. Wohlleben W, Mast Y, Muth G, Röttgen M, Stegmann E, Weber T. (2012) Synthetic Biology of secondary metabolite biosynthesis in actinomycetes: Engineering precursor supply as a way to optimize antibiotic production. *FEBS Letters.*, 586: 2171–2176.
71. Young LJ, Cheol J, Jeon D, Lee Y, Cheol LW, Kim Y. (2017) Structure-activity relationship-based screening of antibiotics against Gram-negative *Acinetobacter baumannii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.*, 25: 372–380.

72. Zhu H & Njuguna J. (2014). Nanolayered silicates/clay minerals: uses and effects on health. *Health and Environmental Safety of Nanomaterials*, 133-146.
73. Nerino Allocati, Michele Masulli, Mikhail F. Alexeyev y Carmine Di Ilio (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10(12): 6235-6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>. Consultado el 31 de mayo de 2018.
74. Organización mundial de la salud. Resistencia a los antimicrobianos. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos> (Acceso 10 febrero del 2018).

10. ANEXOS

ANEXO 1

Resultados de la actividad antimicrobiana de la haloisita por el método de Kirby Bauer.

En el siguiente anexo se muestran las diferentes gráficas empleadas para el cálculo de la concentración efectiva cincuenta para el resto de microorganismos en estudio (*Shigella flexneri* ATCC 12022, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883) Por el método de Kirby-Bauer.

Para *Shigella flexneri* ATCC 12022, se utilizó ampicilina (10 µg) como control positivo. En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de la media y error estándar de los halos de inhibición formados a las diferentes cantidades. En la **Gráfica 1E**, se muestran las medias de los halos de inhibición y los errores estándar a las diferentes cantidades de haloisita y control positivo usados en este trabajo: (2.0, 9.0, 25.0, 90.0, 250.0 y Control 10 µg), y los halos de inhibición (10.875 ± 0.295 , 10.875 ± 0.295 , 11.125 ± 0.718 , 11.5 ± 0.189 , 11.625 ± 0.620 , 21.666 ± 0.333 mm).

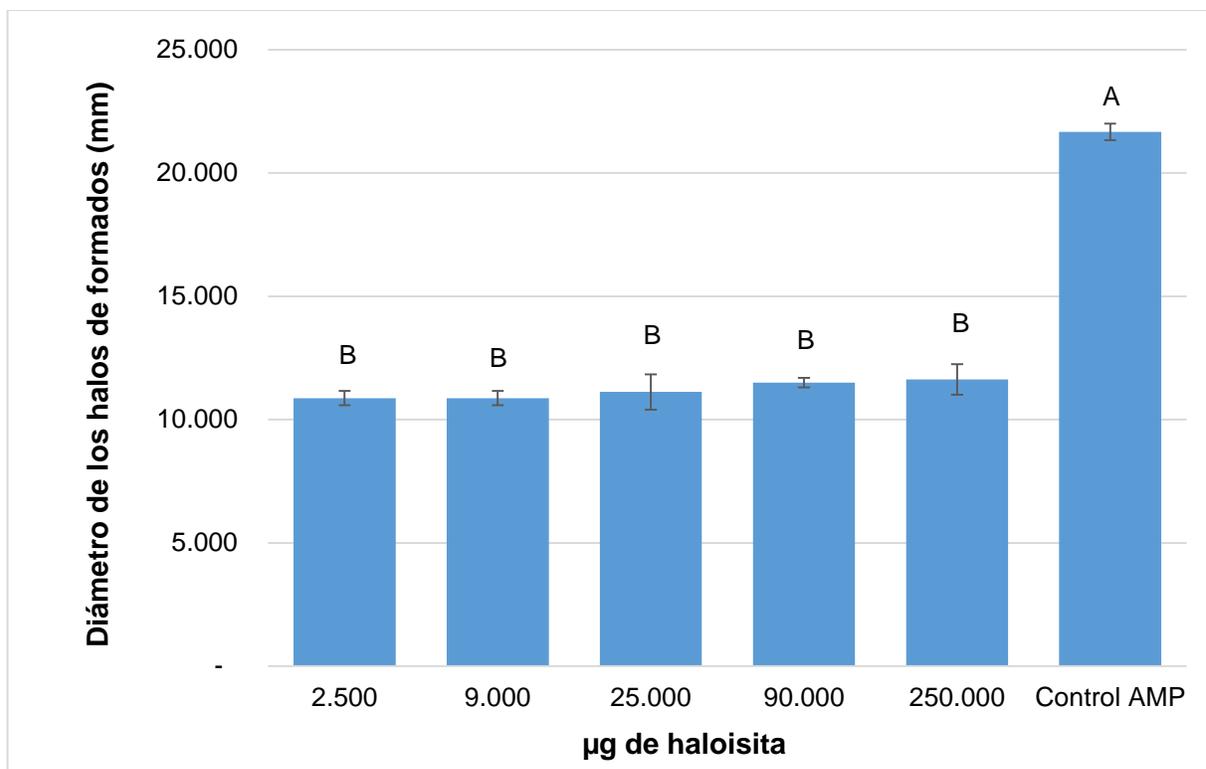
En la **Gráfica 1F** se presentan los logaritmos de la media de los halos de inhibición formados (1.0364, 1.0364, 1.0463, 1.0606, 1.0653) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita usada (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39), En la **Gráfica 1G**, se muestra el gráfico dosis respuesta para *Shigella flexneri* ATCC 12022 donde la ordenada está dada por la **Ecuación 1**:

Donde:

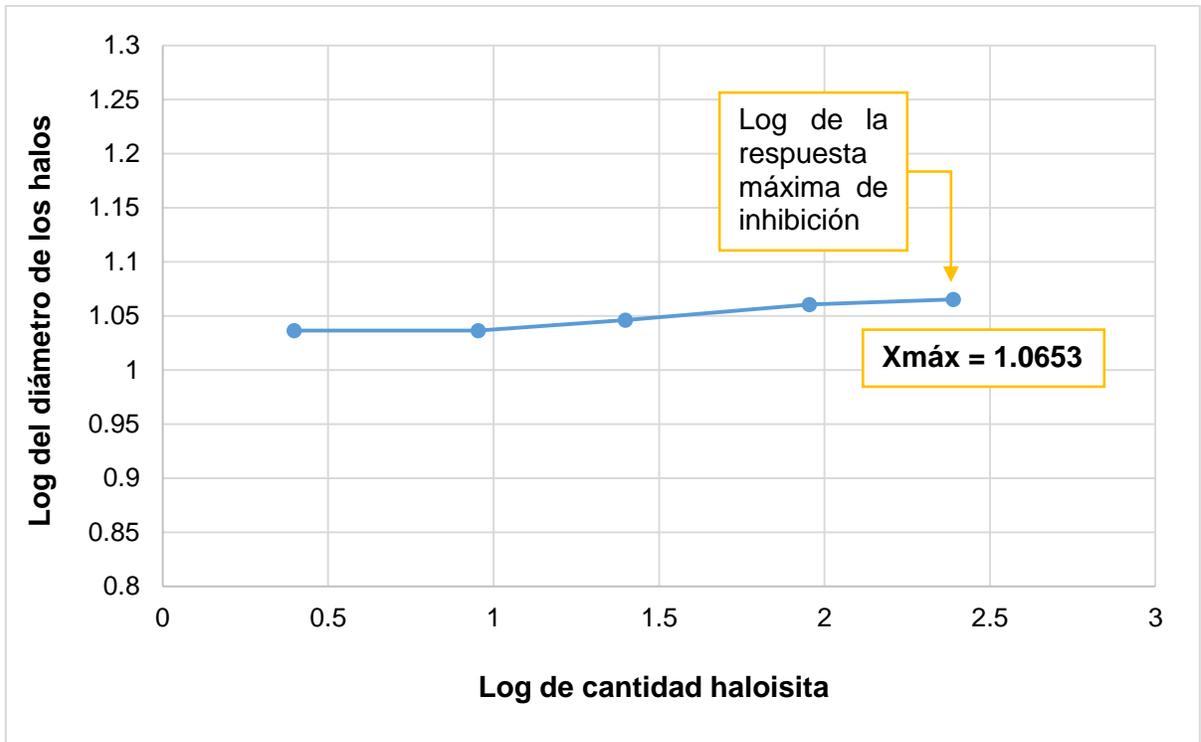
X_0 = corresponde a los logaritmos de los halos formados a las diferentes cantidades de haloisita, (1.0364, 1.0364, 1.0463, 1.0606).

X_{\max} = El log del valor de la máxima respuesta (halo más grande = 1.0653).

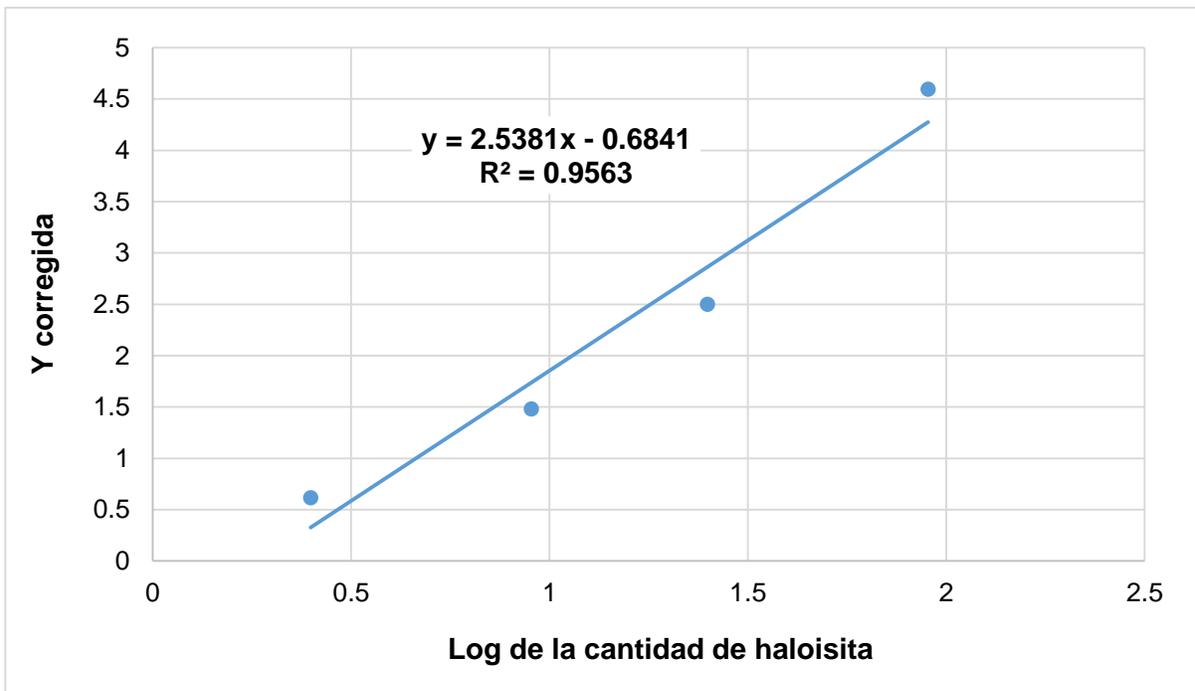
H = El logaritmo de la cantidad de haloisita empleada en cada uno de los halos formados (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39),



Gráfica 1E. Efecto inhibitorio de la halosita probada en *Shigella flexneri* ATCC 12022. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.



