



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**FARNESOL Y FARNESENO FRENTE A LA
MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

AXEL RODRIGO MOLINA GALLARDO

TUTORA:

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA,

ESTADO DE MÉXICO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A mi familia, especialmente a mis padres que con mucho sacrificio siempre me dieron las herramientas para poder alcanzar mis metas y objetivos. A mi mamá con la que siempre estaré eternamente agradecido por siempre apoyar mis sueños e inspirarme a ser una mejor persona y un gran profesional día tras día; por estar en mis noches de desvelo, estrés, frustración, tristeza, y enfermedad, pero también por estar en mis momentos felices, risas alegrías y celebraciones. Soy el hijo, hermano y tío mas afortunado de este universo y no cambiaría absolutamente nada de ustedes porque gracias a ello soy la persona que soy.

A Snuky y Cookie, por ser siempre mi apoyo mas fiel, leal e incondicional demostrándome su amor puro.

A la doctora Tzasna Hernández, por toda la sabiduría, paciencia y cariño que le aportó a mi vida, por brindarme grandes oportunidades de poder trabajar en lo que me apasiona y además, por ser una gran amiga. Que la vida la siga llenando de cosas maravillosas, merece todo lo bueno que esta vida le pueda dar.

A mis amigos Yoali, Ashley, Abraham y Daniela, gracias por todas las experiencias y aventuras, siempre están en mi corazón y me da muchísimo gusto poder crecer con ustedes.

Por último pero no menos importante, a todas las personas que colaboraron en este trabajo, doctores y compañeros estudiantes, gracias por todo el conocimiento práctico y teórico, pero sobre todo, la compañía en el laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	8
JUSTIFICACIÓN	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Análisis bibliográfico	10
2. Obtención de los compuestos	11
3. Bioensayos	11
4. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	11
5. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	12
6. Determinación del efecto antibiofilm	12
7. Determinación de la sensibilización de resistencia a antibióticos	12
8. Efecto de los productos naturales y sus mezclas sobre la curva de crecimiento bacteriano	12
9. Análisis de resultados	13
10. Docking molecular	13
RESULTADOS	13
Análisis bibliográfico	13
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	19
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	21
Determinación del efecto antibiofilm.....	22
Determinación de la sensibilización de resistencia a antibióticos.....	23
Efecto de los productos naturales y sus mezclas sobre la curva de crecimiento bacteriano	26
Docking molecular.....	29
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	45
APÉNDICES	46
Apéndice 1.- Catálogo bibliográfico	46
Apéndice 2.- Estructuras químicas de los compuestos a emplear	51
Apéndice 3.- Método de difusión en agar de Kirby-Bauer.....	52
Apéndice 4.- Técnica de microdilución en caldo	53
Apéndice 5.- Evaluación del efecto antibiofilm.....	54
Apéndice 6.- Determinación de la sensibilización a la resistencia.....	55
Apéndice 7.- Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento.....	56
REFERENCIAS	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.-	Estudios realizados sobre las propiedades farmacológicas del farnesol	8
Cuadro 2.-	Actividad antibacteriana cualitativa de los diferentes compuestos	19
Cuadro 3.-	Resultados de la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana	21
Cuadro 4.-	CMI's y CBM de los antibióticos puros y en combinación con el farneseno	24
Cuadro 5.-	CMI's y CBM de los antibióticos puros y en combinación con el farnesol	25
Cuadro 6.-	Parámetros de afinidad molecular de los ligandos con las β -lactamasas de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Representación estructural de los diferentes isómeros del farnesol	6
Figura 2.-	Frecuencia de artículos publicados por base de datos	14
Figura 3.-	Frecuencia de trabajos publicados entre 2000 y 2019	14
Figura 4.-	Frecuencia de publicaciones por país	15
Figura 5.-	Porcentaje de publicaciones por su tipo de evaluación	16
Figura 6.-	Resultados de la evaluación del efecto antibiofilm del farneseno	22
Figura 7.-	Resultados de la evaluación del efecto antibiofilm del farnesol	23
Figura 8.-	Efecto del farneseno sobre la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922	26
Figura 9.-	Efecto del farneseno sobre la curva de crecimiento de <i>E. coli</i> MR 82	27
Figura 10.-	Efecto del farnesol sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 29213	28
Figura 11.-	Efecto del farnesol sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> MR 23	28
Figura 12.-	Acoplamiento molecular del complejo β -lactamasa (<i>S. aureus</i>)/farnesol	31
Figura 13.-	Representación 3D de las interacciones entre β -lactamasa (<i>S. aureus</i>)/farnesol	31
Figura 14.-	Esquema del acoplamiento molecular entre β -lactamasa (<i>S. aureus</i>)/farnesol	32
Figura 15.-	Acoplamiento molecular del complejo β -lactamasa (<i>S. aureus</i>)/cefuroxima	33
Figura 16.-	Representación 3D de las interacciones entre β -lactamasa (<i>S. aureus</i>)/cefuroxima	33
Figura 17.-	Esquema del acoplamiento molecular entre β -lactamasa (<i>S. aureus</i>)/cefuroxima	34
Figura 18.-	Acoplamiento molecular del complejo β -lactamasa (<i>E. coli</i>)/farneseno	35
Figura 19.-	Representación 3D de las interacciones entre β -lactamasa (<i>E. coli</i>)/farneseno	35
Figura 20.-	Esquema del acoplamiento molecular entre β -lactamasa (<i>E. coli</i>)/farneseno	36
Figura 21.-	Acoplamiento molecular del complejo β -lactamasa (<i>E. coli</i>)/cefepima	37
Figura 22.-	Representación 3D de las interacciones entre β -lactamasa (<i>E. coli</i>)/cefepima	37
Figura 23.-	Esquema del acoplamiento molecular entre β -lactamasa (<i>E. coli</i>)/cefepima	38

Resumen

La resistencia a antibióticos ha dirigido el interés científico al estudio de los productos naturales como una posible herramienta terapéutica para ralentizar esta creciente amenaza mundial. El farnesol y el farneseno han sido identificados como componentes del aceite esencial o el extracto vegetal de numerosas especies que son utilizadas en la medicina tradicional por sus propiedades farmacológicas. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana, antibiofilm y sensibilizadora de resistencia del farnesol y farneseno. La evaluación cualitativa se realizó por la técnica de difusión en agar de Kirby-Bauer en 2 cepas bacterianas Gram-positivas (una de catálogo y una multirresistente) y 2 cepas Gram-negativas (una de catálogo y una multirresistente). Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y el efecto sensibilizador se utilizó el método de microdilución en agar. Además, se determinó el efecto antibiofilm de los productos naturales, así como sobre la curva de crecimiento de una bacteria Gram-positiva y una Gram-negativa, para finalmente, proponer un posible mecanismo de acción mediante docking molecular.

El farneseno presentó actividad en todas las cepas bacterianas y, todas las combinaciones con los compuestos presentaron actividad, exceptuando la combinación con reserpina. Se estableció la CMI del farneseno en 1.5 mg/mL en todas las cepas bacterianas. A concentraciones subinhibitorias de farneseno ($\frac{1}{2}$ CMI), se observó una inhibición en la formación de biofilm superior al 30% en las cepas de *S. aureus* y superiores al 19% en cepas de *E. coli*. La combinación de farneseno con cefuroxima presentó la CMI más baja en la cepa de *E. coli* ATCC 25922 (CMI= 30 μ g/mL); mientras que la combinación de farneseno con cefepima presentó la CMI más baja en la cepa *E. coli* MR 82 (CMI= 0.47 μ g/mL).

El farnesol también presentó actividad en todas las cepas bacterianas y, todas las combinaciones con los compuestos presentaron actividad en todas las cepas, exceptuando la combinación con reserpina. Se estableció la CMI del farnesol en >5 mg/mL en todas las cepas bacterianas. A concentraciones subinhibitorias de farnesol ($\frac{1}{2}$ CMI), se observó una inhibición en la formación de biofilm superior al 23% en las cepas de *S. aureus* y superiores al 17% en cepas de *E. coli*. En la prueba de sensibilidad de resistencia, la combinación entre

cada antibiótico y el farnesol obtuvieron los valores más bajos de CMI (0.03 µg/mL respectivamente) en la cepa *S. aureus* MR 23.

Los resultados mostraron que la actividad de los productos naturales por sí solos es baja, sin embargo, en combinación con antibióticos aumentan su actividad potencialmente. Estos resultados revelan el potencial antibacteriano, antibiofilm y sensibilizador de resistencia del farneseno y farnesol para ser utilizados como una posible alternativa contra los procesos infecciosos causados por cepas resistentes.

Introducción

La introducción de la penicilina y otros antibióticos en el mundo clínico, hace unos 79 años, resultó en una reducción significativa de la muerte por infecciones bacterianas salvando millones de vidas. En consecuencia, se asumió que la alta mortalidad debida a enfermedades infecciosas sería cosa del pasado. Desafortunadamente, las emergencias de resistencia tardaron poco en ser publicadas siendo Abraham y Chain (1940) quienes describían por primera vez a la penicilinasas, que degrada la bencilpenicilina, y confiere resistencia a la penicilina. Desde entonces, el desarrollo de la resistencia se ha convertido en un factor importante en la lucha contra las enfermedades infecciosas. (Andersson y Hughes, 2010).

La resistencia a los antibióticos es un ejemplo de la enorme capacidad de evolución natural y adaptación de las cepas bacterianas a diferentes ambientes, utilizan su plasticidad genética para resistir el ataque de los antibióticos a través de mutaciones, adquisición de material genético y alteración de la expresión de su genoma (Sultan *et al.*, 2018).

De esta manera, las bacterias que sobreviven al ataque de un antibiótico se convierten en los precursores de las próximas generaciones bacterianas, agravando aún más el problema de la resistencia. Una vez que se adquieren los genes de resistencia a los antibióticos, pueden transmitirse de una bacteria a otra a través de procesos de división o por transferencia horizontal de genes (Daubin y Szollosi, 2016).

Aunque este proceso parece inevitable, los humanos lo han acelerado a través de diversas actividades antropogénicas; las causas detrás del aumento en el número de cepas bacterianas

resistentes a los antimicrobianos en los últimos años incluyen el mal uso de antibióticos en humanos y animales, el control inadecuado de infecciones en hospitales y clínicas o la falta de higiene y saneamiento, acompañado de que el problema se agrava a medida que hay una sequía en el descubrimiento de nuevos antibióticos (Hiltunen *et al.*, 2017).

Entre las bacterias resistentes, *Escherichia coli* es el patógeno bacteriano Gram-negativo más común, causando una amplia gama de enfermedades clínicas que afectan a todos los grupos de edad. *E. coli* habita principalmente en el tracto intestinal inferior de los seres humanos y otros animales de sangre caliente y se descarga al medio ambiente a través de las heces y las plantas de tratamiento de aguas residuales (Berthe *et al.*, 2013). Representa una colección diversa de cepas bacterianas que generalmente son comensales, pero también incluye patógenos que causan una variedad de enfermedades humanas, lo que resulta en más de 2 millones de muertes cada año (Kaper *et al.*, 2004).

Staphylococcus aureus es una de las principales causas de infecciones nosocomiales y el agente etiológico de una amplia gama de enfermedades asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas. Algunas de las enfermedades mediadas por esta especie incluyen endocarditis, osteomielitis, síndrome de shock tóxico, intoxicación alimentaria e infecciones de la piel, etc. Aquellas enfermedades que se deben a la colonización de dispositivos médicos implantados son particularmente problemáticas ya que proporcionan una ruta más allá de las defensas de barrera del cuerpo y una superficie para el crecimiento celular (Ando *et al.*, 2004). Esta capacidad de *Staphylococcus* spp. para adherirse y formar biopelículas multicapa en el tejido huésped y otras superficies es uno de los mecanismos importantes por los cuales pueden persistir en estas enfermedades (Beenken *et al.*, 2004).

Las biopelículas son comunidades de microorganismos asociados a la superficie incrustados en una matriz polimérica extracelular autoproducida que son notoriamente difíciles de erradicar y son una fuente de muchas infecciones recalcitrantes. Este modo de vida sésil proporciona a los microbios incrustados en biopelículas amplios nutrientes ambientales y protección contra el aclaramiento fagocítico del huésped, lo que limita en gran medida la capacidad del huésped para lidiar adecuadamente con la infección (Davey y O'Toole, 2000). Sin embargo, una consecuencia más importante del crecimiento de la biopelícula con profundas implicaciones clínicas es la resistencia marcadamente mejorada a los agentes

antimicrobianos, donde se estima que los microorganismos asociados a la biopelícula son de 50 a 500 veces más resistentes que sus contrapartes planctónicas (Stewart y Costerton, 2001).

En vista de este escenario, la investigación sobre terapias alternativas o complementarias a los antibióticos tradicionales ha surgido con fuerza. Los productos antimicrobianos de origen natural se han posicionado como compuestos de gran interés científico debido a su enorme variedad química y propiedades intrínsecas que han impulsado su estudio como posible herramienta terapéutica en los últimos años (Sultan *et al.*, 2018).

Los productos naturales (PN) constituyen un grupo heterogéneo de entidades químicas que poseen diversas actividades biológicas con diversos usos en campos como la medicina humana y veterinaria, la agricultura y la industria; una de las principales fuentes de PN antimicrobianos son las plantas que desde su aparición, han sobrevivido, evolucionado y adaptado a todo tipo de ecosistemas y condiciones adversas desarrollando sistemas de defensa complejos y eficaces frente a agresiones externas: depredadores, estrés abiótico y, por supuesto, infecciones (Muthamilarasan y Prasad, 2013).

Dentro del grupo de productos naturales, los aceites esenciales forman un conjunto de elementos con características singulares que los hacen destacar en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Son líquidos, volátiles, límpidos y raramente coloreados, solubles en lípidos y en disolventes orgánicos con una densidad generalmente menor que la del agua. Pueden ser sintetizados por todos los órganos vegetales, es decir, flores, hojas, tallos, semillas, frutos, raíces, madera o corteza, y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares (Roohinejad *et al.*, 2018).

Son mezclas naturales y complejas caracterizadas por un fuerte olor y están constituidas por metabolitos secundarios producidos por plantas aromáticas. Por lo general se obtienen por arrastre de vapor o hidro-destilación, método desarrollado por primera vez en la Edad Media por los árabes y, desde entonces han sido ampliamente utilizados para aplicaciones bactericidas, viricidas, fungicidas, antiparasitarias, insecticidas, medicinales y cosméticas; especialmente hoy en día en las industrias farmacéutica, sanitaria, cosmética, agrícola y alimentaria (Duarte *et al.*, 2018; Roohinejad *et al.*, 2018).

En la naturaleza, desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra herbívoros reduciendo su apetito por dichas plantas. También pueden atraer a algunos insectos para favorecer la dispersión del polen y semillas, o repeler potenciales depredadores (Amer y Mehlhorn, 2006a; 2006b).

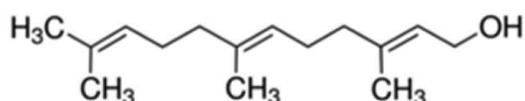
Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que pueden contener entre 20 y 60 componentes a concentraciones muy diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes principales a concentraciones bastante altas (20-70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades de trazas. Los componentes incluyen dos grupos de origen biosintético distinto: el grupo principal está compuesto por terpenos y terpenoides; el otro de componentes aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por bajo peso molecular (Pichersky *et al.*, 2006).

Los terpenos forman clases estructural y funcionalmente distintas, están hechos de combinaciones de varias unidades (5-carbon-base, C₅) llamadas isopreno. La biosíntesis de los terpenos consiste en la síntesis del precursor del difosfato de isopentenilo (IPP), la adición repetitiva de IPPs forma prenil difosfato, precursor de las diversas clases de terpenos; la modificación del prenil difosfato alílico por sintetasas específicas de terpenos forman el esqueleto de terpenos y, por último, hay modificación enzimática secundaria (reacción redox) del esqueleto para atribuir propiedades funcionales. Los principales grupos de terpenos son los monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅) y terpenoides que se denominan así a los terpenos que contienen oxígeno en su estructura química (Cal, 2006; Pichersky *et al.*, 2006).

El farnesol (C₁₅H₂₆O) es un compuesto orgánico natural, un alcohol sesquiterpeno acíclico que se encuentra distribuido en ciertos aceites esenciales de la familia Lamiaceae (Bozin *et al.*, 2006; Bagci *et al.*, 2019), Asteraceae, Poaceae (Duarte *et al.*, 2005), Pittosporaceae (Derengowski *et al.*, 2009), por mencionar algunas (Eslahi *et al.*, 2018).

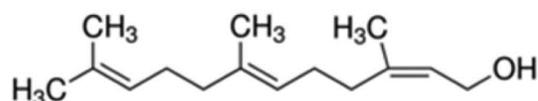
El nombre farnesol fue asignado por ser identificado por primera vez en las flores de *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn, conocidas como "acacia farnese", posteriormente el sufijo "ol" se agregó porque el compuesto químicamente es un alcohol (Trimble, 1885). Los cuatro isómeros geométricos del farnesol se han encontrado en la naturaleza y están disponibles comercialmente: *trans, trans*-Farnesol (CAS 106-28-5, Fig. 1A), *2-trans, 6-cis*-Farnesol (CAS 3879-60-5, Fig. 1B), *2-cis,6-trans*-Farnesol (CAS 3790-71-4, Fig. 1C) y *cis, cis*-Farnesol (CAS 16106-95-9, Fig. 1 D); también está disponible de manera comercial una mezcla de los isómeros (CAS 4602-84-0) (Pereira *et al.*, 2021).

