

Evaluación de compuestos naturales contra patógenos resistentes a fármacos convencionales

Evaluation of natural compounds against pathogens resistant to conventional drugs

Calvillo-Zacarias Daniela¹, González-Gómez Goretti², Martínez-Jiménez David², Rangel-Mata Francisco Jaavier³, Ramírez-Loya Priscila¹, Rodríguez- Ramírez Juan Pablo Armando¹, Rodríguez-Solís Mayra Cecilia², Alva-Murillo, Patricia Nayeli^{1,2}

¹ Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

² Licenciatura en Biología Experimental, Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Campus Campestre, Universidad La Salle Bajío.
pn.alva@ugto.mx

Resumen

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una crisis sanitaria global que se presenta en la medicina humana y veterinaria. Al haber pocos medicamentos para combatir a los microorganismos patógenos, las infecciones son más difíciles de tratar, aumentando el riesgo de su propagación y de más muertes. Lo anterior impulsa la búsqueda de alternativas terapéuticas, principalmente compuestos de origen natural, tales como la nisina y el octanoato de sodio. Ambos son compuestos generalmente reconocidos como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos de USA. Dos patógenos con impacto en los humanos y animales de interés pecuario son el parásito *Trichomonas vaginalis* y la bacteria *Staphylococcus aureus* (que forma biopelículas), respectivamente; en ambos casos ya se ha reportado la resistencia al tratamiento convencional. Este estudio evaluó el efecto antimicrobiano de la nisina y octanoato de sodio, solos y mezclados, sobre *T. vaginalis* y la biopelícula de *S. aureus*. La nisina no afectó el crecimiento del parásito; la concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *S. aureus* fue de 500 µg/mL y bactericida (CMB) fue de >1000 µg/mL. El octanoato redujo el crecimiento de *T. vaginalis*; la CMI y la CMB determinadas para *S. aureus* fueron de 8.3 y 16.6 mg/mL, respectivamente. Además, este ácido graso interfiere en la biopelícula de *S. aureus* preformada. Se concluye que el octanoato es un agente prometedor, pero se requieren más estudios para optimizar su uso en aplicaciones clínicas y veterinarias frente a patógenos multirresistentes.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Trichomonas vaginalis*, nisina, octanoato, biopelículas, mastitis bovina, tricomoniasis.

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una de las mayores amenazas para la salud pública mundial, con proyecciones alarmantes por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que estima más de 10 millones de muertes anuales para el año 2050 si no se toman medidas urgentes (Organización Mundial de la Salud, 2016). Esta crisis sanitaria ha sido acelerada por el uso inadecuado y excesivo de antibióticos tanto en humanos como en animales de interés pecuario, lo cual ha propiciado la evolución y propagación de patógenos multirresistentes (Touaitia *et al.*, 2025). La situación es crítica ya que muchas de las infecciones que antes eran tratables se están volviendo intratables, dejando pocas o nulas opciones terapéuticas.

Entre los patógenos de preocupación, en la medicina humana, se identifica a *Trichomonas vaginalis*, un parásito protozooario responsable de la infección de transmisión sexual no viral más común a nivel global, la tricomoniasis. La OMS estima 26.4 millones de casos nuevos de tricomoniasis al año (WHO, 2021). *T. vaginalis* coloniza el tracto urogenital femenino y masculino, pudiendo provocar desde infecciones asintomáticas hasta vaginitis, uretritis y complicaciones durante el embarazo, tales como bajo peso al nacer y parto prematuro (Ngalame *et al.*, 2022). Su relación con el incremento en la transmisión del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y su asociación con el cáncer cervical (Centers for Disease Control and Prevention, 2024) lo posicionan como un problema de salud pública relevante.