Gráfica 1F. Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para *Shigella flexneri* ATCC 12022.



Gráfica 1G. Dosis respuesta para *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 el control positivo fue tetraciclina (30 µg). En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de la media y error estándar de los halos de inhibición formados a las diferentes concentraciones. En la **Gráfica 1H**, se muestran las medias de los halos de inhibición y los errores estándar a las diferentes cantidades de haloisita y control positivo: (14.571 ± 2.44, 13.625 ± 1.75, 14.0 ± 2.37, 14.166 ± 2.46, 12.8 ± 2.08, 18.666 ± 1.43mm).

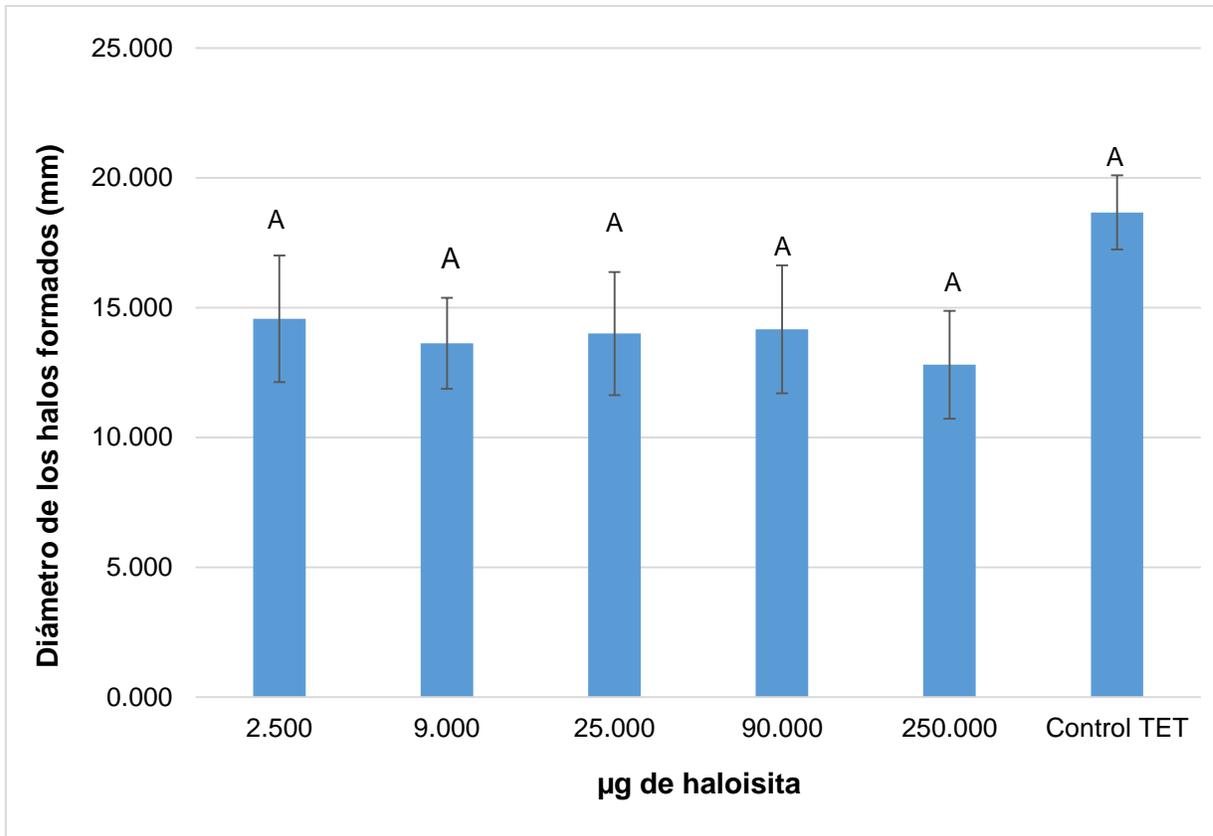
En la **Gráfica 1I** se presentan los logaritmos de la media de los halos de inhibición formados (1.1635, 1.1343, 1.1461, 1.1663, 1.1072) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39). En la **Gráfica 1J**, se muestra el gráfico dosis respuesta para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 donde la ordena está dada por la **Ecuación 1**:

Donde:

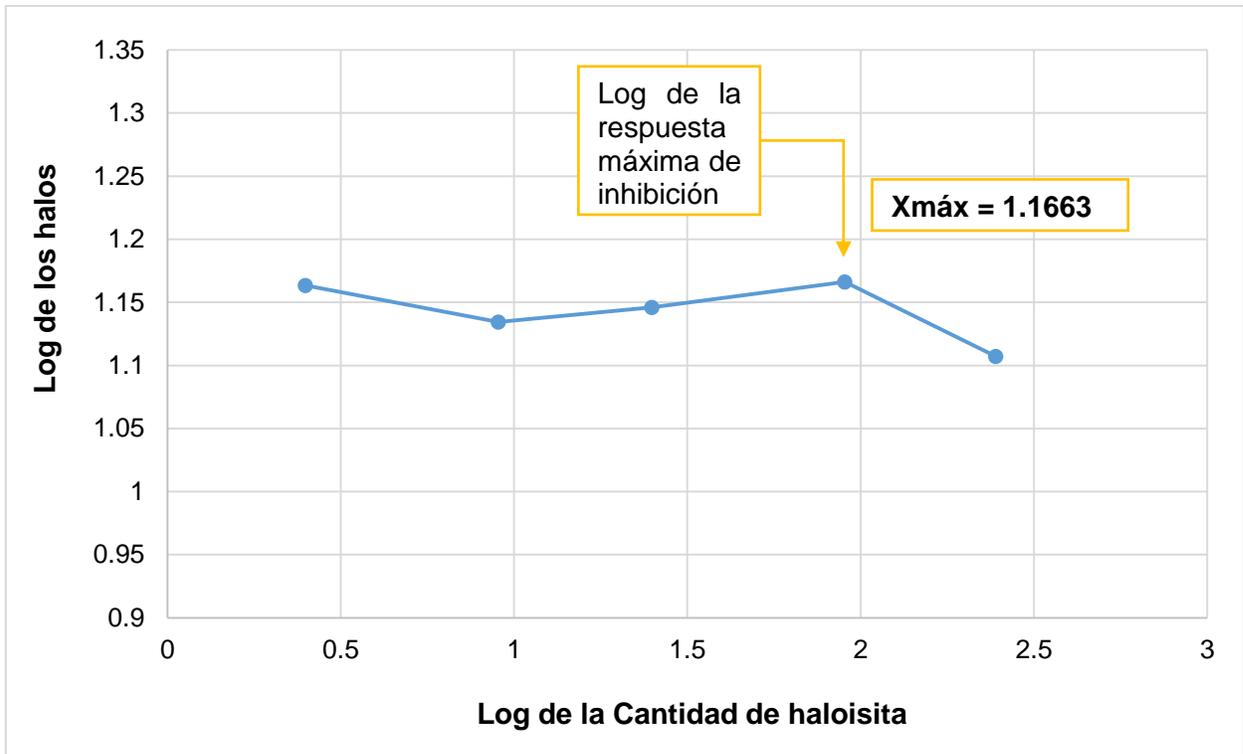
X_0 = logaritmo de los halos (1.1635, 1.1343, 1.1461, 1.1072).

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (1.1663).

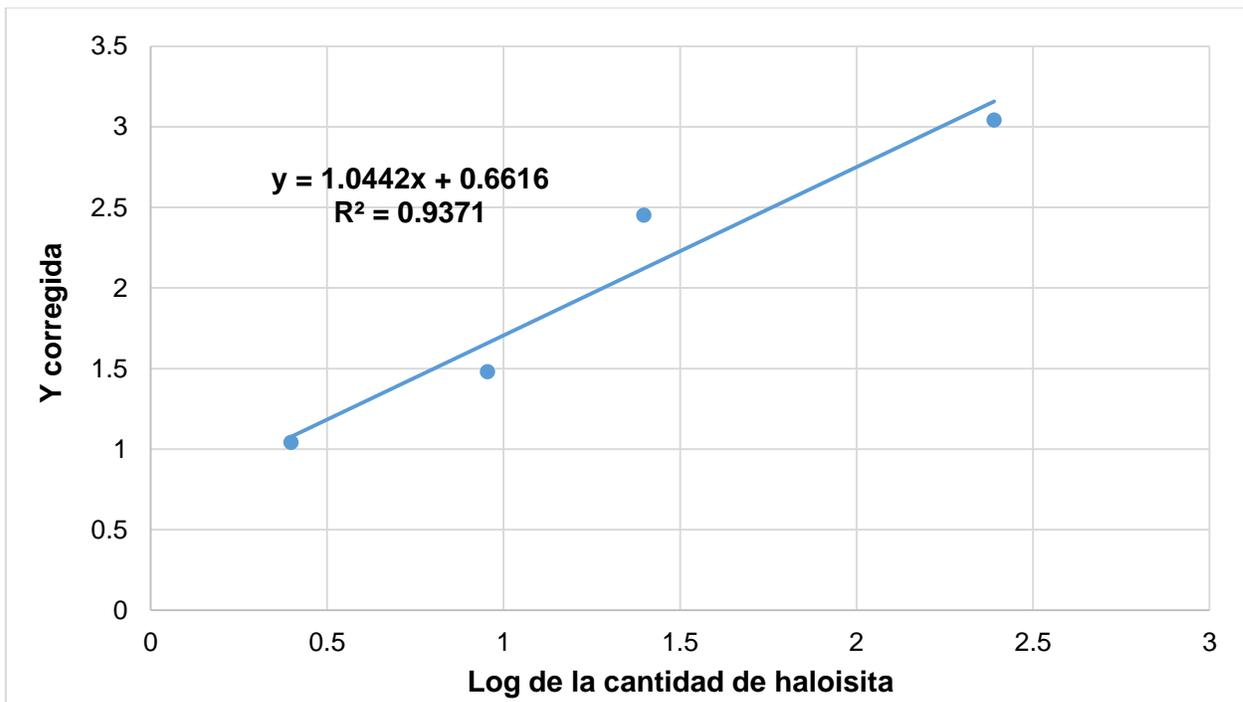
H = el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada para cada uno de los halos formados (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 1H. Efecto inhibitorio de la haloisita probada en *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Cada punto representa la media de $n=7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.