(A)



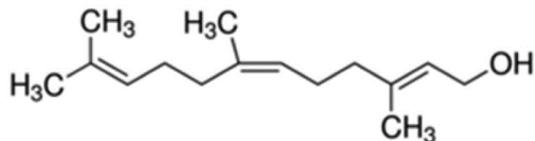
trans,trans-Farnesol (CAS 106-28-5)

(C)



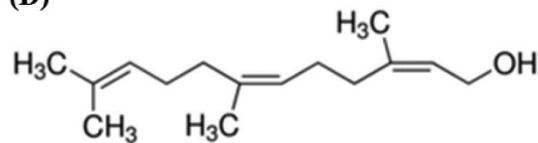
2-cis,6-trans-Farnesol (CAS 3790-71-4)

(B)



2-trans,6-cis-Farnesol (CAS 3879-60-5)

(D)



cis,cis-Farnesol (CAS 16106-95-9)

Figura 1.- Representación estructural de los diferentes isómeros geométricos del farnesol, así como sus códigos de identificación comercial.

Es una clase de compuesto producido naturalmente a partir del mevalonato, que forma parte de la ruta biosintética de esteroides altamente conservados. Los componentes derivados de esta vía a menudo actúan como moléculas de señalización que afectan la síntesis de lípidos, la síntesis y degradación de proteínas, el patrón de desarrollo, la meiosis y la apoptosis (Semighini *et al.*, 2006). Eslahi *et al.* (2018) señalan que el farnesol se genera dentro de las células mediante la desfosforilación enzimática del pirofosfato de farnesilo, compuesto que juega un papel importante como precursor de la prenilación de proteínas, una modificación de proteínas posterior a la traducción.

El término farneseno ($C_{15}H_{24}$) se refiere a un conjunto de seis compuestos sesquiterpénicos estrechamente relacionados; α -farneseno y β -farneseno son isómeros que se diferencian por la ubicación de un doble enlace; a su vez, la forma α puede existir como cuatro estereoisómeros que difieren acerca de la geometría de dos de sus tres enlaces dobles internos. Por otro lado, el isómero β existe como dos estereoisómeros sobre la geometría de su doble enlace central (Dewick, 2009).

Al igual que el farnesol, el farneseno tiene un origen a partir de la ruta biosintética del ácido mevalónico, se han identificado varios isómeros en aceites esenciales de las familias Lamiaceae (Bozin *et al.*, 2006; Bagci *et al.*, 2019), Lauraceae (Bruni *et al.*, 2004), Meliaceae (Hernández-Bastidas *et al.*, 2014), Asteraceae (Candan *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2005), Verbenaceae (Caroprese *et al.*, 2011), Euphorbiaceae (Grajales-Conesa *et al.*, 2016), entre otras; atribuyéndoles propiedades antimicrobianas, atrayentes, señalizadoras, hormonales, señalización de diversos grupos de artrópodos con una tendencia de realizar la polinización en plantas estrictamente dioicas, etc.

El creciente interés en el estudio de los terpenos se asocia con su potencial aplicación clínica, por las principales razones de que los terpenos muestran diferentes propiedades biológicas, que pueden ser útiles en diferentes tratamientos de enfermedades que afectan a los sistemas orgánicos, tales como: efectos antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antitumorales, antiparasitarios, hipoglucémicos, antiinflamatorios y analgésicos (Paduch *et al.*, 2007).

Ambos compuestos han sido descritos como ‘compuestos intermedios’ en la biosíntesis por distintas rutas de la mayoría de los sesquiterpenos, así como componentes de aceites esenciales y extractos vegetales con distintas propiedades farmacológicas, entre ellas destacan sus efectos antimicrobianos, por lo que, este trabajo se enfocó en evaluar el potencial antibacteriano de ambos productos naturales en cepas que presentan resistencia a algunos antibióticos, y con ello poder identificar su posible mecanismo de acción.

Antecedentes

Actualmente no hay registros que evalúen las propiedades farmacológicas del farneseno. Por otro lado, el farnesol ha sido investigado como un potencial antimicrobiano y algunos ejemplos se encuentran resumidos en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Estudios realizados sobre las propiedades farmacológicas del farnesol.

Autores	Resumen del estudio
Jabra-Rizk <i>et al.</i> , 2006	Evaluaron las propiedades del farnesol sobre cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina. Con ensayos de viabilidad, evaluación de la formación de biopelículas y pruebas de absorción de bromuro de etidio, se demostró que el farnesol inhibe la formación de biopelículas y compromete la integridad de la membrana celular. También se encontró que en combinación con gentamicina hay sinergia entre los compuestos y son capaces de reducir las poblaciones bacterianas.
Kim <i>et al.</i> , 2018	Evaluaron el efecto del farnesol en combinación con antibióticos β -lactámicos contra cepas resistentes a antibióticos encontrando que tiene una actividad antibacteriana pobre por sí mismo, pero potencia las actividades de la ampicilina y la oxacilina contra las cepas de <i>S. aureus</i> (incluida la <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina).
Pereira <i>et al.</i> , 2021	Evaluaron la CMI del farnesol contra 31 cepas bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas y 4 especies del género <i>Candida</i> encontrando que sólo las especies Gram-positivas presentaron susceptibilidad al <i>tt</i> -farnesol. También se observó que <i>tt</i> -farnesol inhibió la formación de biofilm, especialmente en cepas de <i>S.</i>

aureus resistentes a la meticilina (SARM), a concentraciones que oscilaron entre 2 µg/mL y 128 µg/mL. Además, en el estudio de acoplamiento molecular, la molécula de *tt*-farnesol demostró una notable afinidad de unión con importantes proteínas involucradas en la producción de biopelículas, como las proteínas IcaA y Srt.

Justificación

El uso excesivo y con frecuencia empírico de los antibióticos para el tratamiento de diferentes situaciones clínicas ha conducido a modificaciones de la ecología, morfología y fisiología bacteriana, atribuyéndoles caracteres que les han permitido evadir, combatir o diseminar los mecanismos de acción de los antibióticos más empleados en la medicina moderna. Por lo que es importante el evaluar el potencial antibacteriano de compuestos presentes plantas medicinales en cepas multirresistentes.

Objetivos

General

- Evaluar la actividad antibacteriana del farnesol y el farneseno frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* resistentes a cefuroxima y cefepima.

Particulares

- Analizar bibliografía enfocada en estudios de propiedades farmacológicas relacionadas con el farnesol y farneseno.
- Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de cada uno de los productos naturales, compuestos y sus mezclas (producto natural + cefuroxima o cefepima).

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de cada uno de los productos naturales.
- Determinar el efecto antibiofilm del farnesol y farneseno.
- Determinar la sensibilización de la resistencia a los antibióticos del farnesol y farneseno.
- Determinar el efecto de los productos naturales sobre la curva de crecimiento de una bacteria Gram-positiva y una Gram-negativa.
- Identificar el posible mecanismo de acción de los productos naturales mediante docking molecular.

Materiales y Métodos

1.- Análisis bibliográfico

Se realizó una búsqueda de artículos enfocados al estudio de “Propiedades farmacológicas de aceites esenciales, extractos vegetales o compuesto puro del farnesol y el farneseno” utilizando bases de datos electrónicas como Elsevier, SciELO, Wiley Online Library, ResearchGate, ACS Publications, NCBI, etc. Para la búsqueda se utilizaron las palabras clave: farnesol, farneseno, aceite esencial, extracto vegetal y sesquiterpeno.

Se seleccionaron los artículos que cumplieron con los siguientes criterios: 1) Si se trataba de la evaluación de un aceite esencial o extracto vegetal, que en la identificación de su composición química estuviera presente, por lo menos, uno de los dos compuestos en estudio; 2) Si se trataba del compuesto puro, se indicara de manera precisa la procedencia del compuesto.

Se construyó un catálogo bibliográfico (Apéndice 1) y una base de datos en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel, a partir de los criterios relacionados con los estudios seleccionados de los cuales se obtuvieron los datos de año, autor, país, base de datos, tipo de evaluación (Compuesto puro o aceite esencial/extracto vegetal), familia vegetal y aporte.

Para el análisis de los datos obtenidos de los artículos se realizó una tabla dinámica para la fácil agrupación de los datos en tablas y gráficas, presentando un análisis más claro de la información recolectada.

2.- Obtención de los compuestos

Los productos naturales farnesol (CAS 4602-84-0) y farneseno (CAS W383902); así como los compuestos ácido clavulánico (CAS 61177-45-5), reserpina (CAS 50-55-5), cefuroxima (CAS 56238-63-2) y cefepima (CAS 123171-59-5), se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Apéndice 2).

3.- Bioensayos

Los microorganismos que se utilizaron para evaluar la actividad antibacteriana fueron los siguientes:

Bacterias Gram positivas

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Staphylococcus aureus* MR 23, cepa multirresistente aislada de un caso clínico donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM).

Bacterias Gram negativas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Escherichia coli* MR 82, cepa multirresistente aislada de un caso clínico donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM).

4.- Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de los compuestos se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Bauer (Koneman, 1996). Se impregnaron sensidiscos con 15 µg/disco de cada compuesto [Ácido clavulánico, reserpina, cefuroxima y cefepima] y con 4 µL/disco de cada producto natural [3.548 mg de farnesol (**PN1**) y 3.252 mg de farneseno (**PN2**)]. De igual manera se evaluaron combinaciones de los compuestos con los

productos naturales [Ácido clavulánico + PN1 y PN2; reserpina + PN1 y PN2; cefuroxima + PN1 y PN2; y cefepima + PN1 y PN2]. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol. Cada bioensayo se realizó por triplicado en placas de agar Müeller-Hinton (Apéndice 3).

5.- Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se determinaron por medio de la técnica de microdilución en caldo (Picazo, 2000). Se utilizaron concentraciones de 5 a 0.125 mg/mL de los productos naturales. Como control positivo se utilizó cloranfenicol a diferentes concentraciones. Los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 4).

6.- Determinación del efecto antibiofilm

La evaluación del efecto antibiofilm se llevó a cabo por el método propuesto por Gómez-Sequeda y colaboradores en 2020, en el cual se evaluaron la ½ CMI, CMI y CBM de los productos naturales, además de un testigo; y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector ELISA de microplacas. Cada ensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

7.- Determinación de la sensibilización de resistencia a antibióticos

La evaluación del efecto sensibilizador de los productos naturales a la resistencia a antibióticos se llevó a cabo por medio de la técnica modificada de microdilución en caldo (Picazo, 2000). Se utilizaron concentraciones de 120 a 0.03 µg/mL de los antibióticos en mezcla con una concentración subinhibitoria (½ CMI) de 50 µL/mL de los productos naturales (Apéndice 6).

8.- Efecto de los productos naturales y sus mezclas sobre la curva de crecimiento bacteriano

La evaluación del efecto de los productos naturales y las combinaciones más activas sobre las curvas de crecimiento se llevó a cabo por el método propuesto por Kubo y colaboradores

en 1996 (modificado por Ávila en 1996), en el cual se evaluaron 2 cepas bacterianas multirresistentes y 2 cepas de catálogo frente a las CMI's de los productos naturales, los antibióticos y la combinación más activa entre estos dos anteriores, además de un testigo; contabilizando el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en 24 horas divididas en 7 tiempos (Apéndice 7).

9.- Análisis de resultados

A los resultados obtenidos de los bioensayos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial, siendo los factores: tratamientos (cada uno de los compuestos y sus mezclas) y las cepas microbianas (Durán *et al.*, 2004).

10.- Docking molecular

El docking molecular se realizó mediante el uso del software AutoDock 4.2, la cristalografía de las estructuras de las proteínas involucradas en la resistencia se obtuvo del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) de los trabajos de Celia y Chen (1992) y, de Oliver y Paetzer (2008). La estructura de los productos naturales y los compuestos se obtuvieron del PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Resultados

Análisis bibliográfico

- **Tendencias bibliográficas**

Se seleccionaron 15 artículos para el estudio sobre las propiedades farmacológicas relacionadas con los compuestos farnesol y farneseno, todos ellos publicados en revistas de circulación nacional o internacional.

Los trabajos seleccionados de la búsqueda se ubicaron en 7 bases de datos. La base de datos con el mayor número de artículos seleccionados fue Elsevier con el 36% de las publicaciones, seguido por ResearchGate con un 29% y finalmente NBCI con un 14% (Figura 2).

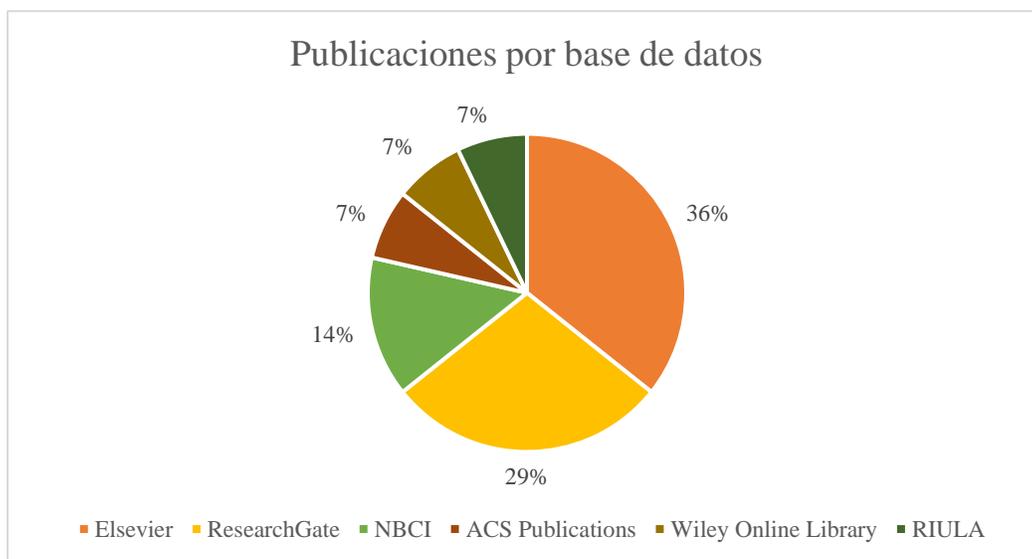


Figura 2.- Frecuencia de artículos publicados por base de datos.

Los trabajos seleccionados fueron publicados entre los años 2000-2019 (Figura 3), con mayor incidencia de publicación en los años 2004, 2006 y 2016.



Figura 3.- Frecuencia de trabajos publicados entre 2000 y 2019.

En relación con la cantidad de artículos publicados respecto al país, se determinó que el país con mayor número de publicaciones del tema evaluado es Turquía con el 20%, seguido por Brasil y Estados Unidos con el 13% cada uno, los demás países cuentan con una publicación cada uno (Figura 4).



Figura 4.- Frecuencia de publicaciones por país.

En cuanto al tipo de evaluación, se observó que un 47% de los estudios evaluaron el compuesto puro, mismo porcentaje que refleja la cantidad de trabajos que evaluaron al farnesol, siendo este compuesto comúnmente evaluado de manera individual; mientras que los trabajos restantes (53%) evaluaron aceites esenciales de distintas especies y familias de los cuales, presentaban en distinto porcentaje y forma al farneseno y en pocas ocasiones, al farnesol (Figura 5).

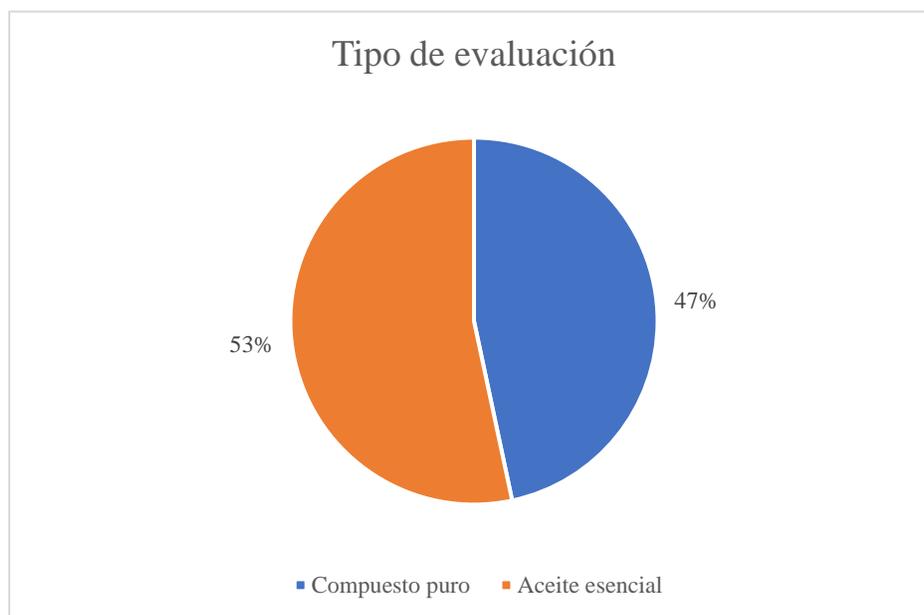


Figura 5.- Porcentaje de publicaciones por su tipo de evaluación.

- **Actividad antimicrobiana**

Inoue *et al.* (2004) evaluaron los efectos antibacterianos de 3 terpenos en *S. aureus*, entre ellos el farnesol; con análisis de toxicidad y midiendo la fuga de iones K^+ por la membrana celular, el cual se ha identificado como el principal mecanismo de acción de los terpenos. Observaron que el farnesol era el compuesto con mayor actividad antibacteriana, así como el más tóxico dañando la membrana celular dejando libres a los iones K^+ interfiriendo directamente en la bomba sodio – potasio, así como en la traducción en la síntesis de proteínas y, consecuentemente, ocasionando la inhibición del crecimiento en las cepas. Este estudio igual demostró que la medición de iones K^+ es un método efectivo para correlacionar la inhibición bacteriana de compuestos hidrofóbicos. Igualmente apoya la actividad sinérgica de los terpenos con otros compuestos ya que cuando se evalúa un aceite esencial, éstos

compuestos actúan como un medio de entrada para otras moléculas que no pueden atravesar ni atacar la membrana celular.