Gráfica 1I. Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.



Gráfica 1J. Dosis respuesta para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Para el caso de *Escherichia coli* ATCC 25922. El control positivo usado fue ampicilina (10 µg). En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de la media y error estándar de los halos de inhibición formados a las diferentes concentraciones. En la **Gráfica 1K**, se muestran las medias de los halos de inhibición y los errores estándar a las diferentes cantidades de haloisita y control positivo: (9.777 ± 0.547, 10.0 ± 0.471, 10.555 ± 0.669, 9.666 ± 0.667, 10.5 ± 0.655, 13.75 ± 2.10 mm).

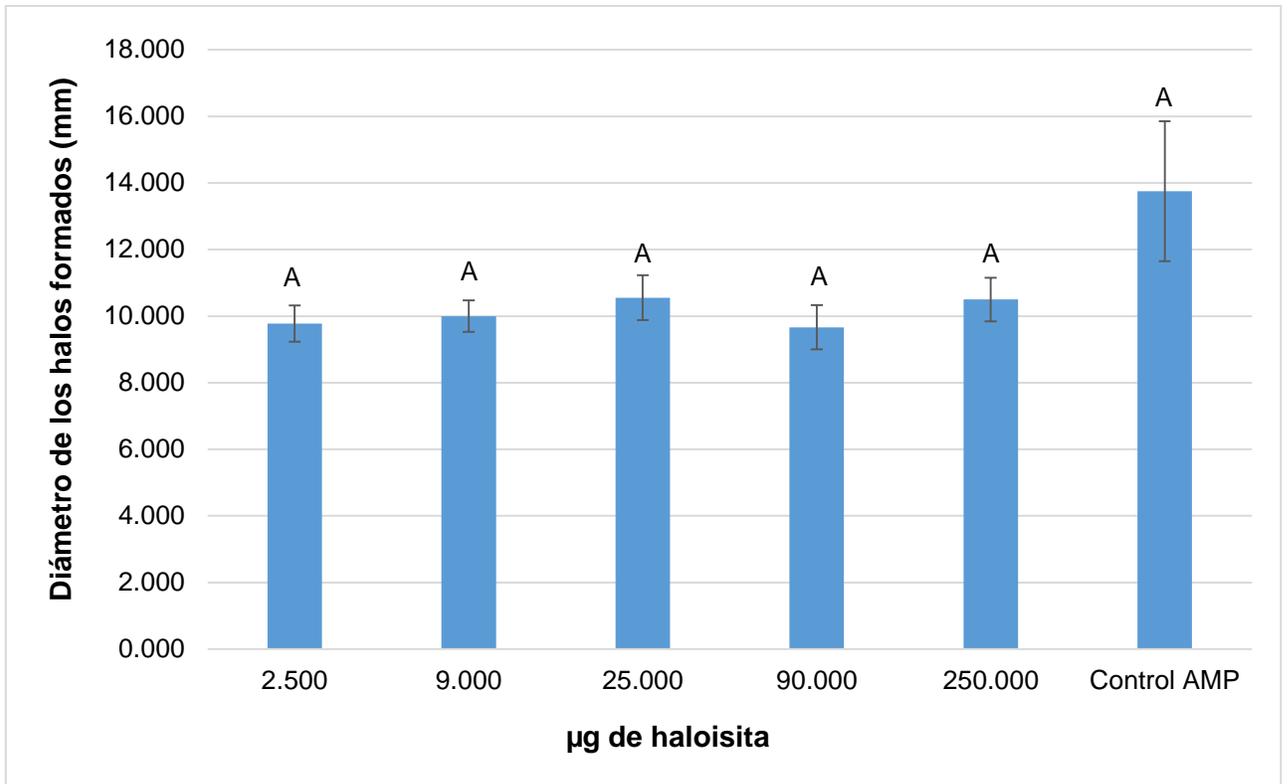
En la **Gráfica 1L** se presentan los logaritmos de la media de los halos de inhibición formados (0.9902, 1.0, 1.0234, 0.9852, 1.0211) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39), En la **Gráfica 1M**, se muestra el gráfico dosis respuesta para *Escherichia coli* ATCC 259224 donde la ordenada está dada por la **Ecuación 1**.

Donde:

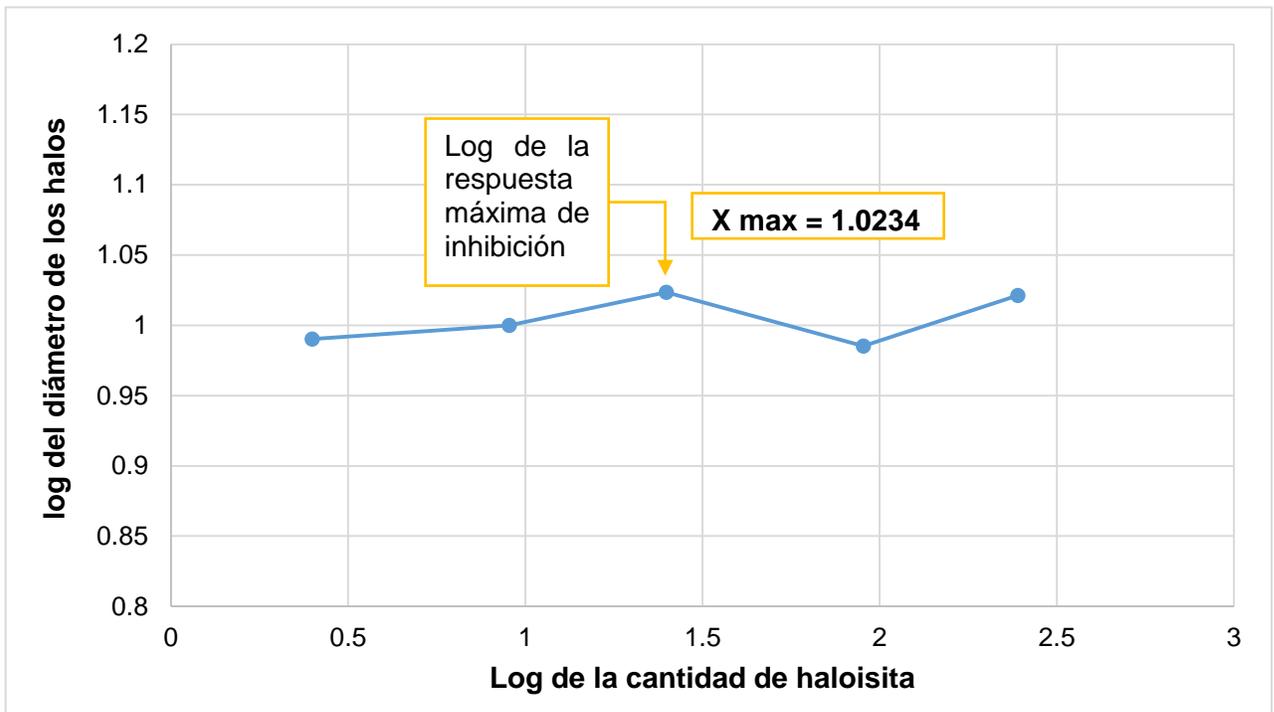
X_0 = logaritmo de los halos (0.9902, 1.0, 0.9852, 1.0211)

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (1.0234)

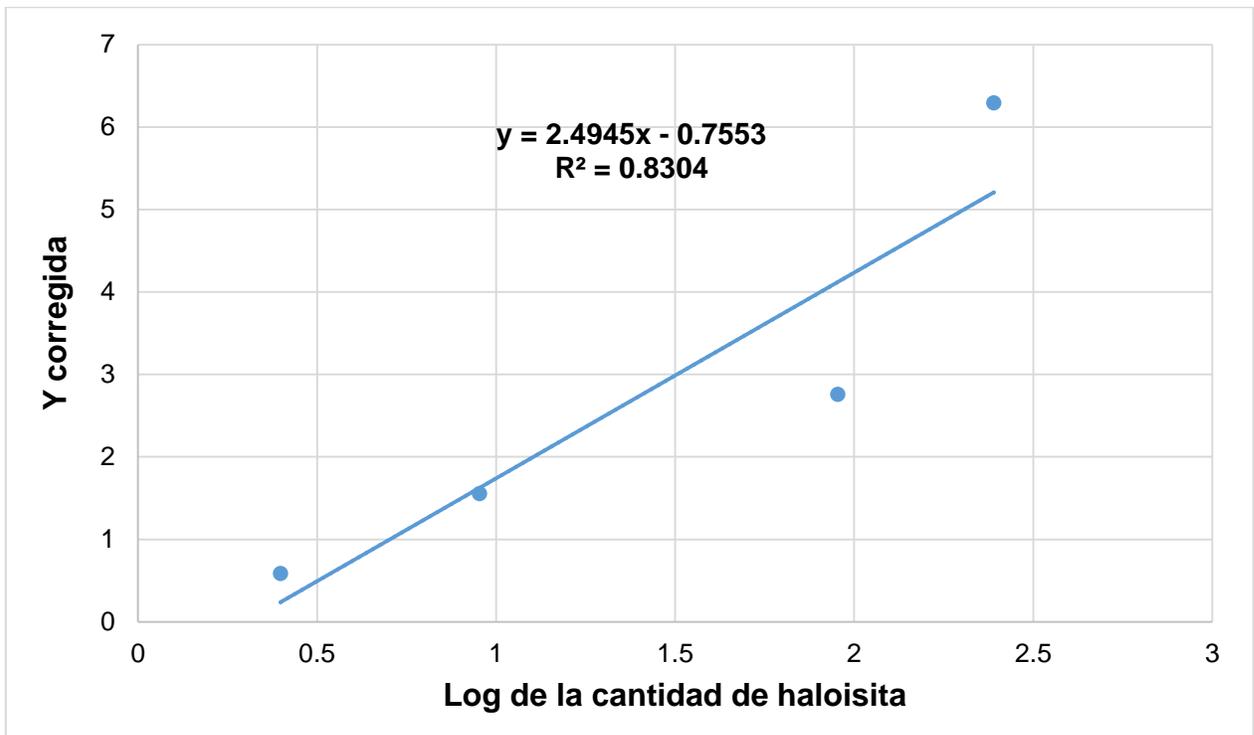
H= el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada para cada uno de los halos formados (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39)



Gráfica 1K. Efecto inhibitorio de la haloisita probada en *Escherichia coli* ATCC 25922. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.



Gráfica 1L. Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para *Escherichia coli* ATCC 25922.



Gráfica 1M. Dosis respuesta para *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utilizó tetraciclina (30 µg) como control positivo. En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de la media y error estándar de los halos de inhibición formados a las diferentes concentraciones. En la **Gráfica 1N**, se muestran las medias de los halos de inhibición y los errores estándar a las diferentes cantidades de haloisita y control positivo: (12.5 ± 0.86, 14.375 ± 1.60, 16.25 ± 1.67, 17.25 ± 1.78, 14.75 ± 1.55, 31.5 ± 2.99 mm).

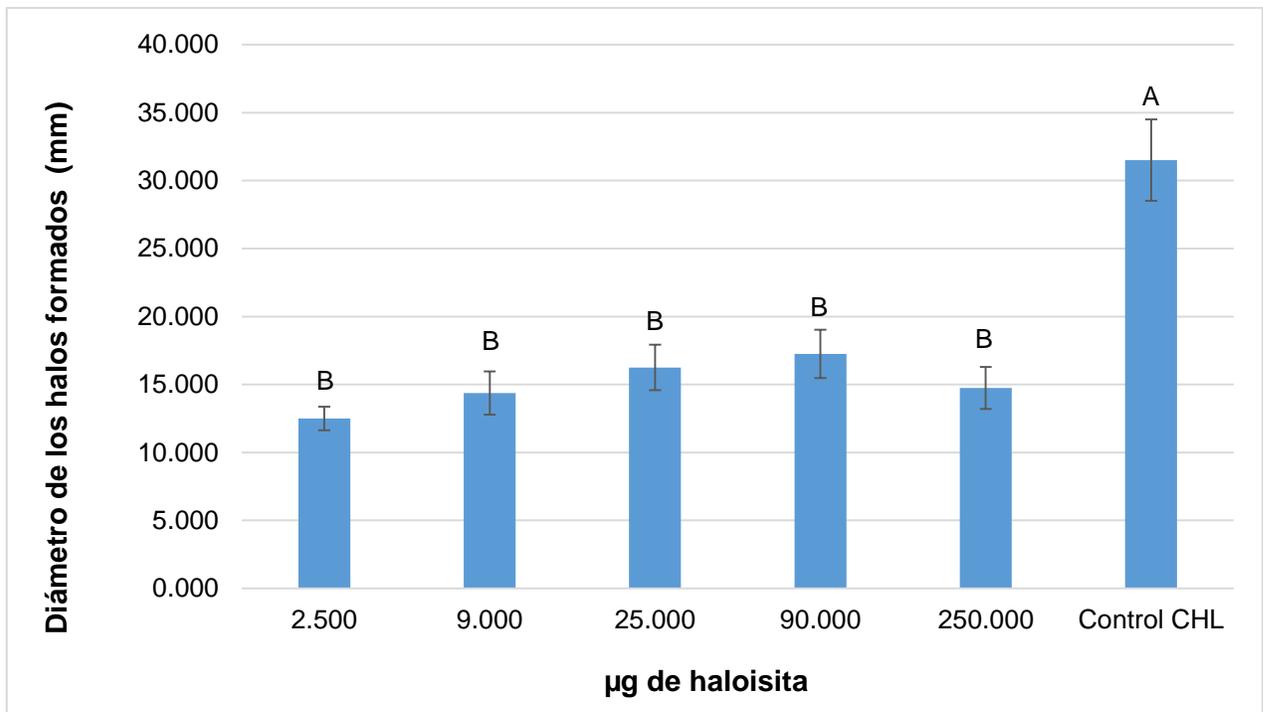
Mientras que en la **Gráfica 1Ñ**. Se presentan los logaritmos de la media de los halos de inhibición formados (1.0969, 1.1576, 1.2108, 1.2367, 1.1687) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39), En la **Gráfica 1O**, se muestra el gráfico dosis respuesta para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 donde la ordenada está dada por la **Ecuación 1**.

Donde:

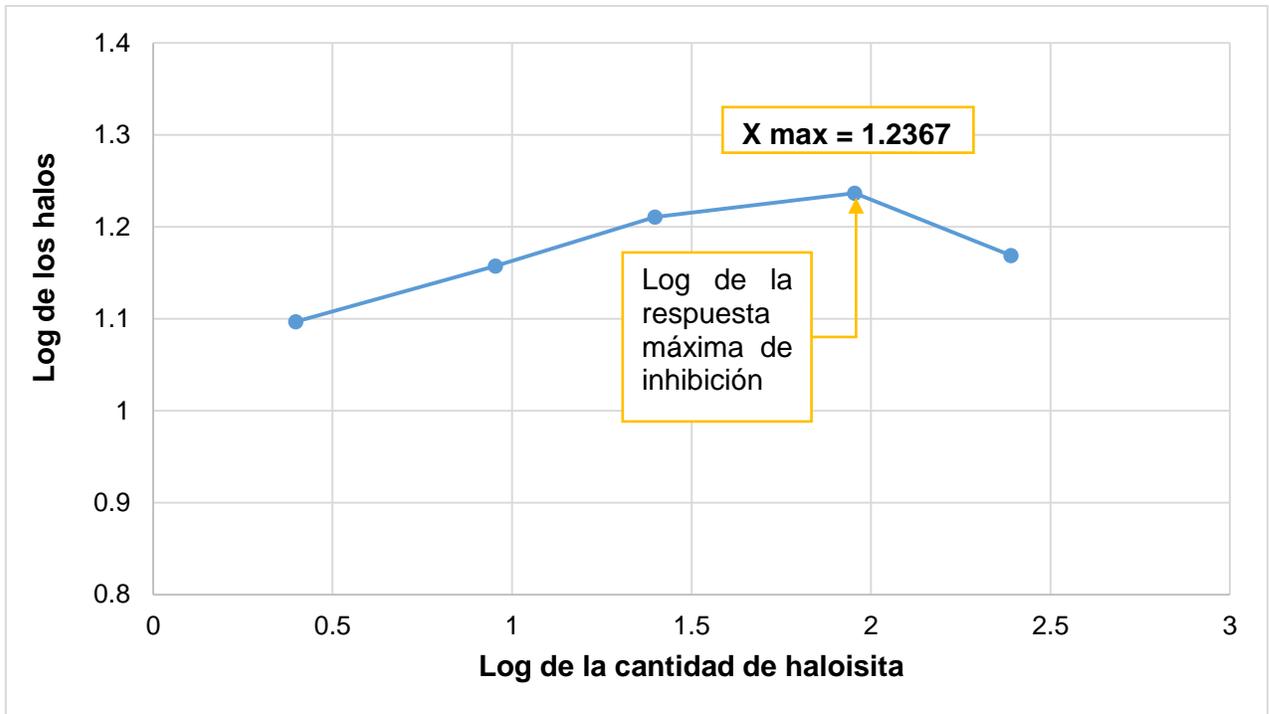
X_0 = logaritmo de los halos (1.0969, 1.1576, 1.2108, 1.1687)

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (1.2367)

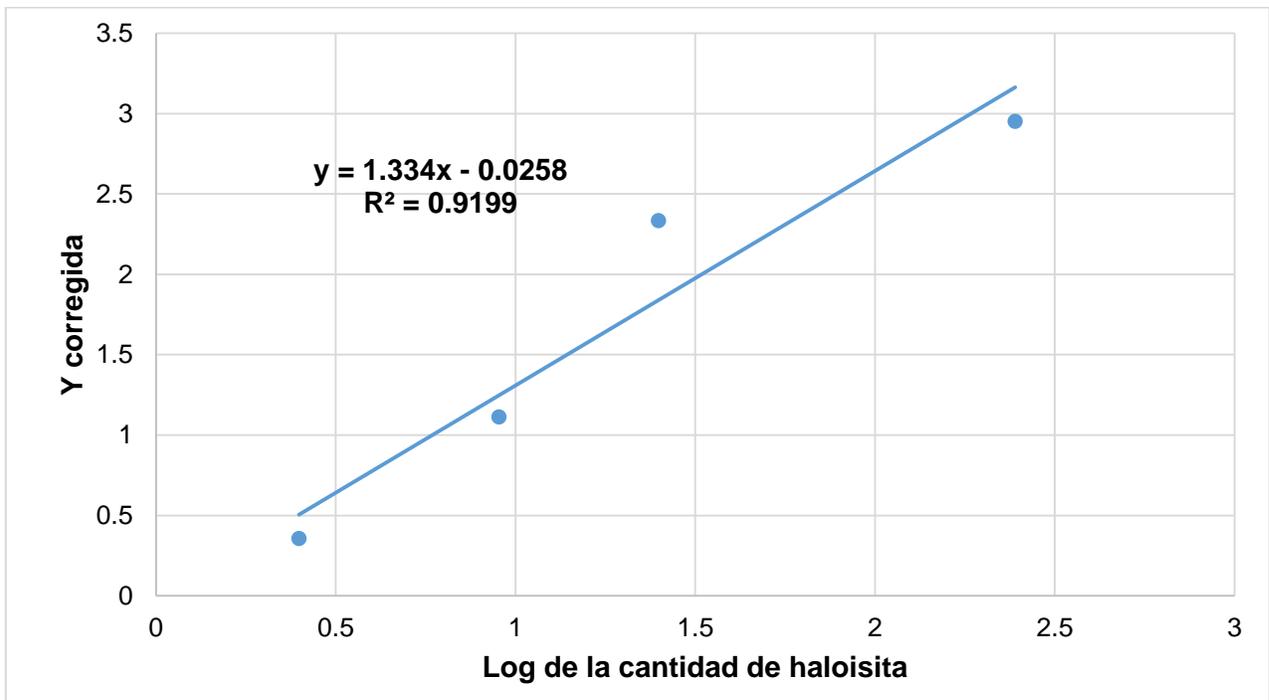
H= el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada para cada uno de los halos formados (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 1N. Efecto inhibitorio de la haloisita probada en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Cada punto representa la media de $n= 7 \pm$ SEM, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.



Gráfica 1Ñ. Log de la concentración de haloisita vs log del diámetro de los halos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Gráfica 10. Dosis respuesta para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 se usó tetraciclina (30 µg) como control positivo. En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de la media y error estándar de los halos de inhibición formados a las diferentes concentraciones. En la **Gráfica 1P**, se muestran las medias de los halos de inhibición y los errores estándar a las diferentes cantidades de haloisita y control positivo: (12.0 ± 1.03, 11.2 ± 1.07, 10.2 ± 1.32, 11.0 ± 0.96, 12.833 ± 1.51 mm).