Resultados similares obtuvieron Constantino y colaboradores en 2016, quienes sometieron a estudio la actividad antibacteriana antiestafilocócica del farnesol sobre superficies de Ti₆Al₄V, la cual es una aleación de titanio implantado en seres vivos, observando que una aguja impregnada con 30 mM de farnesol reducía en un 74% el desarrollo bacteriano en los fémures de rata, concluyendo que este compuesto disminuye la tasa de colonización de *S. aureus*.

Semighini *et al.* (2006) observó la actividad del farnesol secretado por *C. albicans* sobre el hongo *Aspergillus nidulans*, encontrando que además de su función de detección de quórum que regula la morfogénesis, también es empleado por *C. albicans* para reducir la competencia de otros microbios por medio de la desencadenación de rasgos morfológicos característicos de la apoptosis; experimentos adicionales sugieren que las mitocondrias y las especies reactivas de oxígeno (ROS) participan en la apoptosis inducida por farnesol. Específicamente reportan que el farnesol no bloquea la formación del tubo germinativo en este hongo, sin embargo, causa apoptosis de una manera que depende de la función mitocondrial, la producción de ROS y las señales de la proteína G heterotrimérica.

Posteriormente, Semighini *et al.* (2008) utilizando como antecedente principal al artículo anterior, demostraron que los efectos del farnesol sobre *Fusarium graminearum* se asemejaban a los que se caracterizaron previamente en *A. nidulans* (Semighini *et al.*, 2006). El tratamiento de *F. graminearum* con farnesol en medio líquido desencadenó rasgos morfológicos característicos de la apoptosis como la condensación nuclear, la fragmentación del ADN y la producción de ROS de forma mitocondrial dependiente. Además, también se encontraron efectos similares en medios sólidos, condiciones en las que el farnesol inhibe el crecimiento y desarrollo de *A. nidulans* y *F. graminearum*, apoyando la hipótesis de que ciertos hongos secretan farnesol como *C. albicans*, por ejemplo, para competir e inhibir el desarrollo de otros microorganismos.

Bajo la misma línea de investigación, en 2009, Derengowski y colaboradores evaluaron el efecto del farnesol sobre el crecimiento de *Paracoccidioides brasiliensis* con el objetivo de identificar el mecanismo de acción de este compuesto como referencia de que es producido

y secretado por *C. albicans* encontrando que: el farnesol actúa como un potente agente antimicrobiano contra *P. brasiliensis* y que, su actividad fungicida contra este patógeno probablemente esté asociada a la degeneración citoplasmática. También se observó que cuando la concentración del farnesol es demasiado baja para eliminar al microorganismo, en *P. brasiliensis* retarda el desarrollo del tubo germinativo.

Por otra parte, Bruni *et al.* (2004) en la evaluación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del aceite esencial de *Ocotea quixos* determinaron que dentro de su composición química se encuentra el farneseno en un porcentaje de 0.1, sugiriendo que actúa como molécula moderadora de la actividad de otras más abundantes. El aceite ejerció una capacidad relativamente buena para actuar como un donante no específico de átomos de hidrógeno o electrones cuando se comprobó mediante el ensayo de difenilpicrilhidrazilo, apagando el 52% de los radicales. También se comprobó la actividad antibacteriana del aceite esencial frente a cepas Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*) y Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*) al presentar un CMI de 0.24, 0.12, 0.12 y 0.049 mg/mL respectivamente. El aceite también mostró una actividad antifúngica dependiente de la dosis contra *C. albicans* (CMI 0.024 mg/mL), *Saccharomyces cerevisiae* (CMI 0.024 mg/mL), el fitopatógeno *Pythium ultimum* y el dermatofito *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 500 µg/mL se detiene el desarrollo en un 80 y 100% respectivamente.

Otros estudios con resultados similares son los presentados por Candan *et al.* (2003), Duarte *et al.* (2005) y Ozcan y Chalchat (2007).

Candan *et al.* (2003) confirmaron la actividad antimicrobiana del aceite esencial metanoico de la especie *Achillea millefolium* sobre cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens*, *C. albicans*, *Mycobacterium smegmatis*, *Acinetobacter lwoffii* y *C. krusei*, extracto en donde se encontraba el compuesto β-farneseno en un porcentaje de 0.3%; dicho aceite ha sido empleado en la medicina tradicional como cicatrizante de heridas, diurético, carminativo y regulador menstrual.

Duarte *et al.* (2005), dentro de su evaluación de actividad anti-Candida de plantas medicinales brasileñas, aportaron dos nuevos registros de componentes para dos distintas especies: identificaron, en el aceite esencial de *Anthemis nobilis*, al *trans*-β-farneseno en un porcentaje de 2.84%, a dicho aceite se le atribuyen propiedades antiespasmódicas y

digestivas. El segundo registro corresponde a la identificación en el aceite esencial de *Cymbopogon martini* del compuesto E-E-farnesol, dicho aceite ha sido empleado como antiséptico y repelente natural de mosquitos.

Ozcan y Chalchat (2007) reportan que el aceite esencial de las semillas de la zanahoria (*Daucus carota* L.) presenta en su composición química tres isómeros del farneseno: en el aceite esencial puro se presenta (Z, Z)- α -farneseno en un 5.86% y Z- α -farneseno en un 0.19%, sin embargo, en el aceite comestible se presenta el isómero E- β -farneseno en un 0.47%; a dichos aceites se les han atribuido propiedades diuréticas.

Contrariamente a estos estudios, Hernández-Bastidas *et al.* (2014) evaluaron la composición del aceite esencial de *Guarea guidonia* donde los mayores porcentajes pertenecen a la mayoría de los isómeros del farneseno correspondientes a (Z)- β -farneseno, (E)- β -farneseno, α -farneseno, (E)-(Z)-farneseno y (E)-(E)-farneseno en una proporción de 29.1, 10.3, 1.3, 6 y 3.5%. Este trabajo demuestra la diversidad de la composición de los compuestos en la misma especie ya que en todos los antecedentes utilizados, en ninguno hay presencia abundante de algún isómero de farneseno, representando que se trata de un compuesto que se da en algún tipo de estrés o sólo en condiciones específicas de clima favorable.

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos en las evaluaciones cualitativas de la actividad antibacteriana se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2.- Actividad antibacteriana cualitativa de los diferentes compuestos.

Compuestos	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	ATCC 29213	MR 23	ATCC 25922	MR 82
Compuestos puros				
Farneseno (PN1)	7.0±0.0	7.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
Farnesol (PN2)	6.0±0.0	6.0±0.0	7.0±0.0	6.0±0.0
Control positivo (Cloranfenicol)	22.0±0.0	22.0±0.0	22.0±0.0	22.0±0.0

Cefepima	20.0±0.00	NA	NA	NA
Cefuroxima	NA	NA	NA	NA
Ácido clavulánico	6.0±0.0	NA	NA	6.0±0.0
Reserpina	NA	NA	NA	NA
Combinaciones con farneseno				
PN1 + Control positivo (Cloranfenicol)	22.0±0.0	22.0±0.0	22.0±0.0	22.0±0.0
PN1 + Cefepima	20.0±0.0	10.0±0.0	7.0±0.0	10.0±0.0
PN1 + Cefuroxima	22.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	9.0±0.0
PN1 + Ác. clavulánico	7.0±0.0	8.0±0.0	6.0±0.0	9.0±0.0
PN1 + Reserpina	NA	NA	NA	NA
Combinaciones con farnesol				
PN2 + Control positivo (Cloranfenicol)	22.0±0.0	22.0±0.0	22.0±0.0	22.0±0.0
PN2 + Cefepima	6.0±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0	6.0±0.0
PN2 + Cefuroxima	20.0±0.0	9.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
PN2 + Ác. clavulánico	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
PN2 + Reserpina	NA	NA	NA	NA

Halos de inhibición en mm. Se reporta la media y la desviación estándar de 3 repeticiones. Concentraciones (por disco): Control (+) = cloranfenicol 25 µg, cefuroxima 15 µg, cefepima 15 µg, reserpina 15 µg, ácido clavulánico 15 µg, farnesol y farneseno 4 µL. NA= sin actividad.

Como se puede observar, en la mayoría de los casos los antibióticos puros no presentaron actividad o la actividad fue baja tanto en cepas Gram-positivas como Gram negativas, sin embargo, se puede observar que los productos naturales si presentaron actividad en todas las cepas. Por otro lado, se observa como en todas las combinaciones de los antibióticos y los productos naturales hay actividad en todas las cepas bacterianas exceptuando las combinaciones con reserpina.

Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

Una vez evaluada la actividad antibacteriana cualitativa de los compuestos puros y en combinaciones, se procedió a determinar la CMI y la CBM, observándose los resultados obtenidos en el Cuadro 3.

Cuadro 3.- Resultados de la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

Compuestos	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	ATCC 29213	MR 23	ATCC 25922	MR 82
Farneseno				
CMI	1.5	1.5	1.5	1.5
CBM	4	5	5	5
Farnesol				
CMI	>5	>5	>5	>5
CBM	>>5	>>5	>>5	>>5

Las concentraciones presentadas para CMI y CBM están representadas en mg/mL.

El farneseno presentó una CMI igual en todas las cepas evaluadas, esto sugiere que una concentración de 1.5 mg/mL de farneseno, se inhibe drásticamente el crecimiento bacteriano en poblaciones de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas de catálogo y resistentes.

Con respecto a las CBM's, en casi todas las cepas evaluadas fue de 5 mg/mL, exceptuando la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 la cual presentó una CBM de 4 mg/mL. Esto sugiere que se requieren esas concentraciones para poder eliminar el 99.9% de la población bacteriana.

De igual manera, el farnesol presentó la misma CMI para todas las cepas evaluadas, siendo una concentración mayor a 5 mg/mL la que inhibe drásticamente el crecimiento bacteriano de las cepas evaluadas. Se determinó que la CBM de farnesol para todas las cepas evaluadas era de una concentración mucho mayor a 5 mg/mL.

Evaluación del efecto antibiofilm

Una vez determinadas las CMI's y las CBM's de los productos naturales, se evaluó su actividad antibiofilm. Los resultados se observan en las Figuras 6 y 7.

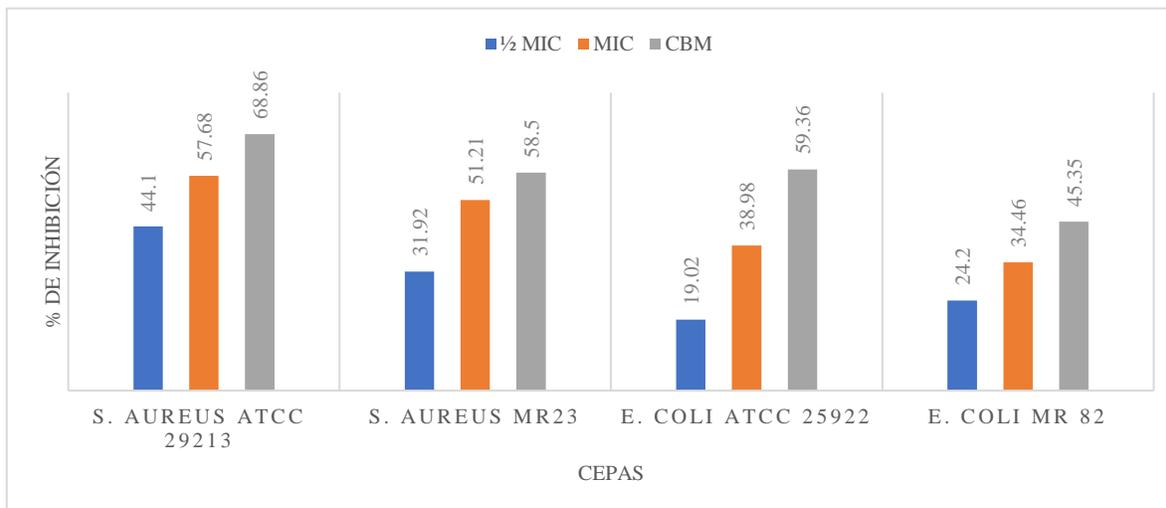


Figura 6.- Efecto antibiofilm del farneseno. Se presentan las medias de las tres repeticiones de los porcentajes de inhibición de la formación de biofilm.

Se puede observar que a una concentración subinhibitoria de farneseno ($1/2$ CMI) hay un porcentaje de inhibición en bacterias Gram-positivas del 44% en la cepa de catálogo y del 31% en la cepa resistente; y al evaluar la CBM, el porcentaje se eleva al 68% de inhibición en la cepa de catálogo y al 58% de inhibición en la cepa resistente.

Por otro lado, respecto a las bacterias Gram-negativas se observó que a una concentración subinhibitoria de farneseno ($1/2$ CMI) hay un porcentaje de inhibición del 19% en la cepa de catálogo y del 24% en la cepa resistente; y al evaluar la concentración bactericida mínima, el

porcentaje se eleva al 59% de inhibición en la cepa de catálogo y al 45% de inhibición en la cepa resistente.

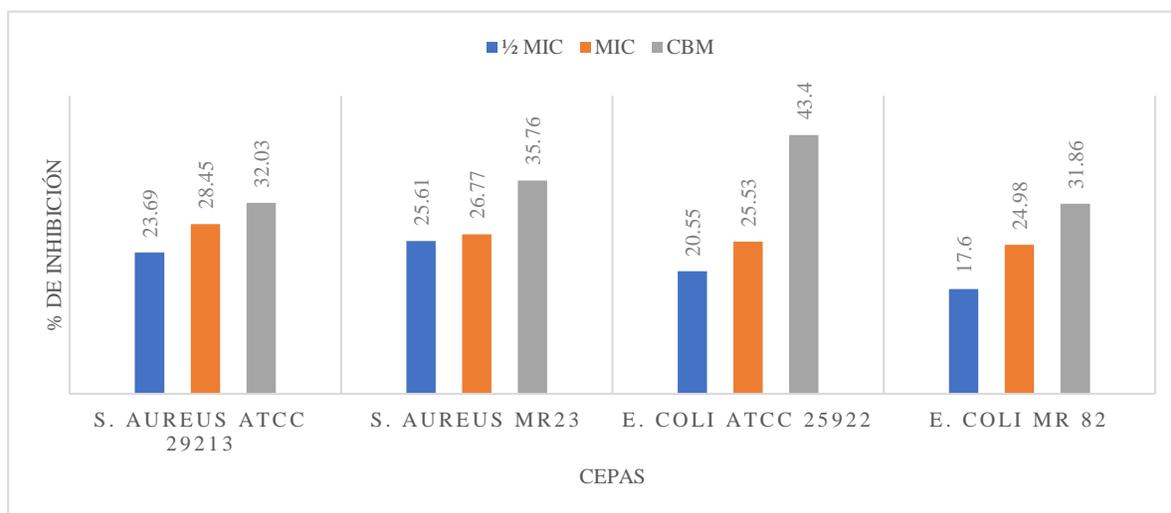


Figura 7.- Efecto antibiofilm del farnesol. Se presentan las medias de las tres repeticiones de los porcentajes de inhibición de la formación de biofilm.

Por otra parte, se determinó que a una concentración subinhibitoria de farnesol ($\frac{1}{2}$ CMI) hay un porcentaje de inhibición en bacterias Gram-positivas del 23% en la cepa de catálogo y del 25% en la cepa resistente; y al evaluar la CBM, el porcentaje se eleva al 32% de inhibición en la cepa de catálogo y al 35% de inhibición en la cepa resistente.

Asimismo, al evaluar la $\frac{1}{2}$ CMI en bacterias Gram-negativas, se observó una inhibición en la formación del biofilm del 20% y del 17% en la cepa de catálogo y la resistente respectivamente; en cuanto se aumentó la concentración a la determinada en CBM, se observó una inhibición del 43% y del 31% respectivamente.

Evaluación del efecto sensibilizador de resistencia

Por último, se evaluó el efecto sensibilizador de los productos naturales por medio de la determinación de la CMI y la CBM en combinación con los antibióticos susceptibles a la resistencia. Los resultados se muestran los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4.- CMI's y CBM de los antibióticos puros y en combinación con el farneseno.

Tratamiento	CMI antibiótico	CMI del PN	CMI de la combinación	CBM de la combinación
Cefuroxima				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15 µg	1.5 mg	15 µg	30 µg
<i>S. aureus</i> MR 23	15 µg	1.5 mg	15 µg	30 µg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	120 µg	1.5 mg	30 µg	60 µg
<i>E. coli</i> MR 82	120 µg	1.5 mg	120 µg	240 µg
Cefepima				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.9 µg	1.5 mg	0.9 µg	1.8 µg
<i>S. aureus</i> MR 23	0.9 µg	1.5 mg	0.9 µg	1.8 µg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.9 µg	1.5 mg	0.9 µg	1.8 µg
<i>E. coli</i> MR 82	0.9 µg	1.5 mg	0.47 µg	0.94 µg

Las concentraciones de todos los compuestos son expresadas en 1 mL de solución.

Del cuadro anterior se destaca que la CMI de la combinación entre la cefuroxima y el farneseno disminuyó 4 veces en su valor con respecto al efecto del antibiótico por sí solo, de un valor de 120 µg/mL disminuyó a 30 µg/mL, de igual manera se observa un valor bajo de CBM que corresponde a 60 µg/mL.