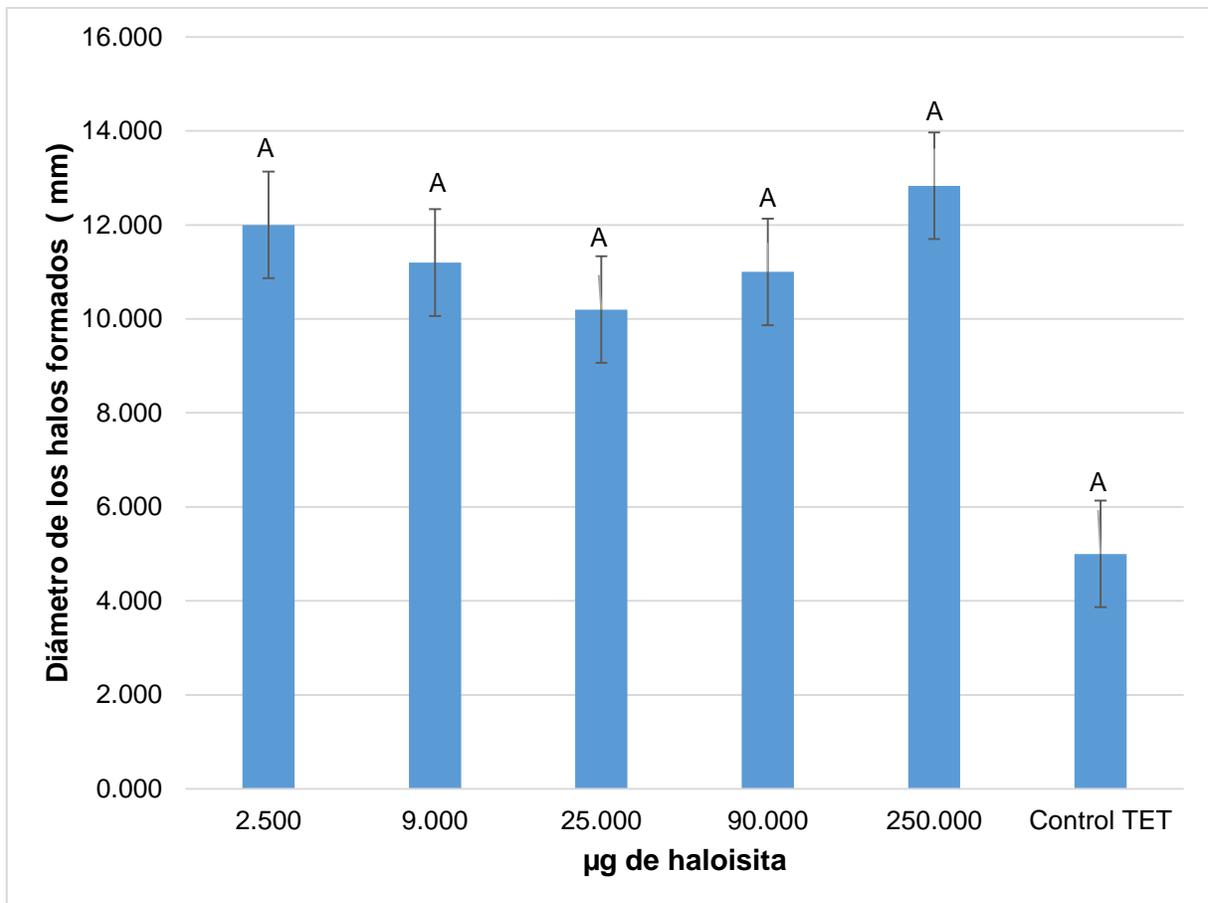
En la **Gráfica 1Q**. Se presentan los logaritmos de la media de los halos de inhibición formados (1.0791, 1.0492, 1.0086, 1.0413, 1.1083) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39), En la **Gráfica 1R**, se muestra el gráfico dosis respuesta para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 donde la ordenada y está dada por la **Ecuación 1**.

Donde:

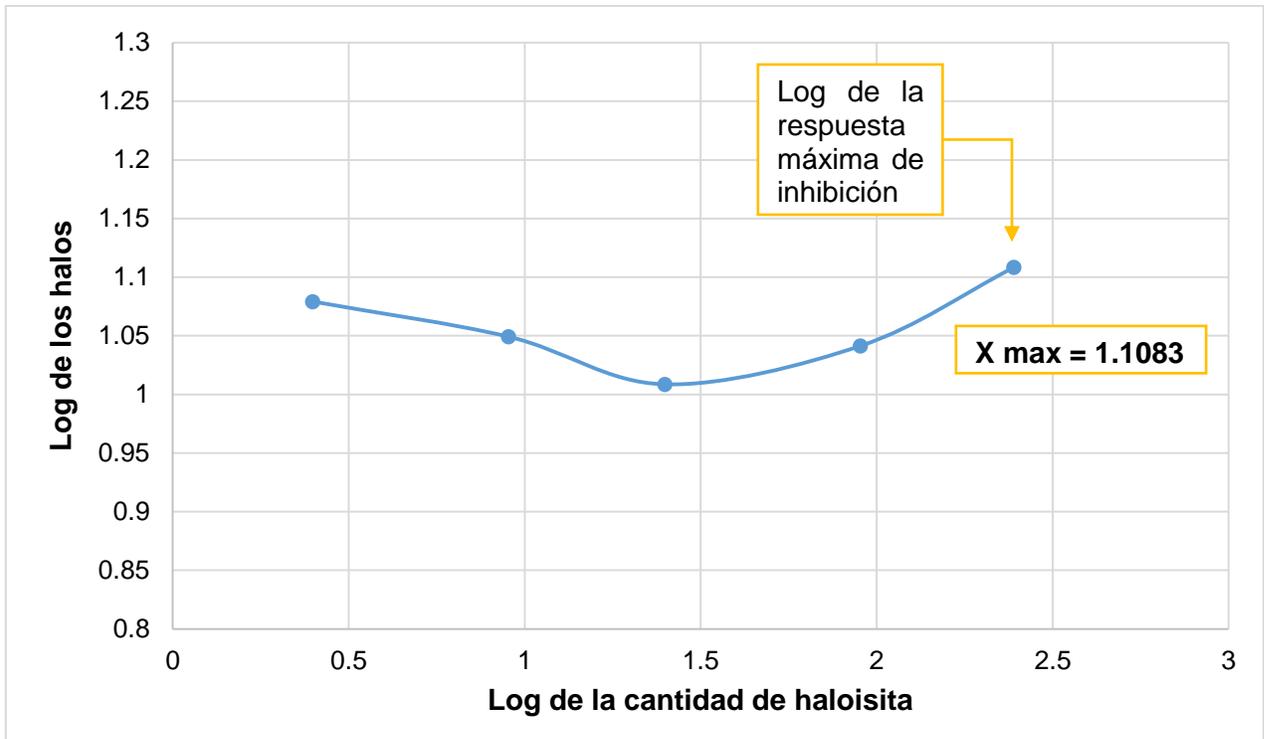
X_0 = logaritmo de los halos (1.0791, 1.0492, 1.0086, 1.0413)

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (1.1083)

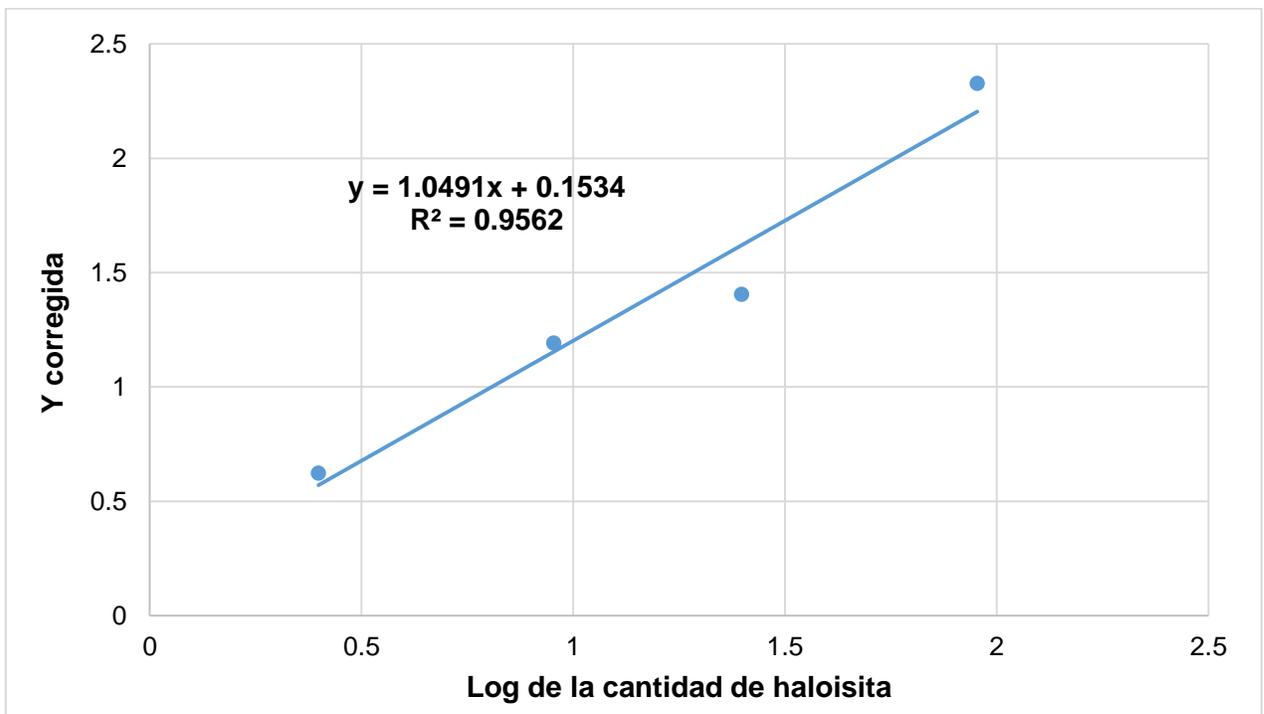
H= el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada para cada uno de los halos formados (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 1P. Efecto inhibitorio de la halosita probada en *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Cada punto representa la media de $n=7 \pm \text{SEM}$, literales diferentes $p < 0.05$, ANOVA bifactorial, seguida de una prueba Post hoc Bonferroni.



Gráfica 1Q. Log de la cantidad de haloisita vs log del diámetro de los halos para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.



Gráfica 1R. Dosis respuesta para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

ANEXO 2

Resultados de la actividad antimicrobiana de la haloisita por el método Macrodilución en agar

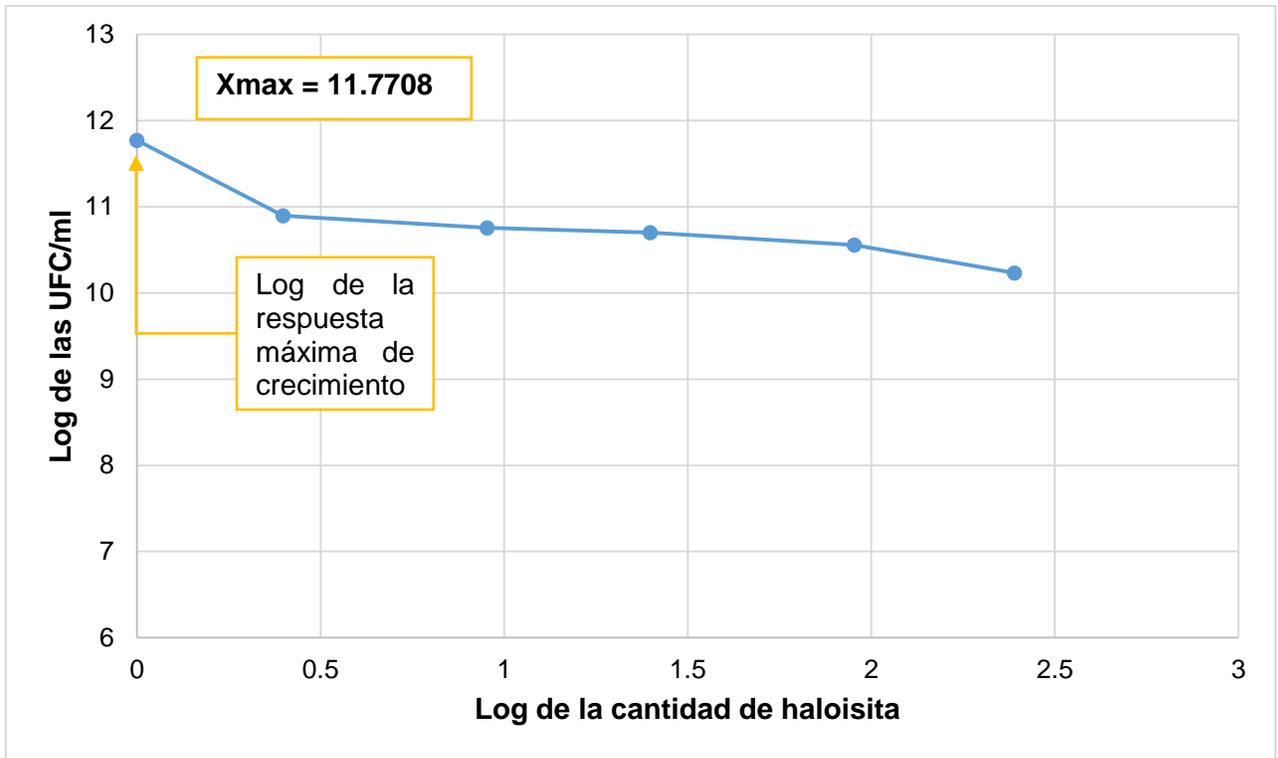
Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y el resto de cepas utilizadas en este estudio se emplearon las mismas cantidades de haloisita mencionadas en la parte de arriba por lo tanto en la **Gráfica 2E**, se presentan los logaritmos de la media en UFC/mL (11.7708, 10.8976, 10.7558, 10.6989, 10.5563, 10.2304) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita. En la **Gráfica 2F**, se muestra el gráfico dosis respuesta, donde la ordenada está dada por la siguiente **Ecuación 1**.

Donde:

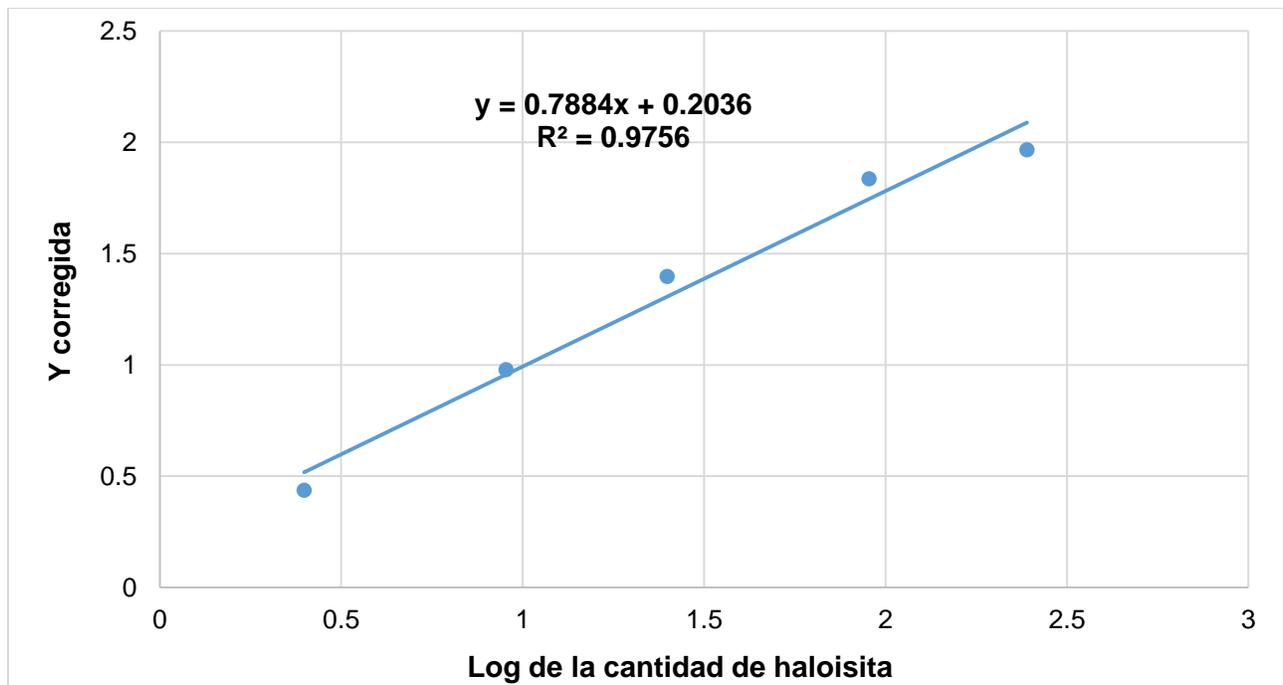
X_0 = logaritmo de la media las UFC/mL (10.8976, 10.7558, 10.6989, 10.5563, 10.2304)

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (11.7708)

H= el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 2E. Log de la concentración vs el log de las UFC/ml *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Gráfica 2F. Dosis respuesta para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

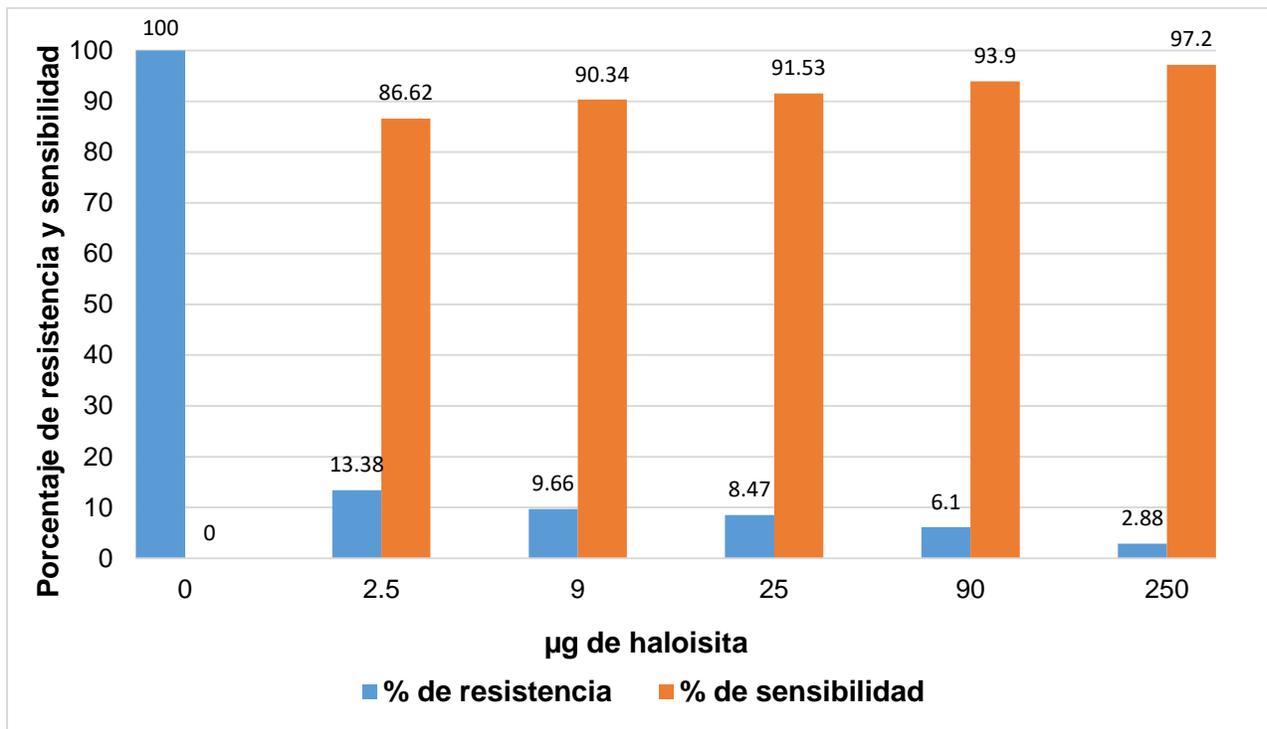
En la **Gráfica 2G** se muestra el perfil de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente a la haloisita, los cuales fueron calculados mediante las siguientes **Ecuaciones 2 y 3**:

Donde:

X_0 = Las UFC/mL para cada una de las cantidades de haloisita empleadas (5.9×10^{11} , 7.9×10^{10} , 5.7×10^{10} , 5×10^{10} , 3.6×10^{10} , 1.7×10^{10} UFC/mL).

X_{max} = Las UFC/mL en el blanco (5.9×10^{11} UFC/mL).

Los porcentajes de resistencia para cada una de las cantidades de haloisita empleadas para el estudio (100.0, 13.4, 9.7, 8.5, 6.1, 2.8 %) mientras que los porcentajes de sensibilidad para cada una de las cantidades de haloisita (0.0, 86.6, 90.3, 91.5, 93.9, 97.2%).



Gráfica 2G. Perfil de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a haloisita natural.