Por otro lado, con respecto al efecto con la cefepima, la cepa de *E. coli* resistente se puede observar como la combinación entre el antibiótico y el producto natural disminuyó la CMI de 0.9 µg/mL a 0.47 µg/mL, lo que corresponde a poco más de la mitad del valor original; se

igual manera se observa una CBM con un valor de 0.94 µg/mL, un valor similar a la CBM del antibiótico puro.

Cuadro 5.- CMI's y CBM de los antibióticos puros y en combinación con el farnesol.

Tratamiento	CMI del antibiótico	CMI del PN	CMI de la combinación	CBM de la combinación
Cefuroxima				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15 µg	>5 mg	0.93 µg	15 µg
<i>S. aureus</i> MR 23	15 µg	>5 mg	0.03 µg	0.06 µg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	120 µg	>5 mg	3.75 µg	7.5 µg
<i>E. coli</i> MR 82	120 µg	>5 mg	3.75 µg	7.5 µg
Cefepima				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.9 µg	>5 mg	0.9 µg	1.8 µg
<i>S. aureus</i> MR 23	0.9 µg	>5 mg	0.03 µg	0.06 µg
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.9 µg	>5 mg	0.9 µg	1.8 µg
<i>E. coli</i> MR 82	0.9 µg	>5 mg	0.06 µg	0.12 µg

Las concentraciones de todos los compuestos son expresadas en 1 mL de solución.

Por otra parte, el mayor efecto sensibilizador de la resistencia por parte del farnesol se observó en la combinación con cefuroxima en la cual la CMI de la combinación se estableció en 0.03 µg/mL y la CBM en 0.06 µg/mL en la cepa de *S. aureus* resistente.

El farnesol en combinación con cefepima también disminuyó la CMI de 0.9 µg del antibiótico solo a 0.03 µg en combinación con el producto natural en la cepa de *S. aureus* resistente. En

la cepa de *E. coli* resistente de igual manera la CMI del antibiótico solo disminuyó en comparación con la CMI de la combinación de un valor de 0.9 μg a 0.06 μg respectivamente.

Efecto de los productos naturales y sus mezclas en una curva de crecimiento bacteriano

Al identificar las combinaciones con mayor efecto en la prueba de sensibilidad, se procedió a evaluar la CMI de los antibióticos y de los productos naturales además de las combinaciones más activas sobre una curva de crecimiento bacteriano respectivamente, cuyos resultados se muestran de la Figura 8 a la 11.

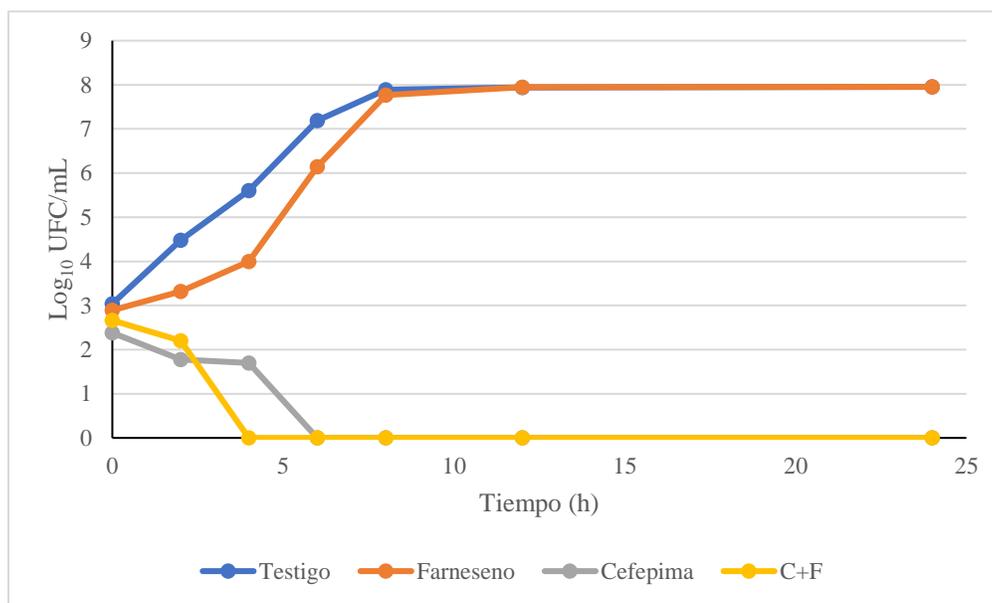


Figura 8.- Efecto del farneseno sobre la curva de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922. Las concentraciones empleadas fueron: 1.5 mg/mL (Farneseno), 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Cefepima) y 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefepima + 0.75 mg/mL de farneseno (C+F); El testigo no contenía ningún compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de UFC.

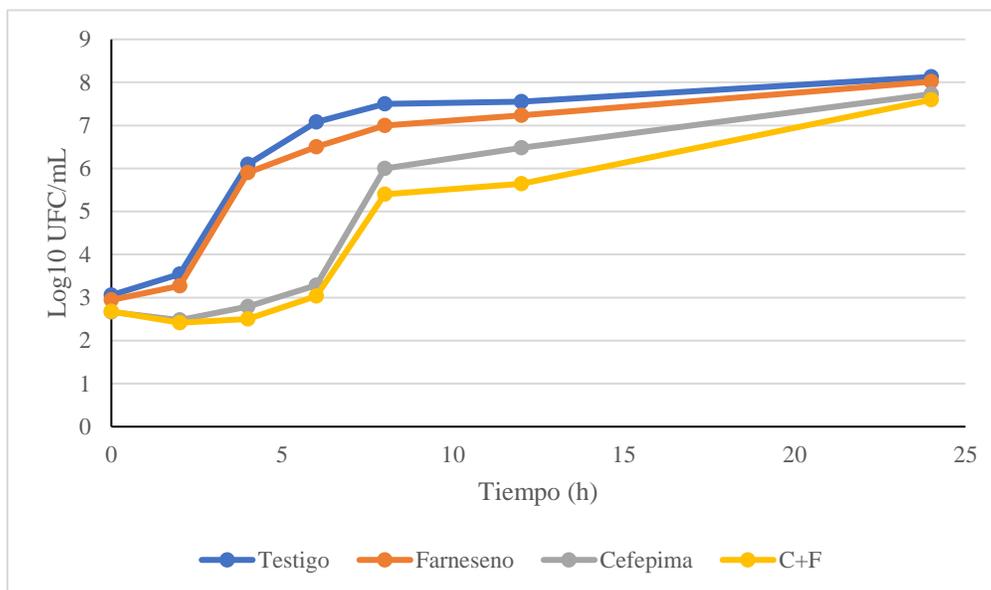


Figura 9.- Efecto del farneseno sobre la curva de crecimiento de *E. coli* MR 82. Las concentraciones empleadas fueron: 1.5 mg/mL (Farneseno), 0.9 µg/mL (Cefepima) y 0.9 µg/mL de cefepima + 0.75 mg/mL de farneseno (C+F); El testigo no contenía ningún compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de UFC.

El efecto observado en la cepa *E. coli* ATCC 25922 expuesta a cefepima y a una combinación entre cefepima y farneseno es de tipo bactericida, ya que los 2 tratamientos eliminan completamente a la población bacteriana, la combinación entre los compuestos lo hace a las 4 horas y la cefepima lo hace a las 6 horas. El tratamiento con farneseno disminuyó el crecimiento poblacional a las 2, 4 y 6 horas, sin embargo, posterior a las 8 horas seguía la tendencia del testigo.

Al evaluar los mismos tratamientos en la cepa *E. coli* MR 82 se observó que las tendencias cambiaron; el tratamiento de exposición a cefepima y a la combinación entre cefepima y farneseno tuvieron un efecto de tipo bacteriostático las primeras 6 horas, posterior a ese tiempo continuaron con un crecimiento similar al testigo, sin embargo, a lo largo de toda la curva se observa que la densidad poblacional es menor en el tratamiento de la combinación en comparación con el tratamiento del antibiótico solo. El tratamiento con farneseno mantuvo un crecimiento similar al testigo, pero con menor densidad poblacional.

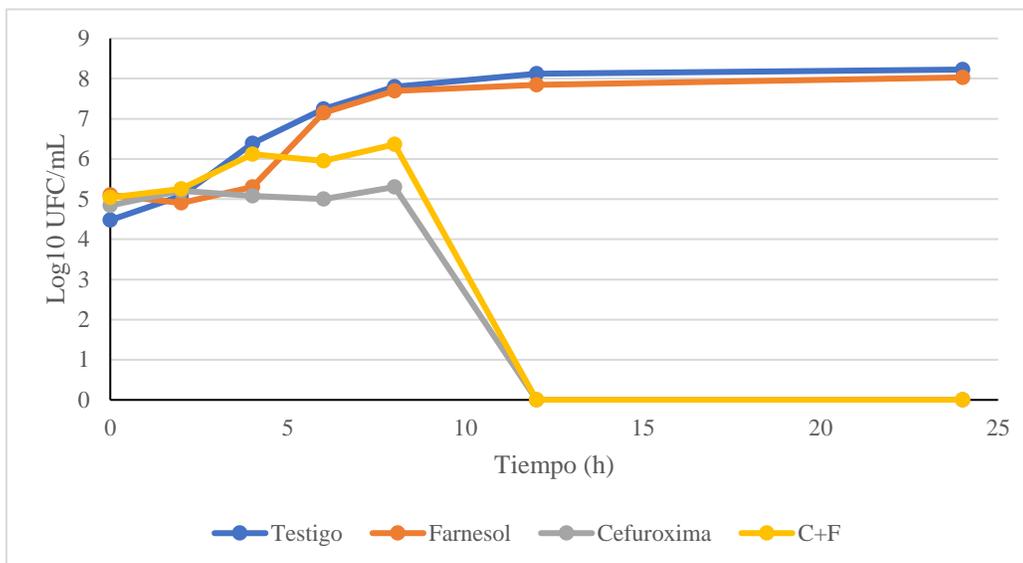


Figura 10.- Efecto del farnesol sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213. Las concentraciones empleadas fueron: 5 mg/mL (Farnesol), 15 µg/mL (Cefuroxima) y 15 µg/mL de cefepima + 2.5 mg/mL de farnesol (C+F); El testigo no contenía ningún compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de UFC.

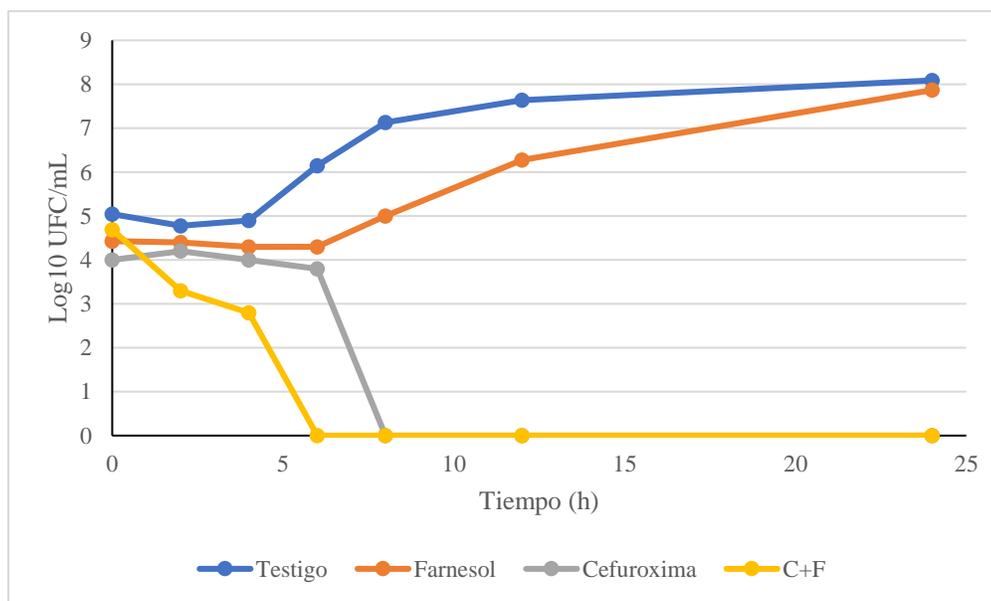


Figura 11.- Efecto del farnesol sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* MR 23. Las concentraciones empleadas fueron: 5 mg/mL (Farnesol), 15 µg/mL (Cefuroxima) y 15 µg/mL de cefepima + 2.5 mg/mL de farnesol (C+F); El testigo no contenía ningún compuesto. El número de sobrevivientes se calculó mediante el conteo de UFC.

El efecto observado en la cepa *S. aureus* ATCC 29213 expuesta a cefuroxima y a una combinación entre cefuroxima y farnesol es de tipo bactericida, ya que ambos tratamientos eliminan completamente a la población bacteriana a las 12 horas, sin embargo, se observa una menor densidad poblacional en el tratamiento de la cefuroxima en comparación con la combinación. El tratamiento con farnesol mantuvo un crecimiento similar al del testigo, pero con una menor densidad poblacional.

Para el caso de la cepa *S. aureus* MR 23 expuesta a los mismos tratamientos, se observó que los tratamientos de la exposición a cefuroxima y a una combinación entre cefuroxima y farnesol tenían un comportamiento bactericida, siendo la combinación la cual elimina la población bacteriana a las 6 horas de tratamiento, mientras que el tratamiento con el antibiótico solo elimina a la población hasta las 8 horas. El tratamiento con farnesol tuvo un efecto de tipo bacteriostático hasta las 6 horas del experimento, posterior a ese tiempo el crecimiento poblacional fue en aumento.

Docking molecular

Por último, a los tratamientos utilizados en las curvas de crecimiento bacteriano se les realizó un análisis de acoplamiento molecular utilizando el software AutoDock 4, cuyos resultados se resumen en el Cuadro 6 y se ilustran de la Figura 12 a la Figura 23.

Cuadro 6.- Parámetros de afinidad molecular de los ligandos con las β -lactamasas de *S. aureus* y *E. coli*.

Complejo (proteína-ligando)	Afinidad (kcal/mol)	K_i	Eficiencia del ligando	Residuos que interactúan a través de puentes de H⁺	Residuos que interactúan a través de interacciones pi - alquilo
<i>S. aureus</i> β-lactamasa (1BLC)					
1BLC/Farnesol	-4.88	0.26	-0.30	Ser173 y Ser176	Lys64, His43, Arg65, Pro174, Tyr172 y Tyr241
1BLC/Cefuroxima	-8.11	1.14	-0.28	Lys222, Lys215, Lys227, Val231 y Leu212	Lys230
<i>E. coli</i> β-lactamasa (3BLC)					
3BLC/Farneseno	-7.82	1.85	-0.52	-	Lys84, Ile78, Leu254, Pro306, Leu85, Pro303, Pro304 y Tyr259
3BLC/Cefepima	-7.01	7.27	-0.22	Leu99, Gln257 y His205	His205

K_i: constante de inhibición de conformación.

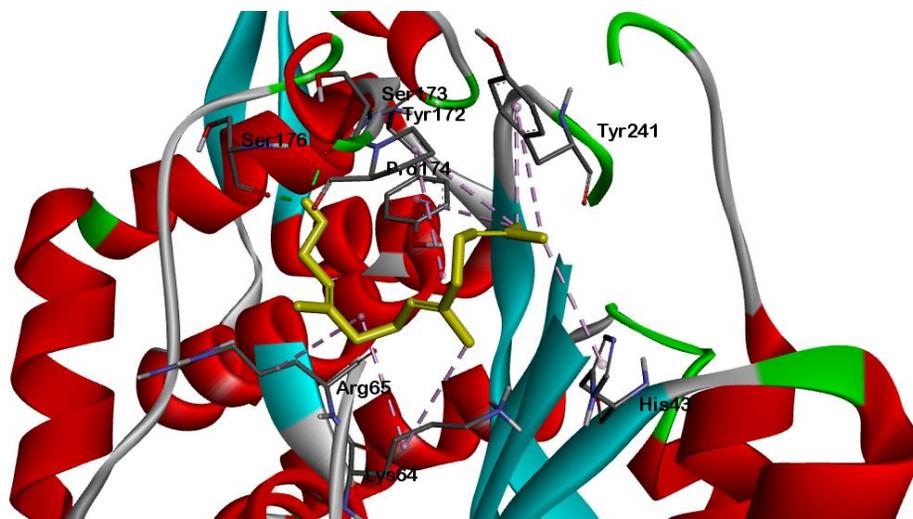


Figura 12.- Acoplamiento molecular del complejo enzima-ligando con la β -lactamasa de *S. aureus* como enzima y al farnesol como ligando (amarillo), ilustrando las distintas interacciones entre los átomos del ligando y residuos. Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas verdes (puentes de hidrógeno) y líneas moradas (interacciones pi – alquilo).