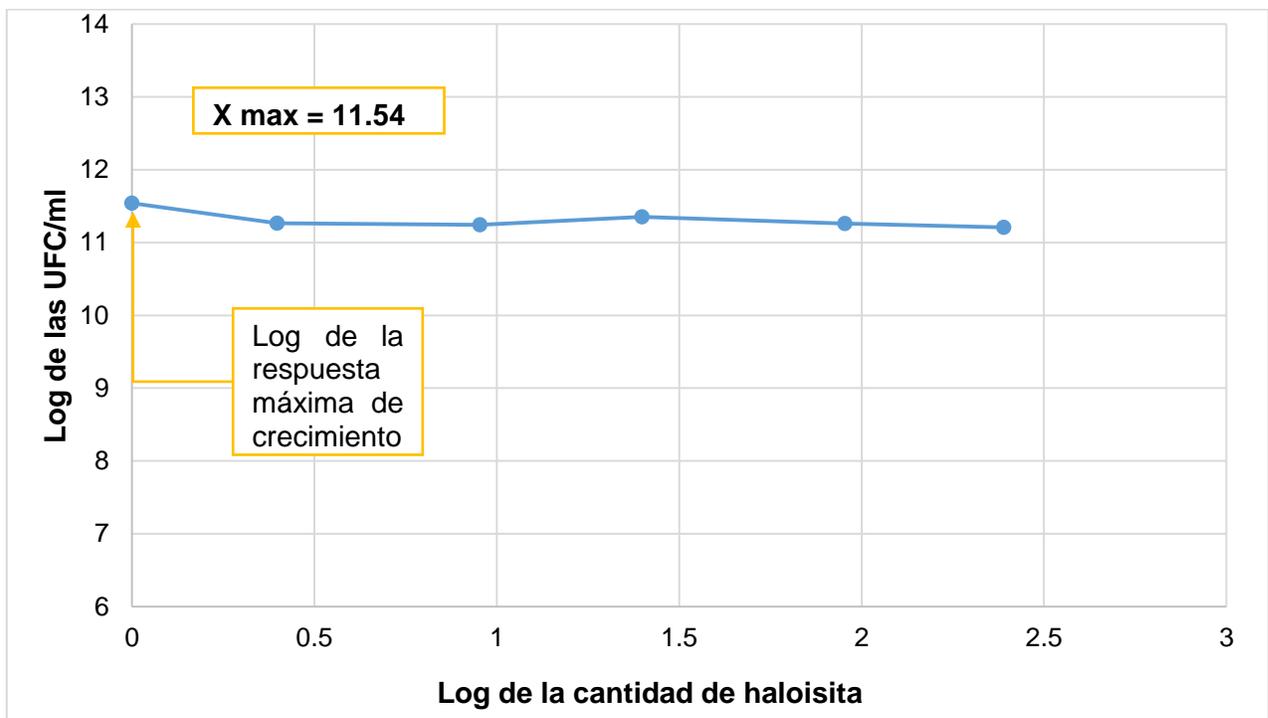
Para *Escherichia coli* ATCC 25922 en la **Gráfica 2H**, se presentan los logaritmos de la media en UFC/mL (11.54, 11.2671, 11.243, 11.3521, 11.26, 11.2095) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita, En la **Gráfica 2I**, se muestra el gráfico dosis respuesta, la ordenada está dada por la **Ecuación 1**.

Donde:

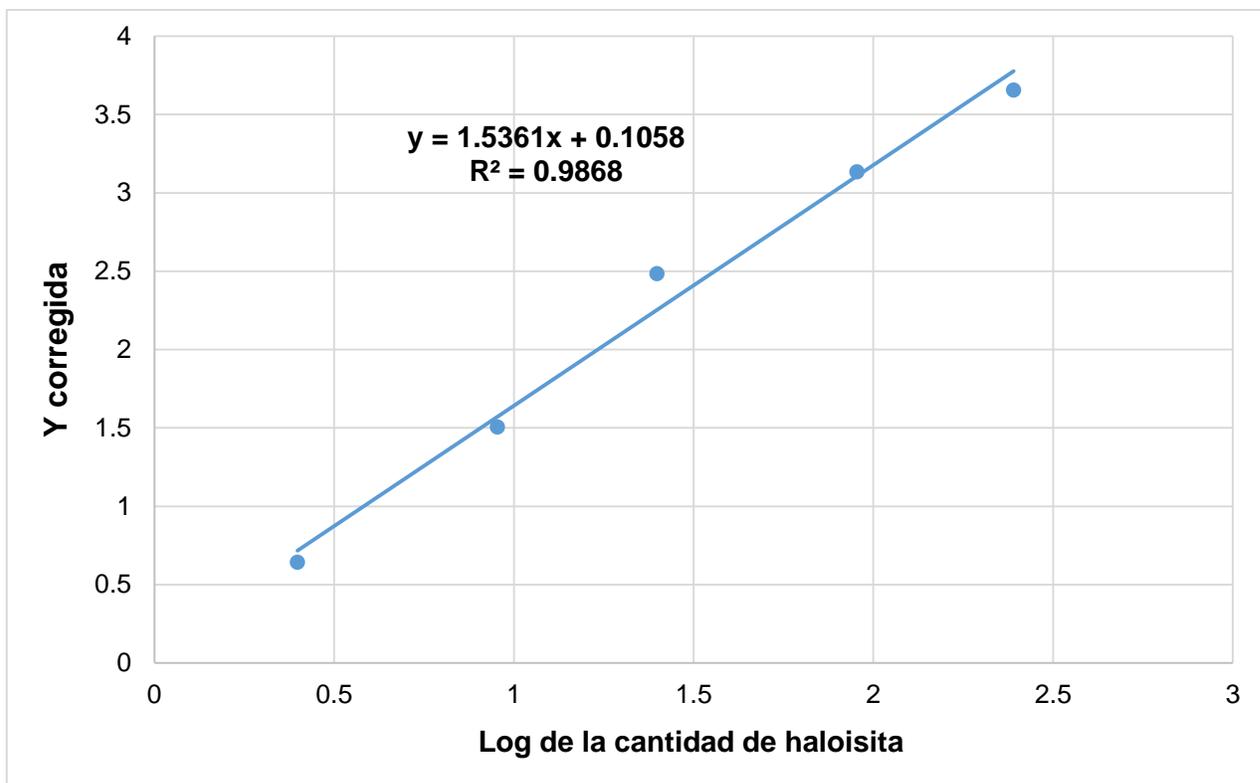
X_0 = logaritmo de la media las UFC/mL (11.2671, 11.243, 11.3521, 11.26, 11.2095)

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (11.54,)

H= el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 2H. Log de la concentración vs el log de las UFC/ml *Escherichia coli* ATCC 25922.



Gráfica 2I. Dosis respuesta para *Escherichia coli* ATCC 25922.

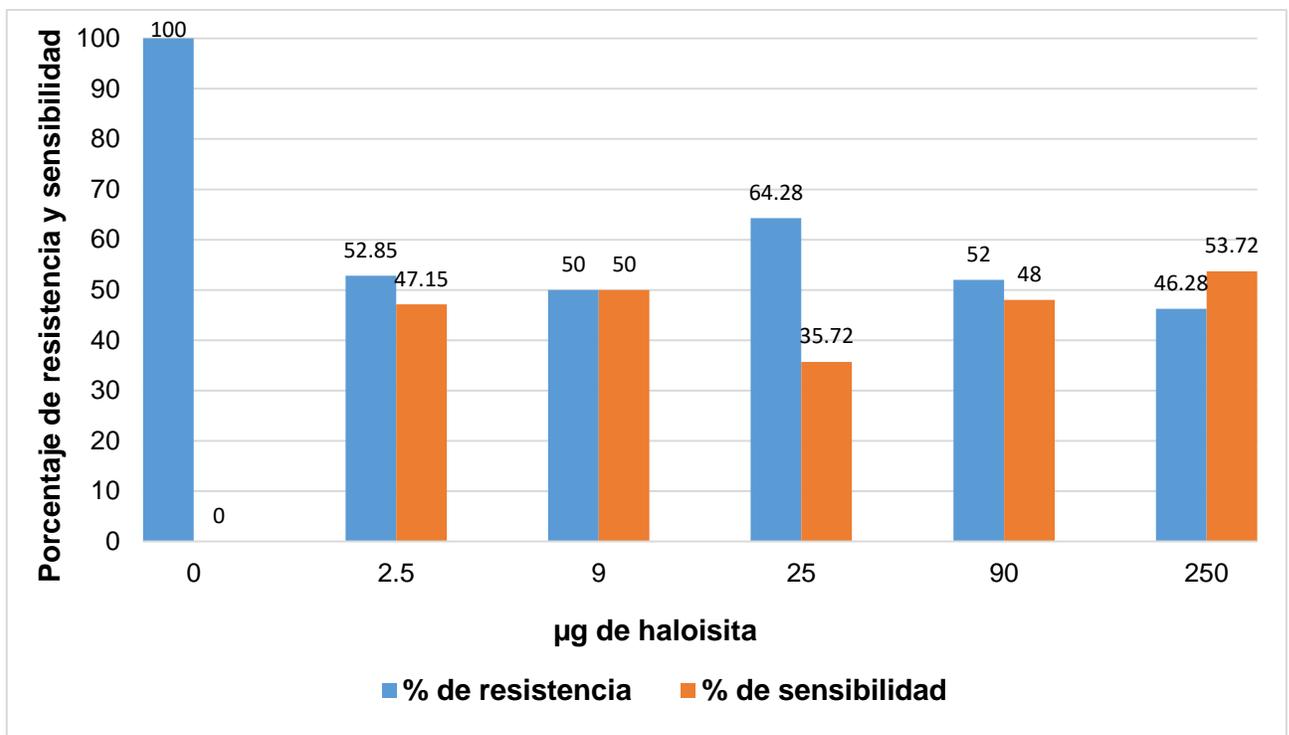
En la **Gráfica 2J.** se muestra el perfil de sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a la haloisita, los cuales fueron calculados mediante las siguientes **Ecuaciones 2 y 3:**

Donde:

X_0 = Las UFC/mL para cada una de las cantidades de haloisita empleadas (3.5×10^{11} , 1.85×10^{11} , 1.75×10^{11} , 2.25×10^{11} , 1.82×10^{11} , 1.62×10^{11} UFC/mL).

X_{max} = Las UFC/mL en el blanco (3.5×10^{11} UFC/mL).

Los porcentajes de resistencia para cada una de las cantidades de haloisita empleadas para el estudio (100.0, 52.85, 50.0, 64.28, 52.0, 48.28 %) mientras que los porcentajes de sensibilidad para cada una de las cantidades de haloisita (0.0, 47.15, 50.0, 35.72, 48.0, 53.72 %).



Gráfica 2J. Perfil de sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922 a haloisita natural.