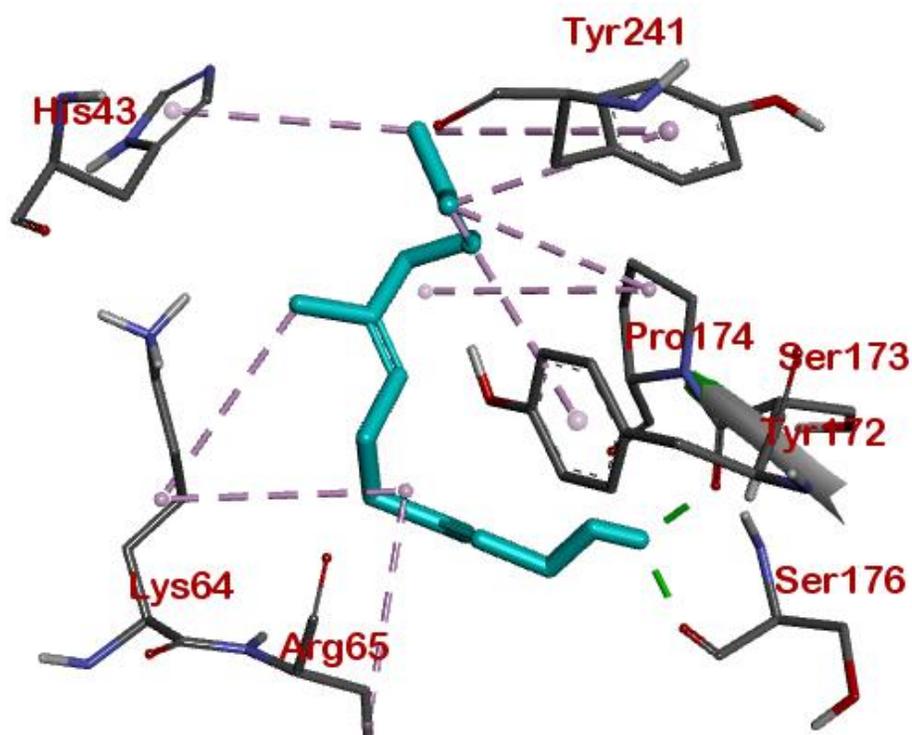


Figura 13.- Representación en 3D de las interacciones entre los residuos de la β -lactamasa de *S. aureus* y el farnesol (azul). Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas verdes (puentes de hidrógeno) y líneas moradas (interacciones pi – alquilo).

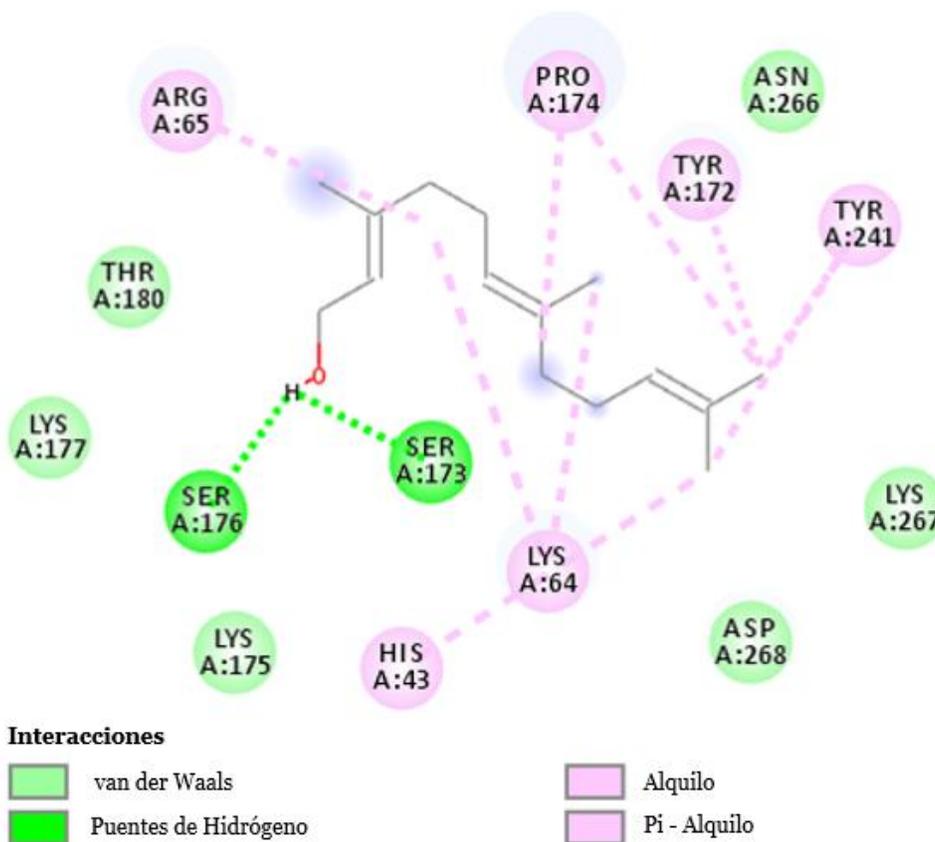


Figura 14.- Representación esquemática del acoplamiento molecular entre la β -lactamasa de *S. aureus* y el farnesol.

En el complejo 1BLC/Farnesol se observó la afinidad con una energía de unión igual a -4.88 kcal/mol y una constante de inhibición de 0.26 (Cuadro 6). Se observa que el ligando no interactúa de ninguna manera con algún residuo del sitio activo de la enzima por lo tanto se comporta como un inhibidor no competitivo.

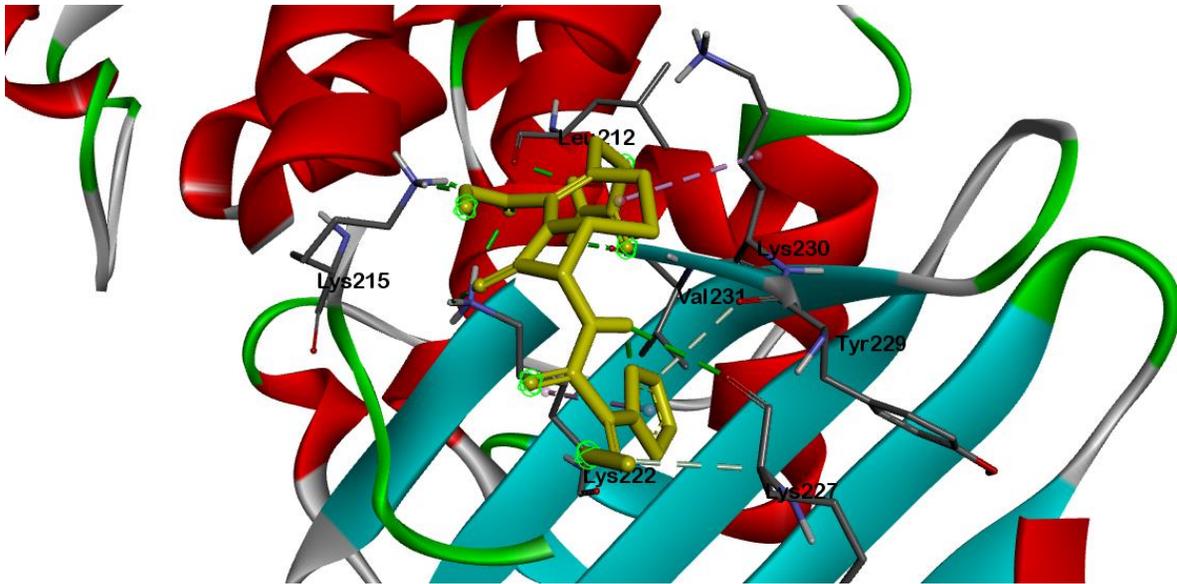


Figura 15.- Acoplamiento molecular del complejo enzima-ligando con la β -lactamasa de *S. aureus* como enzima y a la cefuroxima como ligando (amarillo), ilustrando las distintas interacciones entre los átomos del ligando y residuos. Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas verdes (puentes de hidrógeno) y líneas moradas (interacciones pi – alquilo).

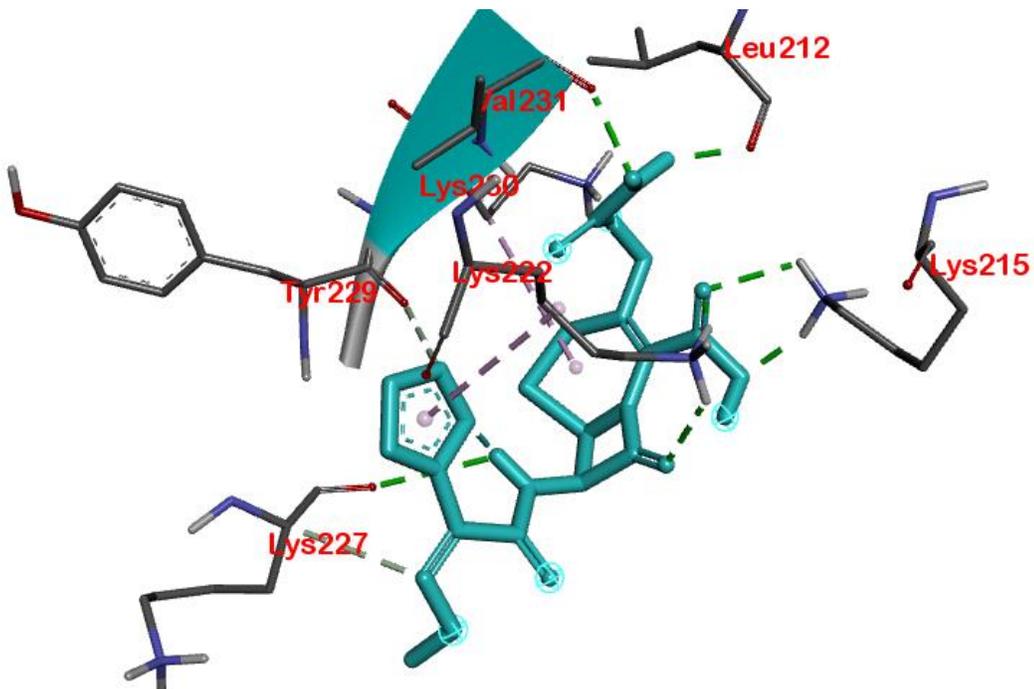


Figura 16.- Representación en 3D de las interacciones entre los residuos de la β -lactamasa de *S. aureus* y la cefuroxima (azul). Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas verdes (puentes de hidrógeno) y líneas moradas (interacciones pi – alquilo).

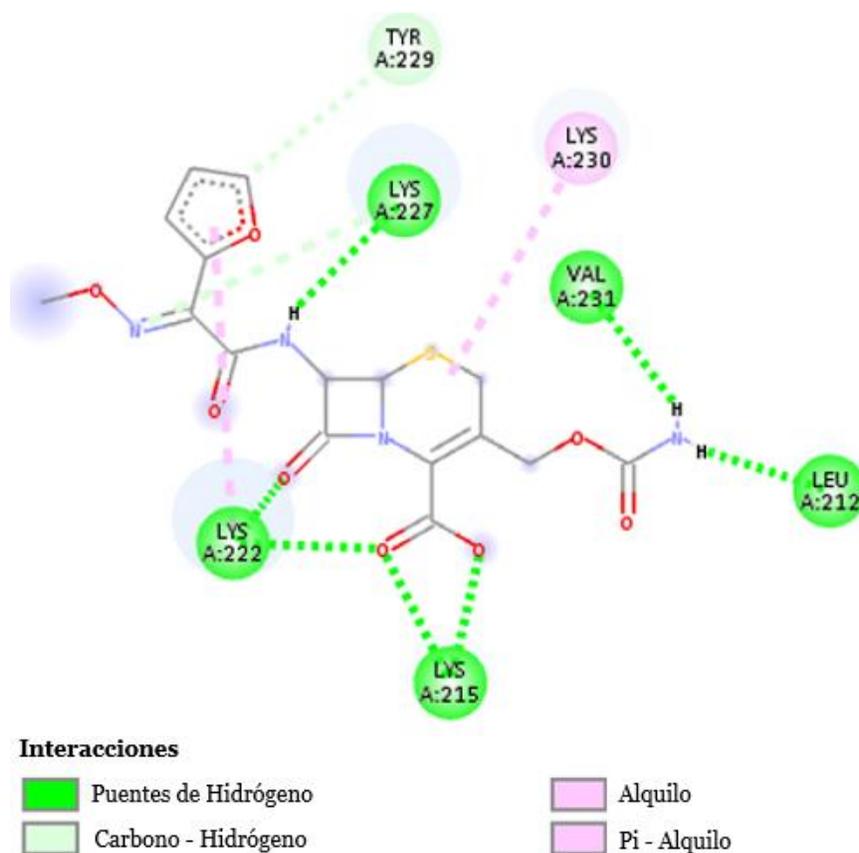


Figura 17.- Representación esquemática del acoplamiento molecular entre la β -lactamasa de *S. aureus* y la cefuroxima.

En el complejo 1BLC/Cefuroxima se observó la afinidad con una energía de unión igual a -8.11 kcal/mol y una constante de inhibición de 1.14 (Cuadro 6). Se observa que el ligando no interactúa de ninguna manera con algún residuo del sitio activo de la enzima, comportándose de la misma manera que el farneseno, como un inhibidor no competitivo.

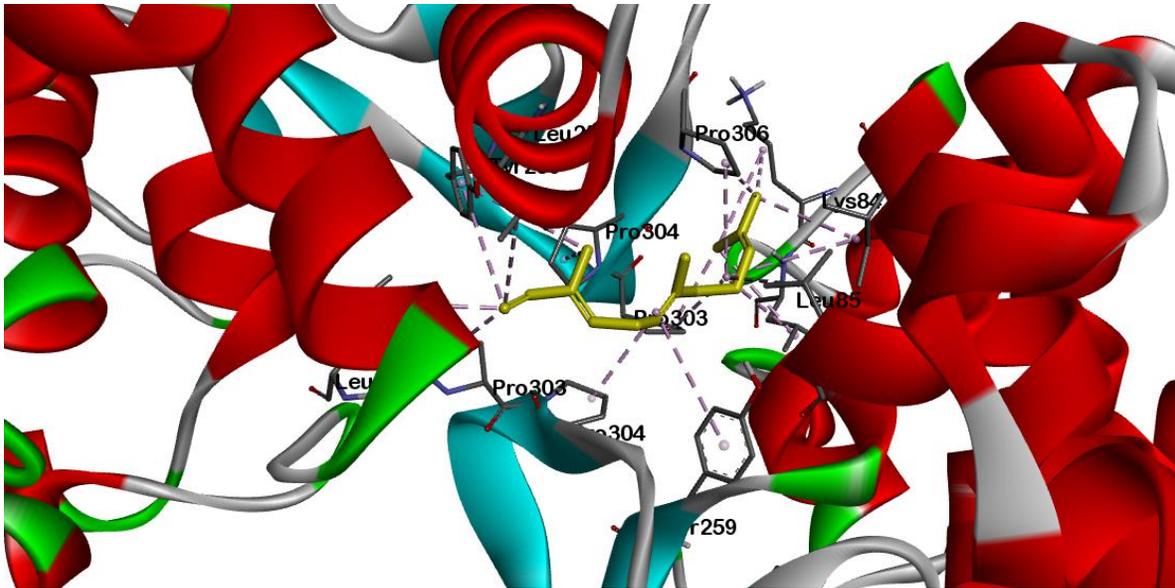


Figura 18.- Acoplamiento molecular del complejo enzima-ligando con la β -lactamasa de *E. coli* como enzima y al farneseno como ligando (amarillo), ilustrando las distintas interacciones entre los átomos del ligando y residuos. Se representan en líneas moradas las interacciones pi – alquilo.

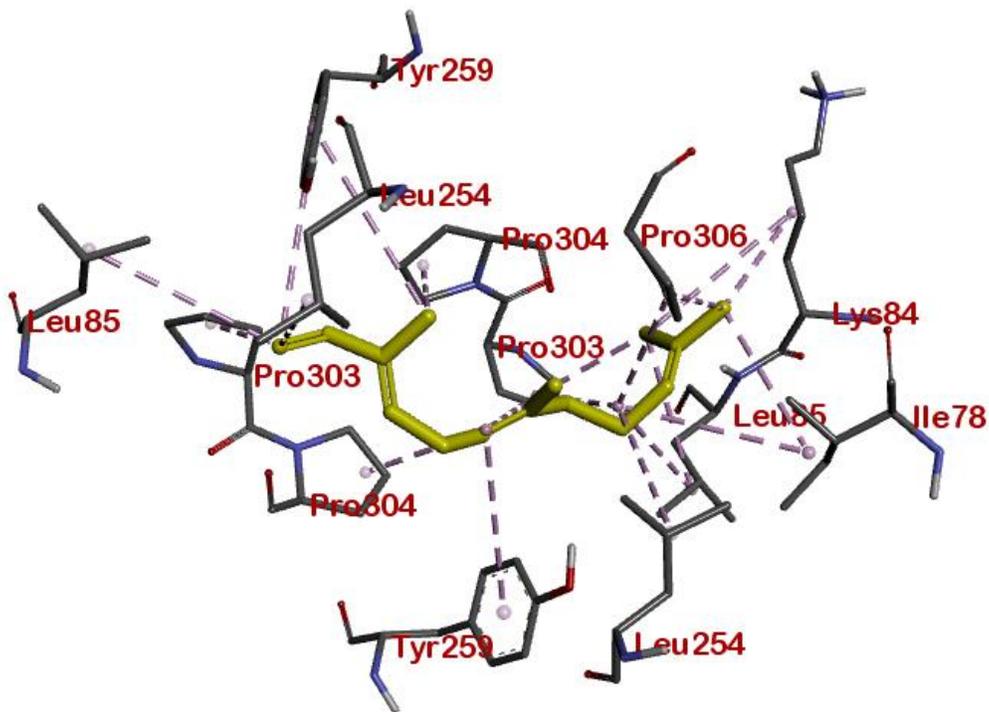


Figura 19.- Representación en 3D de las interacciones entre los residuos de la β -lactamasa de *E. coli* y el farneseno (amarillo). Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas moradas (interacciones pi – alquilo).

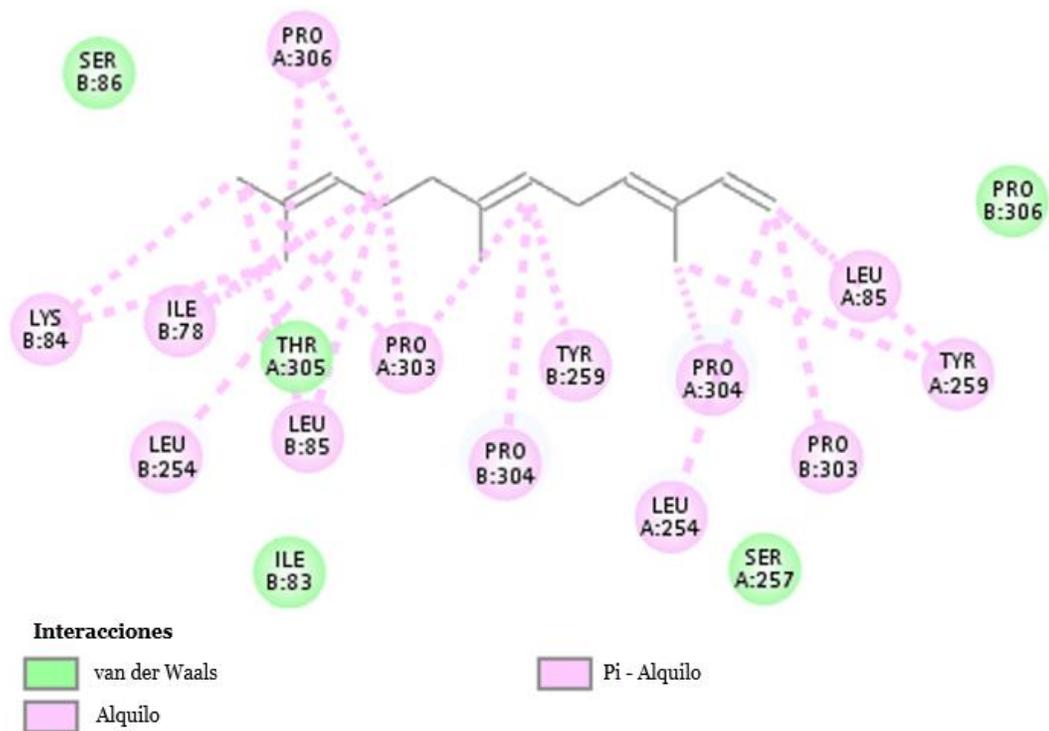


Figura 20.- Representación esquemática del acoplamiento molecular entre la β -lactamasa de *E. coli* y el farneseno.

En el complejo 3BLC/Farneseno se observó la afinidad con una energía de unión igual a -7.82 kcal/mol y una constante de inhibición de 1.85 (Cuadro 6). Fue posible observar que el ligando interactúa con los residuos Pro303 y Pro304 del sitio activo de la β -lactamasa de *E. coli* a través de interacciones *pi*, presentando una tendencia de inhibidor competitivo.

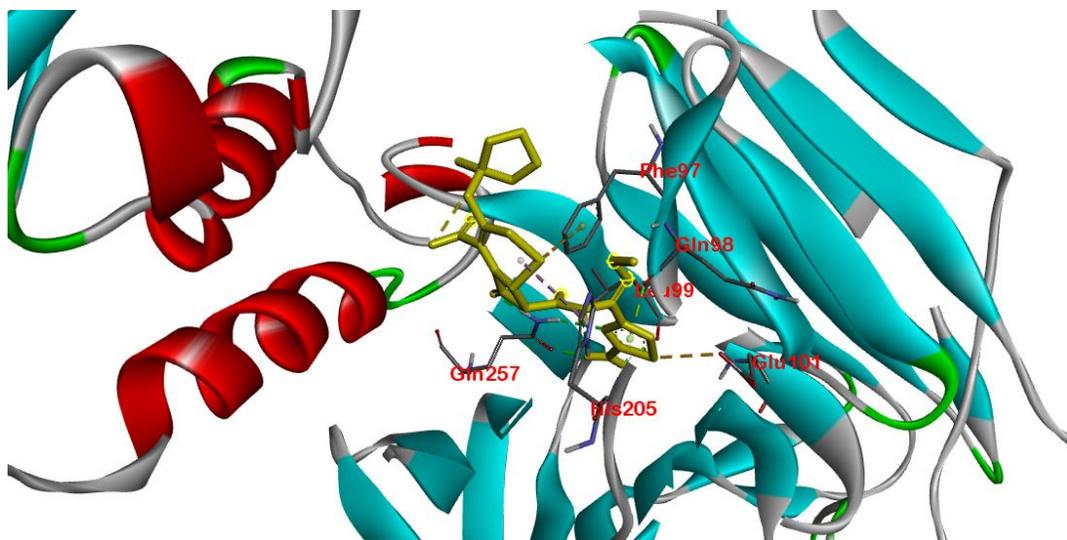


Figura 21.- Acoplamiento molecular del complejo enzima-ligando con la β -lactamasa de *E. coli* como enzima y a la cefepima como ligando (amarillo), ilustrando las distintas interacciones entre los átomos del ligando y residuos. Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas verdes claro (puentes de hidrógeno), líneas moradas (interacciones pi – alquilo) y líneas naranjas (interacciones pi – sulfuro).

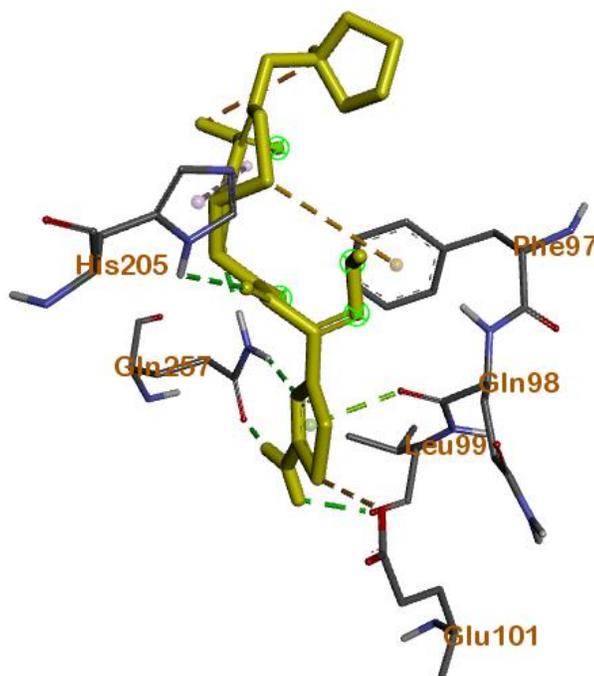
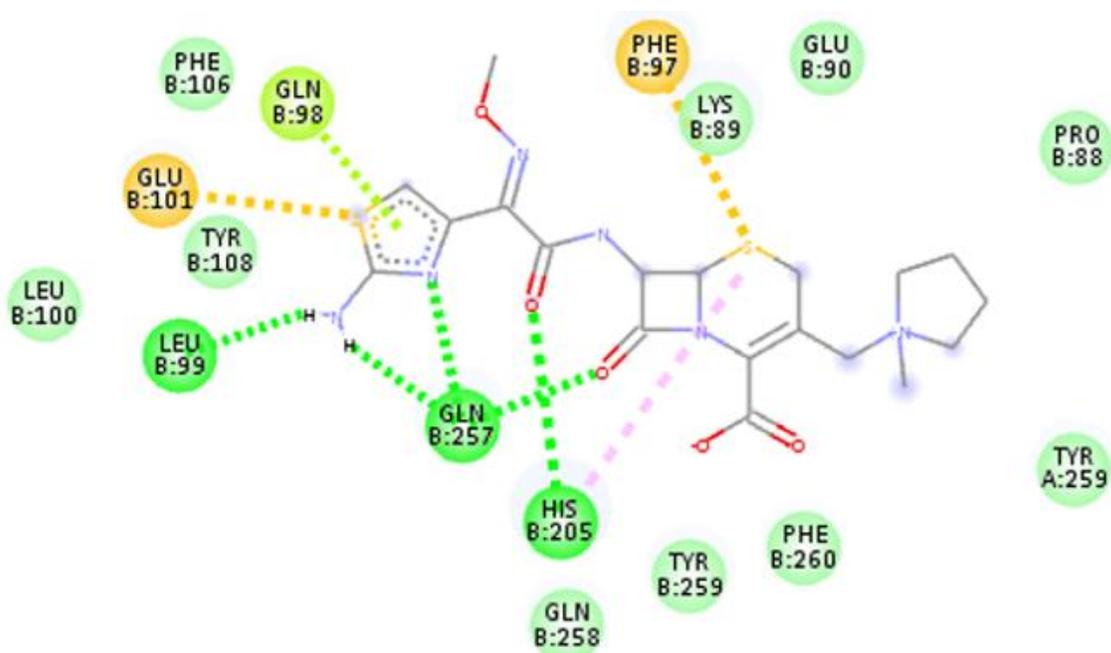


Figura 22.- Representación en 3D de las interacciones entre los residuos de la β -lactamasa de *E. coli* y la cefepima (amarilla). Las interacciones se representan de la siguiente manera: líneas verdes claro (puentes de hidrógeno), líneas moradas (interacciones pi – alquilo) y líneas naranjas (interacciones pi – sulfuro).



Interacciones

- | | |
|---|---|
|  van der Waals |  Pi - Sulfuro |
|  Puentes de Hidrógeno |  Pi - Par solitario (electrones no compartidos) |
|  Sulfuro - X |  Pi - Alquilo |

Figura 23.- Representación esquemática del acoplamiento molecular entre la β -lactamasa de *E. coli* y la cefepima.

Por último, en el complejo 3BLC/Cefepima se observó la afinidad con una energía de unión igual a -7.01 kcal/mol y una constante de inhibición de 7.27 (Cuadro 6). Se observa que el ligando no interactúa de ninguna manera con algún residuo del sitio activo de la enzima por lo tanto se comporta como un inhibidor no competitivo.

Discusión

Fitoquímicamente, ambos compuestos han sido identificados como componentes del aceite esencial o del extracto vegetal de diversas especies pertenecientes a varias familias vegetales y generalmente, dichos productos naturales poseen importantes actividades biológicas.

En 2006, Bozin y colaboradores presentaron un estudio en cual evaluaban la composición bioquímica, la actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de las especies *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* (Lamiaceae), de los cuales el E,E-farnesol y el Z- β -farneseno representaban el 0.1 y 0.2% respectivamente en el aceite esencial de *O. basilicum*, encontrando que todos los aceites presentaban una actividad antifúngica y antioxidante significativa; obtuvieron un resultado muy particular, una alta susceptibilidad a los aceites de cepas bacterianas patógenas multirresistentes como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi* y *Shigella* spp.; comportamiento similar con los dermatomicetos y *Candida albicans* evaluados. Bruni y colaboradores (2004) también evaluaron dichas propiedades, pero del aceite esencial de los cálices de la flor de *Ocotea quixos*, del cual el farneseno representaba el 0.1% de su composición, encontrando resultados similares.

Hay otros ejemplos en los cuales los compuestos son los componentes mayoritarios, por ejemplo, la evaluación realizada por Caroprese y colaboradores en 2011 en el cual describieron el perfil químico y anatómico de las flores de *Lantana camara* encontrando que el farneseno representaba el 42.7% del aceite esencial de las flores, siendo que a esta especie se le han atribuido propiedades antipiréticas, antiespasmódicas, bactericidas, insecticidas, nematocidas, antimutagénicas y su acción repelente contra insectos vectores de la malaria.

Es importante destacar que este es el primer registro de la actividad antibacteriana del farneseno, todos los estudios que evalúan al farneseno a manera de compuesto puro son enfocados en sus propiedades señalizadoras (Šobotník *et al.*, 2008).

En 1966, Huelyn y Murray propusieron al farneseno como un potencial antimicrobiano al identificar que el (E, E)- α -farneseno es el isómero más común en el recubrimiento de manzanas y otras frutas, siendo el responsable del olor característico a manzana verde y que la oxidación de dicho compuesto por efecto del aire forma otro tipo de compuestos que son

perjudiciales para la fruta. Los productos de la oxidación dañaban las membranas celulares que eventualmente causaban la muerte celular en las capas celulares más externas de la fruta, lo que resulta en un trastorno de almacenamiento conocido como escaldadura, dicho efecto puede observarse también en las células procariotas ya que el farneseno resultó activo en todas las cepas, tanto de catálogo como resistentes.

El farnesol es un alcohol sesquiterpénico que se encuentra en los aceites esenciales de determinadas especies vegetales con actividad antimicótica y antibacteriana. Inicialmente se descubrió que el farnesol inhibía la comunicación intercelular en el hongo *Candida albicans* (Gomes *et al.*, 2009). También se ha demostrado que inhibe el proceso de filamentación y el sistema quorum sensing de hongos y ciertas bacterias (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Aunado a esto, parece no tener efectos tóxicos sistémicos o mutágenos ni *in vitro* ni *in vivo* (Jabra-Rizk *et al.*, 2006a).

El papel del farnesol en la inhibición del crecimiento y la viabilidad de microorganismos se ha verificado en otras especies (Semighini *et al.*, 2006; Semighini *et al.*, 2008; Derengowski *et al.*, 2009), lo que sugiere que este compuesto también posee una actividad antibacteriana efectiva contra *S. aureus* y *E. coli*. De manera inicial, los resultados obtenidos indican que *S. aureus* y *E. coli* son más sensibles al farnesol con respecto a otro patógenos, por ejemplo, la bacteria *S. mutans* y el hongo *C. dubliniensis* muestran mayores tolerancias al farnesol, con una MLC de 300 μM (66 mg) y 500 μM (111 mg), respectivamente (Jabra-Rizk *et al.*, 2006b; Koo *et al.*, 2002).

Las infecciones en biomateriales implantados en seres vivos, normalmente, están asociadas a la formación de una biocapa llamada biofilm que es difícil de erradicar y, en la mayoría de los casos, es necesario retirar el implante infectado. Nuevos biomateriales recubiertos de antibióticos están siendo investigados; sin embargo, su uso para la prevención de infecciones en biomateriales es controvertido, ya que la concentración de agentes bactericidas cargados en esos biomateriales podría producir toxicidad local o sistémica y la prolongada liberación de antibióticos en cantidades subinhibitorias podría generar la aparición de nuevas cepas de microorganismos resistentes (Campoccia *et al.*, 2010).

Por lo tanto, hay una necesidad crítica de desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos con capacidad inhibitoria sin aumentar las resistencias. En este contexto las sustancias naturales empleadas en terapéutica tradicionalmente pueden jugar un importante papel.

Brehm-Stecher y Johnson (2003) han señalado que el farnesol penetra en la biocapa, se acumula en la membrana celular y a través de su mecanismo de acción aumenta la porosidad de la membrana celular. Este aumento de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana a distintas sustancias podría incrementar la captación de antibióticos si se usaran en asociación con el farnesol, haría que la dosis de antibióticos necesaria fuera menor y esto disminuiría la posible aparición de resistencias. Es decir, el farnesol incrementaría la susceptibilidad de las bacterias a antibióticos y otros compuestos antimicrobianos. Dichos resultados ratifican la actividad antibacteriana mostrada en las distintas pruebas del farnesol, por ejemplo, la disminución en la densidad poblacional bacteriana en las curvas de crecimiento en presencia de la combinación entre el farnesol y la cefuroxima, así como los halos de inhibición superiores en la prueba de Kirby Bauer en presencia de combinaciones de compuestos antimicrobianos y el farnesol.

Debido a todas las propiedades antes mencionadas del farnesol, grupos de investigación han examinado su efecto en biocapas de *S. aureus in vitro*. Unnuntana y colaboradores (2009) demostraron la capacidad del farnesol para inhibir la formación del biofilm de *S. aureus* resistente a meticilina sensible a concentraciones de 30 mM en discos de titanio. Los grupos de Jabra-Rizk (2006) y Gomes (2009) demostraron que concentraciones menores, de rango 200-300 μ M, aún tenían efecto antibacteriano sobre las biocapas de *S. aureus* y atribuían este efecto a la disrupción de la membrana celular (Inoue *et al.*, 2004). En este estudio, el farnesol presentó una importante actividad antibiofilm ya que a una concentración subinhibitoria de $\frac{1}{2}$ CMI, presentó un porcentaje de inhibición en *S. aureus* del 23% en la cepa de catálogo y del 25% en la cepa resistente; y al evaluar la CBM, el porcentaje se eleva al 32% de inhibición en la cepa de catálogo y al 35% de inhibición en la cepa resistente.

La cefepima y la cefuroxima pertenecen al grupo de antibióticos llamados “cefalosporinas”, que son antibióticos del grupo de los beta-lactámicos derivados semisintéticos de la cefalosporina C, son semejantes a las penicilinas, pero difieren de ella en que el ácido 6-aminopenicilánico ha sido sustituido por un ácido-7-cefalosporánico. Su mecanismo de

acción es similar al de las penicilinas: interfiriendo en la síntesis de peptidoglicano de la pared celular bacteriana, e inhibiendo la transpeptidación final, necesaria para la reticulación, generando un efecto bacteriolítico (Kong *et al.*, 2010).

Son agrupadas en grupos llamados "generaciones" por sus características antimicrobianas, cada nueva generación de cefalosporinas tiene más potencia frente a bacterias Gram-negativas, características antimicrobianas perceptiblemente mayores que la generación precedente, y actualmente se diferencian cinco generaciones de cefalosporinas. La cefuroxima pertenece a la segunda generación, mientras que la cefepima pertenece a las cefalosporinas antipseudomonales de cuarta generación (Chambers y Deck, 2009).

En cuanto a la sensibilidad de las cepas a las combinaciones entre los distintos compuestos se puede destacar que la posible razón por la que no hubo efecto en la combinación del farneseno y el farnesol y la reserpina es que este compuesto demostró ser un inhibidor del mecanismo de resistencia que implica la sobreexpresión de bombas de eflujo en la membrana celular (Garbey y Piddock, 2008), lo que nos lleva a suponer que el mecanismo de resistencia en la cepas resistentes no corresponde al efecto de bombas de eflujo.