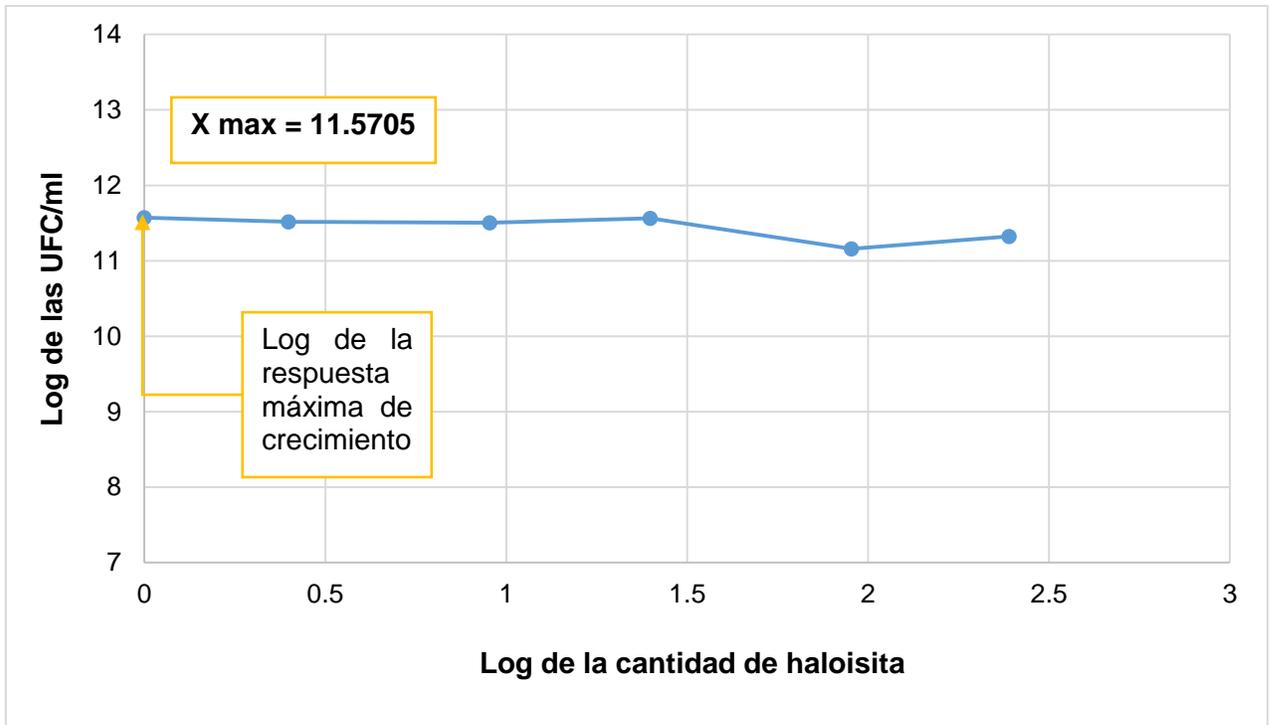
Para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 en la **Gráfica 2K**. Se presentan los logaritmos de la media las UFC/mL (11.5705, 11.5158, 11.5051, 11.5634, 11.1583, 11.3242) en función de los logaritmos de las cantidades de haloisita. En la **Gráfica 2L**, se muestra el gráfico dosis respuesta, donde la ordenada está dada por la siguiente **Ecuación 1**.

Donde:

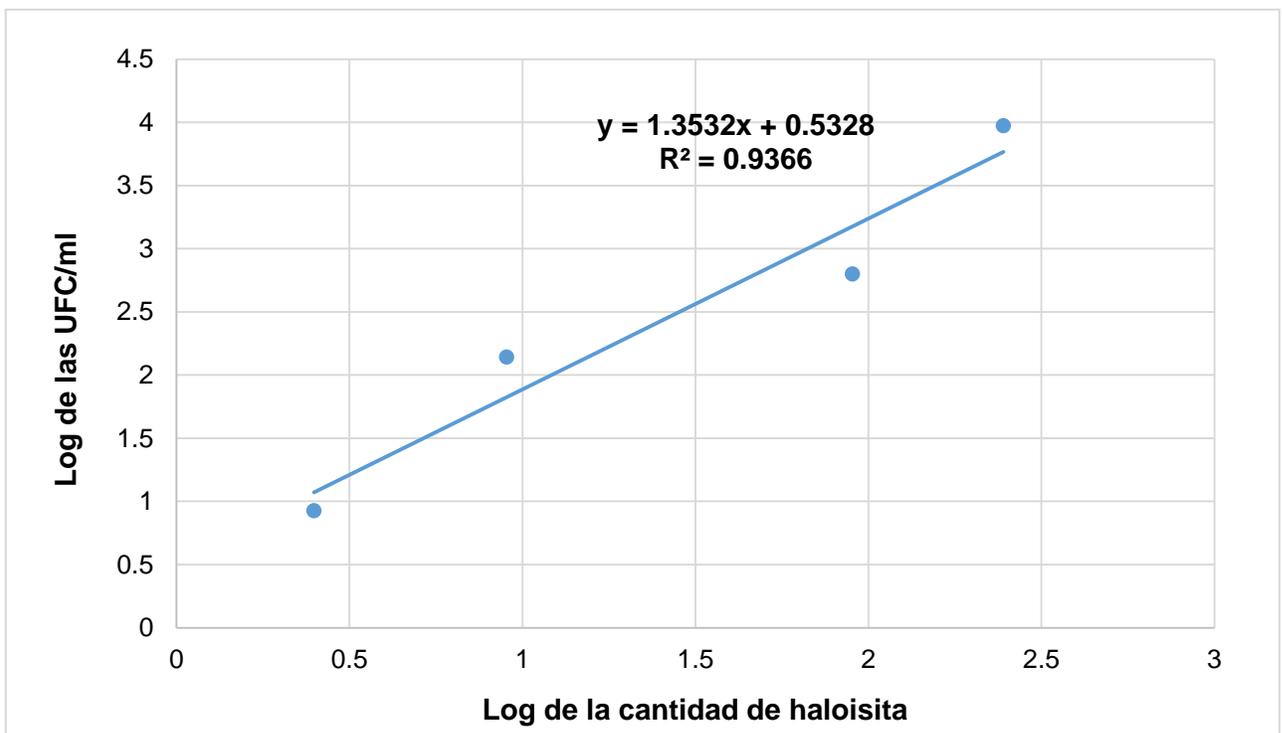
X_0 = logaritmo de la media las UFC/mL (11.5158, 11.5051, 11.5634, 11.1583, 11.3242)

X_{max} = El log valor de la máxima respuesta (11.5705)

H = el logaritmo de la cantidad de haloisita empleada (0.3979, 0.9542, 1.3979, 1.9542, 2.39).



Gráfica 2K. Log de la concentración vs el log de las UFC/ml *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.



Gráfica 2L. Dosis respuesta para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

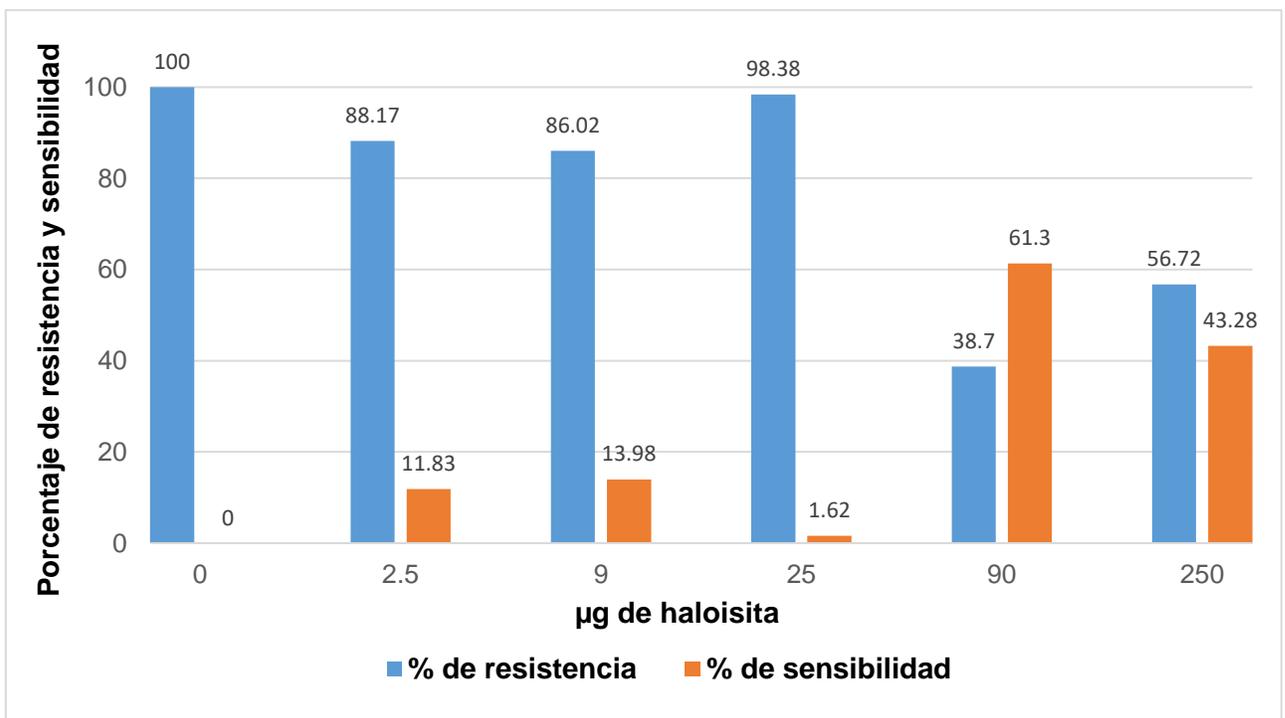
En la **Gráfica 2M** se muestra el perfil de sensibilidad de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 frente a la haloisita, los cuales fueron calculados mediante las siguientes **Ecuaciones 2 y 3**:

Donde:

X_0 = Las UFC/mL para cada una de las cantidades de haloisita empleadas (3.72×10^{11} , 3.28×10^{11} , 3.2×10^{11} , 3.66×10^{11} , 1.44×10^{11} UFC/mL, 2.11×10^{11} UFC/mL).

X_{max} = Las UFC/mL en el blanco (3.72×10^{11} UFC/mL).

Los porcentajes de resistencia para cada una de las cantidades de haloisita empleadas para el estudio (100.0, 88.17, 86.02, 94.38, 38.7, 56.72 %) mientras que los porcentajes de sensibilidad para cada una de las cantidades de haloisita (0.0, 11.83, 13.98, 1.62, 61.3, 43.28 %).



Gráfica 2M. Perfil de sensibilidad de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 a haloisita natural.