Por el contrario, las combinaciones entre el ácido clavulánico y los productos naturales presentaron actividad en todas las cepas bacterianas, autores afirman que el ácido clavulánico se une de manera irreversible a las β -lactamasas ya que contiene un anillo betalactámico en su estructura, evitando que inactiven ciertos antibióticos betalactámicos; esto sugiere que el posible mecanismo de resistencia en las cepas *S. aureus* MR 23 y *E. coli* MR 82 sea por efecto de β -lactamasas (Wegener *et al.*, 2020).

En relación con el establecimiento de las CMI's, se observó que no hubo diferencias en las concentraciones de farneseno para inhibir el crecimiento bacteriano ya que tanto para bacterias Gram-positivas como Gram-negativas la CMI se estableció en 1.5 mg/mL. Por otra parte, al establecer la CBM, se observó que en la cepa *S. aureus* ATCC 29213 se obtuvo el valor más bajo de CBM (4 mg/mL); en el resto de las cepas bacterianas, el valor de CBM se estableció en 5 mg/mL.

De igual manera, con el farnesol se observa que no hay diferencias entre el tipo bacteriano y el establecimiento de la CMI y la CBM en cada cepa ya que, tanto en bacterias Gram-

positivas como en Gram-negativas, la CMI se estableció para todas en >5 mg/mL, y la CBM en >>5 mg/mL.

Satyral *et al.*, (2015) evaluaron las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* refiriendo un valor de CMI de 313 µg/mL en las cepas *S. aureus*, *P. aeruginosa*, y *C. albicans*; la composición química de dicho aceite contenía 50.5% de isómeros de farneseno. Dicho valor inferior con respecto a la CMI reportada en este trabajo se puede explicar debido a que los aceites esenciales presenten una potencial actividad biológica debido a la gran cantidad y variedad de componentes, y su actividad no necesariamente es un reflejo de las propiedades biológicas de su componente mayoritario, sino que también puede ser evidencia de las interacciones entre todos los compuestos (Pichersky *et al.*, 2006).

Con respecto a la actividad antibiofilm del farneseno, los mayores porcentajes de inhibición se presentaron en las cepas de bacterias Gram-positivas, destacando la sensibilidad de la cepa *S. aureus* ATCC 29213 en la cual a una concentración de ½ CMI (0.75 mg/mL) del 44.1%, valor cercano de inhibición que se presentó en la cepa *E. coli* MR 82 bajo el tratamiento de la CBM (5 mg/mL). Kačániová *et al.*, (2022) refirieron un efecto en el perfil proteico del biofilm tratado con el aceite esencial de *Cedar atlántica* de la cual el farneseno estaba presente en un 13.8% de la composición química, atribuyendo que el aceite esencial influye en la homeostasis del biofilm bacteriano formado en la superficie evaluada.

Los resultados obtenidos en los ensayos de acoplamiento molecular, combinados con los hallazgos en la evaluación del efecto de los productos naturales sobre la curva de crecimiento de *E. coli* MR 82 y *S. aureus* MR23, mostrados en la Cuadro 6, demuestran una gran energía de unión entre el farnesol y el farneseno con las enzimas estudiadas. Estos resultados muestran que la molécula del farnesol puede tener el mecanismo de acción potencial para inhibir la actividad de la β-lactamasa de *S. aureus* (1BLC) por medio de la inhibición no competitiva, permitiendo que la cefuroxima entre al espacio citoplasmático y efectúe su actividad bacteriolítica interfiriendo en la síntesis del peptidoglucano. De manera similar, la molécula del farneseno posiblemente tenga el mecanismo de acción de inactivar la función de la β-lactamasa de *E. coli* (3BLC) por medio de la inhibición competitiva por el sitio activo de la proteína, permitiendo que la cefepima efectúe su actividad al igual que la cefuroxima.

Ambos productos naturales presentan valores de energía de unión y constante de inhibición similares a los de los antibióticos empleados, sugiriendo que tienen un potencial de adhesión a las enzimas y, a partir de ahí, se confiere una mayor actividad antibacteriana cuando tanto productos naturales como antibióticos actúan en combinación, corroborado con el ensayo de la evaluación de la curva de crecimiento de ambas cepas multirresistentes, presentado en la Figura 9 y 11.

El principal aporte de este trabajo fue el verificar las propiedades antibacterianas y antibiofilm del farnesol y farneseno, compuestos presentes en aceites esenciales utilizados en la medicina tradicional, validando su uso en el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso que afectan a la población; al igual que constatar a estos compuestos como potenciales sensibilizadores de resistencia bacteriana.

Conclusiones

- Los compuestos farnesol y farneseno presentan actividad antibacteriana tanto en cepas Gram-positivas como en Gram-negativas.
- Todas las cepas bacterianas tratadas con farneseno presentaron un porcentaje de inhibición de la formación del biofilm superior al 19%.
- Todas las cepas bacterianas tratadas con farnesol presentaron un porcentaje de inhibición de la formación del biofilm superior al 17%.
- El farneseno presentó un mayor efecto en la inhibición del biofilm en bacterias Gram-positivas, siendo la cepa *S. aureus* ATCC 29213 la más sensible.
- El farnesol presentó un mayor efecto en la inhibición del biofilm en bacterias Gram-positivas, siendo la cepa *S. aureus* MR 23 la más sensible.
- La combinación entre el farneseno y la cefuroxima fue la más eficaz frente la cepa *E. coli* ATCC 25922, reduciendo 3 veces la CMI del antibiótico.
- La combinación entre el farneseno y la cefepima fue la más eficaz frente la cepa *E. coli* MR 82, reduciendo a la mitad la CMI del antibiótico.
- Las combinaciones entre cefuroxima y cefepima con farnesol fueron las más eficaces frente a la cepa *S. aureus* MR 23, reduciendo la CMI del antibiótico de 15 y 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en cada caso respectivamente.
- El farnesol demostró una notable afinidad de unión con la proteína 1BLC, involucrada en la resistencia a antibióticos β -lactámicos, comportándose como un inhibidor no competitivo.
- El farneseno demostró una notable afinidad de unión con la proteína 3BLC, involucrada en la resistencia a antibióticos β -lactámicos, comportándose como un inhibidor competitivo.
- Los resultados revelaron que ambos productos naturales tienen potencial para ayudar a combatir casos de procesos infecciosos relacionados con cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas multirresistentes.

Apéndices

Apéndice 1.- Catálogo bibliográfico

Referencia	Aceite esencial o compuesto	País	¿Qué se evaluó?
Rioja <i>et al.</i> , 2000	Farnesol	Reino Unido	Investigaron si el farnesol induce la apoptosis de blastos de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) y líneas celulares leucémicas, en comparación con células hematopoyéticas primarias humanas normales. Concluyeron que el farnesol a una concentración de 30 μ M elimina selectivamente los blastos de LMA y a las líneas celulares leucémicas sin dañar a las células hematopoyéticas primarias.
Candan <i>et al.</i> , 2003	Aceite esencial <i>Achillea millefolium</i> subsp. <i>millefolium</i>	Turquía	Evaluaron los efectos antimicrobianos y la composición química del aceite encontrando que 36 compuestos constituyen el 90,8% del aceite total del cual el eucaliptol posee el 24% siendo el compuesto mayoritario; se confirmó la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite.
Bruni <i>et al.</i> , 2004	Aceite esencial <i>Ocotea quixos</i>	Italia	Se identificaron los compuestos del aceite esencial de los cálices del fruto de Ishpingo (<i>Ocotea quixos</i>); se evaluaron las propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas dando resultados variados

Inoue <i>et al.</i> , 2004	Farnesol	Japón	<p>dependiendo de la concentración del extracto en la muestra.</p> <p>Evaluaron los efectos antibacterianos de tres alcoholes terpénicos sobre <i>S. aureus</i>, centrándose en la fuga de iones K⁺ y la toxicidad a lo largo del tiempo; el orden jerárquico de eficacia, farnesol>nerolidol>plaunotol, fue el mismo para ambos ensayos, sugiriendo que el efecto antibacteriano de los terpenos en el daño a la membrana celular.</p>
Duarte <i>et al.</i> , 2005	Aceite esencial <i>Anthemis nobilis</i> ; <i>Cymbopogon martini</i>	Brasil	<p>Evaluaron la actividad frente a <i>C. albicans</i> del aceite esencial y el extracto etanólico de hojas y/o raíces de 35 plantas medicinales comúnmente usadas en la medicina tradicional brasileña, de las cuales, el aceite esencial de 13 especies presentó actividad y se identificaron compuestos con propiedades anti-<i>Candida</i> como el limoneno y el mentol.</p>
Bozin <i>et al.</i> , 2006	Aceite esencial <i>Ocimum basilicum</i>	Serbia	<p>Se describió la composición química de los aceites esenciales de <i>O. basilicum</i> L., <i>Origanum vulgare</i> L. y <i>Thymus vulgaris</i> L. mediante espectrometría de masas y cromatografía de gases y se ensayaron sus actividades antioxidantes y antimicrobianas encontrando que todos los aceites presentaban una actividad antifúngica significativa.</p>

Semighini <i>et al.</i> , 2006	Farnesol	E.U.A.	Examinaron el efecto del farnesol en el hongo filamentoso <i>A. nidulans</i> como referente de la secreción del compuesto por parte de <i>C. albicans</i> ; se descubrió que el farnesol, además de su función de detección de quórum, regula la morfogénesis y también es empleado por <i>C. albicans</i> para reducir la competencia de otros microorganismos.
Ozcan y Chalchat, 2007	Aceite esencial <i>Daucus carota</i>	Turquía	Se determinó la composición química y las propiedades físicas de las semillas de zanahoria (<i>Daucus carota</i> L.) obtenidas en Konya, Turquía, con objetivo de investigar usos potenciales de las mismas; encontrando que sus principales componentes son el carotol (66.78%) y (Z, Z)- α -farneseno (5.86%), entre otros.
Semighini <i>et al.</i> , 2008	Farnesol	E.U.A.	Retomando los resultados de Semighini <i>et al.</i> (2006), se evaluó el efecto del farnesol sobre el hongo de importancia comercial <i>F. graminearum</i> , donde se obtuvieron los resultados de que el compuesto también desencadena la apoptosis en el hongo, además de expresar patrones de germinación alterados en sus esporas y provocando que la mayoría se lisaran tras una exposición prolongada.
Derengowski <i>et al.</i> , 2009	Farnesol	Brasil	En este estudio se describieron los efectos del farnesol sobre el crecimiento y dimorfismo de <i>Paracoccidioides</i>

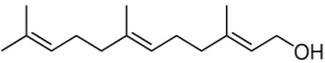
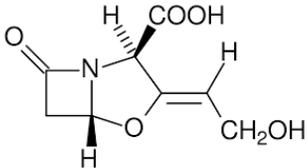
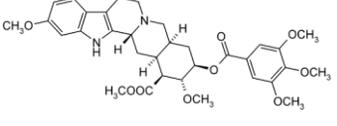
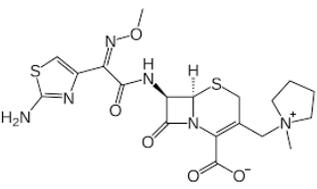
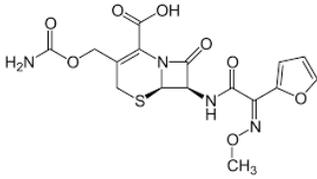
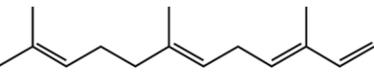
Caroprese <i>et al.</i> , 2011	Aceite esencial <i>Lantana camara</i>	Costa Rica	<p><i>brasiliensis</i>, desde el concepto de la secreción de este compuesto por parte de <i>C. albicans</i>, encontrando que las concentraciones de farnesol que oscilaban entre 25 y 300 μM inhibieron fuertemente el crecimiento de células de levadura <i>P. brasiliensis</i>; los autores sugieren que la actividad fungicida del compuesto esta probablemente asociada la degeneración masiva de orgánulos citoplasmáticos.</p> <p>Describieron anatómica y químicamente las inflorescencias de la especie <i>Lantana camara</i> durante 3 estadios de vida de la flor, encontrando que durante el periodo más fresco se encuentra, de manera mayoritaria, el compuesto <i>E</i>-β-Farneseno representando el 39.4% del extracto.</p>
Hernández-Bastidas <i>et al.</i> , 2014	Aceite esencial <i>Guarea guidonia</i>	Venezuela	<p>Describieron la composición química cualitativa y cuantitativamente encontrando que los mayores porcentajes de composición pertenecían a isómeros de farneseno.</p>
Constantino <i>et al.</i> , 2016	Farnesol	España	<p>Evaluaron la actividad bactericida antiestafilocócica del farnesol sobre superficies de Ti6Al4V (material empleado en implantes); encontrando que a una concentración de 30 mM de farnesol se disminuye la tasa de colonización por <i>S. aureus</i> en dichas agujas en un 74%.</p>

Huchelmann <i>et al.</i> , 2016	Farnesol	Francia	<p>Identificaron qué factores intervenían al inhibir las vías del mevalonato plastidial (MEP) y citosólico (MVA), y consecuentemente, inhibiendo la prenilación de proteínas. Concluyeron que, en el tabaco, el farnesol inhibe la vía plastidial MEP y activa la vía citosólica MVA, por lo tanto, actúa como un regulador potencial de la interferencia entre las dos vías. Juntos, esos resultados sugieren un nuevo papel para el farnesol (o un metabolito de este) como molécula central para la regulación de la biosíntesis isoprenoides en las plantas.</p>
Bagci <i>et al.</i> , 2019	Aceite esencial <i>Marrubium</i> <i>vulgare</i>	Turquía	<p>Compararon la composición química de los aceites esenciales obtenidos de partes aéreas secas y frescas de <i>M. vulgare</i>, recolectadas alrededor del lago Tuz. Se determinó que los aceites esenciales obtenidos de las partes frescas y secas de <i>M. vulgare</i> contenían 21 y 26 componentes, respectivamente, de los cuales el principal componente de plantas frescas y secas se encontró como <i>trans</i>-β-farneseno en ambos, y sus cantidades se detectaron como 13,43 y 34,23% respectivamente. Se observó que la cantidad de <i>trans</i>-β farneseno, en el aceite esencial obtenido cuando se secó el</p>

material vegetal, aumentó considerablemente.

Apéndice 2.- Estructuras químicas de los compuestos a emplear

(www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

Nombre	Estructura	Nombre	Estructura
Farnesol		Ácido clavulánico	
Reserpina		Cefepima	
Cefuroxima		Farneseno	

Apéndice 3.- Método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Koneman, 1996)

Este método fue utilizado para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos y sus mezclas, método descrito a continuación:

Se utilizó el agar Müeller-Hinton (MH), porque promueve el crecimiento de cepas aisladas a partir de muestras clínicas; por lo que era importante que el medio de cultivo tuviera un espesor uniforme de 4 mm aproximadamente dentro de la placa, ya que, si no se cumplía este parámetro y el espesor era menor, las sustancias a evaluar tenderían a difundir más en dirección lateral aumentando el halo; y si es mayor el espesor la difusión de la sustancia a evaluar sería hacia la parte baja, lo que estrecharía el halo de inhibición.

El inóculo se preparó colocando con un asa bacteriológica de 4 o 5 colonias de una misma bacteria, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuagó bien en el líquido hasta que se desprendiera todo rastro de bacteria y acto seguido se retiró el asa de siembra. Después el caldo se incubó a 37°C durante 24 h, o hasta que la turbidez del medio fuese equivalente al No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 de bacterias por mL.

Cuando la turbidez se logró, se sumergió un hisopo seco y estéril en la suspensión del inóculo eliminando el exceso de líquido. Con ese hisopo se procedió a inocular la mitad de la superficie del agar MH. El sembrado se realizó mediante estrías en todas las direcciones en ángulo de aproximadamente 60° de cada estría.

Cuando el inóculo fue absorbido, se colocaron con pinzas estériles los sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No. 5 y después se le agregaron 15 µg/disco de cada compuesto [Ácido clavulánico, reserpina, cefuroxima y cefepima] y 4 µL/disco de cada producto natural [Farnesol (**PN1**) y farneseno (**PN2**)]. Para las combinaciones de los compuestos con los productos naturales se utilizaron las mismas concentraciones de los compuestos y los productos naturales, pero en un mismo disco [Ácido clavulánico + PN1 y PN2; reserpina + PN1 y PN2; cefuroxima + PN1 y PN2; y cefepima + PN1 y PN2].

Como control positivo se utilizaron sensidiscos con las mismas características que los anteriores, impregnados con 30 µg de cloranfenicol.

Cuando las placas de agar estaban sembradas y con los sensidiscos impregnados se incubaron a 37° C por 24 horas. Para la interpretación de resultados, los halos de inhibición que se formaron se midieron con una regla de calibración en mm, todas las pruebas se realizaron por triplicado y se reportaron los promedios de las 3 repeticiones en mm ± la desviación estándar.

Apéndice 4.- Técnica de microdilución en caldo (Picazo, 2000)

Este método se utilizó para evaluar cuantitativamente la actividad antibacteriana de los productos naturales, método descrito a continuación:

El inóculo se preparó colocando con un asa bacteriológica de 4 a 5 colonias de una misma bacteria, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuagó bien en el líquido hasta que se desprendiera todo rastro de bacteria y acto seguido se retiró el asa de siembra. Después el caldo se incubó a 37°C durante 24 h, o hasta que la turbidez del medio fuese equivalente al No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 de bacterias por mL.

Posteriormente se tomaron 10 µL de inóculo y se suspendieron en 10 mL de solución salina al 0.9 % estéril. Se prepararon soluciones de 2 mL de caldo MH con concentraciones de 5 a 0.125 mg/mL de los productos naturales para posteriormente tomar 100 µL de cada concentración y colocarlos en tubos Eppendorf, a los cuales se les adicionaron 100 µL de inóculo diluido de cada cepa.

Los tubos se incubaron por 24 horas a 37° C, posterior a ese tiempo de incubación cada tratamiento se sembró en agar MH, colocándose 10 µL de cada tubo Eppendorf en su respectivo agar. Posterior a eso, se incubaron durante 24 horas a 37°C y se observó la disminución en el crecimiento del microorganismo. Para los controles positivos se utilizaron diferentes concentraciones de cloranfenicol.

Apéndice 5.- Evaluación del efecto antibiofilm (Gómez-Sequeda *et al.*, 2020)

La evaluación del efecto antibiofilm de los productos naturales se determinó en una microplaca de 96 pozos de fondo en U hasta alcanzar un volumen final de 200 µL. Esto se realizó agregando 100 µL de una solución de cada producto natural a una concentración de ½ CMI, CMI y CBM, añadiendo 100 µL de cultivo bacteriano ($\sim 5 \times 10^5$ UFC/mL) en cada pozo. Se utilizaron como controles negativos los pozos que contenían cultivos bacterianos sin producto natural, y las microplacas se incubaron a 37 °C durante 48 h sin agitación, permitiendo la adherencia de las bacterias a la superficie.

Después de la incubación, se eliminó el contenido líquido de los pocillos y la microplaca se enjuagó tres veces con solución salina estéril al 0.9% para eliminar las bacterias suspendidas; luego, las microplacas se secaron en un horno a 60 °C durante 45 min. Posteriormente, cada pozo se tiñó con 200 µL de cristal violeta al 0.4% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Después las microplacas se enjuagaron tres veces con solución salina estéril al 0.9% para eliminar el exceso de cristal violeta y posteriormente se le añadieron 200 µL de ácido acético al 30% en agua destilada. El contenido líquido de cada pozo se transfirió a una nueva microplaca de fondo plano y la absorbancia se midió a 595 nm utilizando un lector de microplacas ELISA. Cada ensayo se realizó por triplicado. Finalmente, los porcentajes de inhibición de cada producto natural se calcularán utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{\text{Control negativo} - \text{Tratamiento}}{\text{Control negativo}} \times 100$$

Apéndice 6.- Determinación de la sensibilización a la resistencia

(Picazo, 2000)

Este método es una modificación de la técnica de microdilución en caldo, se describe a continuación:

El inóculo se preparó colocando con un asa bacteriológica de 4 a 5 colonias de una misma bacteria, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuagó bien en el líquido hasta que se desprendiera todo rastro de bacteria y acto seguido se retiró el asa de siembra. Después el caldo se incubó a 37°C durante 24 h, o hasta que la turbidez del medio fuese equivalente al No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias por mL.

Posteriormente en microplacas de 96 pozos de fondo en U se agregaron 50 µL de caldo MH a cada pozo y en la primera fila se añadieron 100 µL de caldo MH con el antibiótico a una concentración dependiente de la cepa (se utilizó la CMI de cada antibiótico en cada cepa) y se mezcló 3 veces. Se tomaron 100 µL de la primera fila y se transfirieron a la segunda en la cual el contenido se mezcló 3 veces, dicho procedimiento se repitió 10 veces y en la última fila se desecharon los 100 µL sobrantes, con ello se logró una dilución gradual en la concentración del antibiótico.

Después se le agregaron a cada pozo 50 µL de caldo MH con el producto natural a una concentración subinhibitoria y 100 µL del inóculo de cada cepa, logrando un volumen final de 200 µL por pocillo.

Las microplacas se incubaron por 24 horas a 37 °C y posterior a ese tiempo de incubación se realizó un revelado con una solución de TTC. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se determinó la sensibilización de la resistencia en la combinación en la cual el contenido no cambió de color posterior al revelado.

Apéndice 7.- Curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento (Ávila, 1996)

Esta técnica consistió en evaluar los antibióticos y productos naturales puros, además de la combinación más activa entre estos dos en las cepas más sensibles.

El inóculo se preparó colocando con un asa bacteriológica de 4 a 5 colonias de una misma bacteria, se sumergió el asa en 10 mL de caldo MH estéril, se enjuagó bien en el líquido hasta que se desprendiera todo rastro de bacteria y acto seguido se retiró el asa de siembra. Después el caldo se incubó a 37°C durante 24 h, o hasta que la turbidez del medio fuese equivalente al No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 de bacterias por mL. Posteriormente se tomaron 10 µL de inóculo y se suspendieron en 10 mL de solución salina al 0.9 % estéril.

De manera inicial, se prepararon y rotularon 4 tubos con 5 mL de caldo MH; el primero correspondió al testigo, seguido por un tubo para la CMI del producto natural, otro para la CMI del antibiótico y un último tubo para una combinación entre la CMI del antibiótico y la ½ CMI del producto natural. Para las cepas de bacterias Gram-negativas se utilizó el farneseno y la cefepima como tratamientos; para las cepas de bacterias Gram-positivas se utilizó el farnesol y la cefuroxima como tratamientos, estas selecciones en los tratamientos se determinaron por medio de la evaluación de la sensibilización de resistencia.

De cada tubo se llenaron 7 tubos Eppendorf con 200 µL cada uno, correspondientes a los 7 tiempos en los cuales estaban divididas las 24 h de evaluación. Todos los tubos se colocaron en una caja de almacenamiento de tubos Eppendorf y se incubaron a 37 °C con agitación durante 24 h.

Se realizó un sembrado de cada tratamiento al tiempo 0, a las 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h del experimento.

El sembrado se realizó tomando 50 µL de cada tubo Eppendorf y colocándolos en una división de una caja triceptada con agar MH, posteriormente, se tomaron otros 50 µL y se diluyeron en 5 mL de solución salina estéril; de esa primera dilución se tomaron 50 µL y se colocaron en otra división de la caja, se tomaron otros 50 µL para realizar una segunda

dilución en 5 mL de solución salina estéril; de la segunda dilución se tomaron 50 μ L y se colocaron en la última división de la caja. Todos los sembrados se espatularon para un desarrollo y clara observación de las UFC. Las cajas triceptadas se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Posterior al tiempo de incubación, se contaron las UFC y se graficó el Log_{10} del número de UFC contra el tiempo.

Referencias

- [1]. Abraham, E. P., y E., Chain. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837.
- [2]. Amer, A., y H., Mehlhorn. (2006a). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*. 99: 466-472.
- [3]. Amer, A., y H., Mehlhorn. (2006b). Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*. 99: 478-490.
- [4]. Andersson, D. I, y D., Hughes. (2010). Antibiotic resistance and its cost: ¿is it possible to reverse resistance?. *Nature Reviews Microbiology*. 8(4): 260–271.
- [5]. Ando, E., Monden, K., Mitsuhata, R., Kariyama, R., y H., Kumon. (2004). Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with urinary tract infection. *Acta Medica Okayama*. 58(4): 207-214.
- [6]. Ávila, J. G. (1996). Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM. México.
- [7]. Bagci, Y., Kocak, M., Ayaz, F., Eruygur, N., y S., Dogu. (2019). Determination of chemical composition of essential oils obtained from dry and fresh samples of *Marrubium vulgare* L. collected from Tuz lake. *ResearchGate*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/336028701_DETERMINATION_OF_CHEMICAL_COMPOSITION_OF_ESSENTIAL_OILS_OBTAINED_FROM_DRY_AND_FRESH_SAMPLES_OF_MARRUBIUM_VULGARE_L_COLLECTED_FROM_TUZ_LAKE
- [8]. Beenken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Blevins, S. J., y M. S., Smeltzer. (2004). Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology*. 186(14): 4665-4684.
- [9]. Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E., y F., Petit. (2013). Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. *Applied and Environmental Microbiology*. 79: 4684–4693.

- [10]. Brehm-Stecher, B. F., y E. A., Johnson. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 3357-3360.
- [11]. Bhattacharyya, S., Agrawal, A., Knabe, C., y P., Ducheyne. (2014). Solgel silica controlled release thin films for the inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials*. 35: 509-17.
- [12]. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., y G., Anackov. (2006). Characterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Spices and the Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Entire Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(5): 1822–1828.
- [13]. Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C. y G., Sacchetti. (2004). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*. 85: 415–421.
- [14]. Cal, K. (2006). Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Planta Medica*. 72(4): 311-316.
- [15]. Campoccia, D., Montanaro, L., Speziale, P., y C. R., Arciola. (2010). Antibiotic loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use. *Biomaterials*. 31: 63-77.
- [16]. Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A. y H. A., Akpulat. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 215–220.
- [17]. Caroprese, A. J. F., Parra, G. M. I., Arrieta, P. D., y S., Elena. (2011). Anatomía microscópica y metabolitos secundarios volátiles en tres estadios del desarrollo de las inflorescencias de *Lantana camara* (Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical*. 59(1): 473-486.
- [18]. Celia, C. H., y Chen, O. H. (1992). Inhibition of β -lactamase by clavulanate: Trapped intermediates in cryocrystallographic studies. *Journal of Molecular Biology*. 224 (4): 1103-1113.

- [19]. Constantino, J. A., Delgado-Rastrollo, M., Pacha-Olivenza M. A., Pérez-Giraldo C., Quiles, M., González-Martín, M. L., y Gallardo-Moreno, A. M. (2016). Eficacia bactericida *in vivo* del farnesol sobre implantes de Ti6Al4V. *Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología*. 60(4): 260-266.
- [20]. Chambers, H. F., y D. H., Deck. (2009). Capítulo 43: Lactámicos β y otros antibióticos activos en la pared y la membrana celulares. En Katzung, B. G., Masters, S. B., y Trevor, J. A. (Eds.). *Farmacología básica y clínica* (11a edición). México: McGraw-Hill-Lange. pp. 773-793.
- [21]. Daubin, V. y Szollosi, G. J. (2016). Horizontal gene transfer and the history of life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 8(4): a018036.
- [22]. Davey, M. E., y G. A., O'Toole. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 847-867.
- [23]. Derengowski, L. S., De-Souza-Silva, C., Braz, S. V., Mello-De-Sousa, T. M., Bão, S. N., Kyaw, C. M., y I., Silva-Pereira. (2009). Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 8(1): 13.
- [24]. Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. (3rd ed.). Wiley.
- [25]. Duarte, M. C. T., Duarte, R. M. T., Rodrigues, R. A. F., y M. V. N., Rodrigues. (2018). Essential Oils and Their Characteristics. En Hashemi, S. M. B., Khaneghah, A. M., y A. S., Sant'Ana (Eds). (Pp1-19). *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*. USA. John Wiley & Sons.
- [26]. Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Garcia, R. V. L., y C., Delarmelina. (2005). Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 305-311.
- [27]. Durán, D. A., Vargas, V. A., y Cisneros, C. A. E. (2004). *Bioestadística*. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. 220 pp.
- [28]. Eslahi, H., Fahimi, N., y A. R., Sardarian. (2018). Chemical Composition of Essential Oils. En Hashemi S. M. B., Khaneghah, A. M., y A. S., Sant'Ana (Eds). (Pp119-171). *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*. USA. John Wiley & Sons.

- [29]. Garvey, M. I., y Piddock, L. J. (2008). The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52(5): 1677–1685.
- [30]. Gomes F. I., Teixeira, P., Azeredo, J., y R., Oliveira. (2009). Effect of farnesol on planktonic and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*. 59: 118-122.
- [31]. Gómez-Sequeda, N., Cáceres, M., Stashenko, E. E., Hidalgo, W., y C., Ortiz. (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Essential Oils against *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antibiotics*. 9: 730.
- [32]. Grajales-Conesa, J., Aceves-Chong, L., Rincón-Rabanales, M. y L., Cruz-López. (2016). Flores de *Jatropha curcas* del sur de México: perfiles químico y morfométrico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87: 1321–1327.
- [33]. Hernández-Bastidas, V., Mora-Vivas, F., Rojas-Fermín, L. y P., Meléndez. (2014). Análisis del aceite esencial de las hojas de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae). *Revista de la Facultad de Farmacia*. 56(1): 18-20.
- [34]. Hiltunen, T., Virta, M., y A. L., Laine. (2017). Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 372: 20160039.
- [35]. Huelin, F. E., y Murray, K.E. (1966). " α -Farnesene in the Natural Coating of Apples". *Nature*. 210 (5042): 1260–1261.
- [36]. Huchelmann, A., Brahim, M. S., Gerber, E., Tritsch, D., Bach, T. J., y Hemmerlin, A. (2016). Farnesol-mediated shift in the metabolic origin of prenyl groups used for protein prenylation in plants. *Biochimie*. 127: 95–102.
- [37]. Inoue, Y., Shiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H., y J., Shimada. (2004). The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters*. 237: 325-331.
- [38]. Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., James, C. E., y M. E., Shirtliff. (2006a). Effect of Farnesol on *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50(4): 1463–1469.

- [39]. Jabra-Rizk, M. A., Shirliff, M., James, C., y Meiller T. (2006b). Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Research*. 6: 1063–1073.
- [40]. Kačániová, M., Galovičová, L., Valková, V., Ďuranová, H., Štefániková, J., Čmíková, N., Vukic, M., Vukovic, N. L., y Kowalczewski, P. Ł. (2022). Chemical Composition, Antioxidant, *In Vitro* and *In Situ* Antimicrobial, Antibiofilm, and Anti-Insect Activity of *Cedar atlantica* Essential Oil. *Plants (Basel, Switzerland)*. 11(3): 358.
- [41]. Kaper, J. B., Nataro, J. P., y H. L., Mobley. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140.
- [42]. Kim, C., Heseck, D., Lee, M., y Mobashery, S. (2018). Potentiation of the activity of b-lactam antibiotics by farnesol and its derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 28: 642-645.
- [43]. Koneman, E. W. (1996). *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Panamericana. México. 386-393pp.
- [44]. Kong, K. F., Schneper, L., y K., Mathee. (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*. 118(1): 1-36.
- [45]. Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K., y Bowen, W. H. (2002). Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1302–1309.
- [46]. Muthamilarasan, M., y M., Prasad. (2013). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Biosciences*. 38: 433–449.
- [47]. Oliver, D. C., y Paetzer, M. (2008). Crystal Structure of the Major Periplasmic Domain of the Bacterial Membrane Protein Assembly Facilitator YidC. *Membrane transport, structure, function and biogenesis*. 283(8): P5208-5216.
- [48]. Ozcan, M. M., y J. C., Chalchat. (2007). Chemical composition of carrot seeds (*Daucus carota* L.) cultivated in Turkey: characterization of the seed oil and essential oil. *GRASAS Y ACEITES*. 58(4): 359-365.
- [49]. Paduch, R., Kandefer-Szerszeń, M., Trytek, M., y J., Fiedurek. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 55: 315.

- [50]. Pereira, L. A., Rodrigues, O. C. B. R., Araújo, A. O. F., Santana, C. M. A., Carvalho, S. B., Costa, A. I. R., Martins, G. A. G., Almeida, R. J., Escorcio, P. R. E., Rodrigues A. A. y Santos S. M. J. (2021). Antimicrobial, modulatory, and antibiofilm activity of *tt*-farnesol on bacterial and fungal strains of importance to human health. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 47: 128192.
- [51]. Picazo, J. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. Consultado el 01 de septiembre del 2021. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/métodosbásicos_sensibilidadantibióticos.pdf
- [52]. Pichersky, E., Noel, J. P., y Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*. 311: 808-811.
- [53]. Rioja, A., Pizzey, A. R., Marson, C. M., y N. S. B., Thomas. (2000). Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. *FEBS Letters*. 467 (2-3): 291-295.
- [54]. Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Leong, S. Y., Khelfa, A., Greiner, R. y F., Chemat. (2018). Extraction Methods of Essential Oils From Herbs and Spices. En Hashemi S. M. B., Khaneghah, A. M. y A. S., Sant'Ana (Eds). (Pp21-55). *Essential Oils in Food Processing: Chemistry, Safety and Applications*. USA. John Wiley & Sons.
- [55]. Satyal, P., Shrestha, S., y Setzer, W. N. (2015). Composition and Bioactivities of an (E)- β -Farnesene Chemotype of Chamomile (*Matricaria Chamomilla*) Essential Oil from Nepal. *Natural Product Communications*.
- [56]. Semighini, C. P., Hornby, J. M., Dumitru, R., Nickerson, K. W., y Harris, S. D. (2006). Farnesol induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. *Molecular Microbiology*. 59: 753–764.
- [57]. Semighini, C. P., Murray, N., y Harris, S. D. (2008). Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and development by farnesol. *FEMS Microbiology Letters*. 279(2): 259-64.
- [58]. Šobotník, J., Hanus, R., Kalinová, B., Piskorski, R., Cvačka, J., Bourguignon, T., y Roisin, Y. (2008). (E, E)- α -Farnesene, an Alarm Pheromone of the Termite *Prorhinotermes canalifrons*. *Journal of Chemical Ecology*. 34 (4): 478–486.

- [59]. Stewart, P. S., y J. W., Costerton. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*. 358: 135-138.
- [60]. Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H. y Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2066.
- [61]. Trimble, H. (1886). *Practical and Analytical Chemistry: Being a Complete Course in Chemical Analysis*. P. Blakiston, Son & Company.
- [62]. Unnanuntana, A., Bonsignore, L., Shirtliff, M. E., y E. M., Greenfield. (2009). The effects of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilms and osteoblasts. An *in vitro* study. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 91:2683-2692.
- [63]. Wegener, A., Damborg, P., Guardabassi, L., Moodley, A., Mughini-Gras, L., Duim, B., Wagenaar, J. A., y Broens, E. M. (2020). Specific staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types and clonal complexes are associated with low-level amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 75(3): 508-511.