El tratamiento clásico con los fármacos de la familia 5-nitroimidazoles, como el metronidazol, suele ser eficaz para eliminar la infección por *T. vaginalis*. El metronidazol fue introducido en la clínica en 1959, siendo un tratamiento genérico y barato (Graves *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha reportado un aumento en la resistencia de *T. vaginalis* a esta familia de fármacos. Particularmente, se ha estimado que entre el 2.2 y el 9.6% de los casos reportados de tricomoniasis son resistentes al metronidazol (Giacani *et al.*, 2025; Graves *et al.*, 2020). Lo anterior vuelve preocupante a la tricomoniasis resistente a los 5-nitroimidazoles, ya que existen pocos tratamientos alternativos. En este sentido, en el grupo de trabajo se han abordado moléculas de origen natural, como el extracto rico en lípidos de la semilla del aguacate mexicano (Martínez-Ríos, datos no publicados) y péptidos antimicrobianos (Ramírez-Ledesma *et al.*, 2022), con esta perspectiva.

Por otra parte, la bacteria *Staphylococcus aureus* es un patógeno que ha sido enlistada por la OMS, junto con otras 5, como bacterias que presentan multi resistencia a antimicrobianos (Venkateswaran *et al.*, 2023), representando una preocupación global de salud porque plantea desafíos terapéuticos en entornos clínicos. *S. aureus* es responsable de una amplia gama de infecciones en humanos, desde infecciones en la piel hasta nosocomiales (neumonía, endocarditis, osteomielitis y bacteremia) (Touaitia *et al.*, 2025). Mientras que en la medicina veterinaria se ha asociado con la mastitis bovina subclínica, generando pérdidas económicas significativas en la industria láctea (Campos *et al.*, 2022).

Algunas cepas de *S. aureus*, incluyendo las que causan mastitis bovina, son productoras de biopelículas, definidas como comunidades bacterianas encapsuladas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas, como ADN extracelular, polisacáridos y proteínas, secretadas por las mismas células bacterianas (Peng *et al.*, 2023). Las biopelículas confieren una protección adicional frente a entornos hostiles y a los tratamientos antimicrobianos, permitiendo el establecimiento de infecciones crónicas y recurrentes (Campos *et al.*, 2022). Las bacterias que producen mayores cantidades de biopelículas pueden sobrevivir incluso a concentraciones de antimicrobianos 64 veces superiores a la concentración mínima inhibitoria determinada para cultivos planctónicos (Demontier *et al.*, 2024). Ante este panorama surge la urgente necesidad de explorar alternativas terapéuticas innovadoras. En el grupo de trabajo, se han empleado moléculas de origen natural para abordar este problema, tales como péptidos antimicrobianos (nisina) y ácidos grasos de cadena media (octanoato de sodio) (Navarro-Acosta, 2023).

La nisina es un péptido antimicrobiano o bacteriocina producido por *Lactococcus lactis*, contiene 34 residuos de aminoácidos y fue aprobado como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos de EUA) y la OMS en 1969, y en 1988 recibió la denominación GRAS (Generalmente reconocido como seguro), siendo utilizado en más de 50 países (Jozala *et al.*, 2015). El mecanismo de acción antibacteriano de la nisina se basa en formar poros en la superficie de la célula e interferir en la síntesis de la pared celular, al unirse al lípido II (Negash & Tsehai, 2020). Entre las propiedades antimicrobianas de la nisina, poco se ha estudiado su actividad antiparasitaria, reportándose en *Acanthamoeba castellanii* (de Carvalho Clímaco *et al.*, 2022). Por otro lado, distintos estudios han abordado el efecto de la nisina sobre el crecimiento de *S. aureus* asociado a infecciones humanas o bovinas, enfocándose principalmente en la inhibición del crecimiento de células planctónicas, y algunos de ellos abordaron su efecto sobre la producción de biopelículas (Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016; Ghapanvari *et al.*, 2022; Karau *et al.*, 2025; Sánchez-Ceja *et al.*, 2018; Sharafi *et al.*, 2024).

Los ácidos grasos y sus derivados han mostrado tener propiedades antimicrobianas. El mecanismo antimicrobiano de los ácidos grasos puede asociarse con la interrupción de la cadena de transporte de electrones, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la lisis celular, la inhibición de la actividad enzimática, el deterioro de la absorción de nutrientes, la generación de productos tóxicos de peroxidación y autooxidación (Desbois & Smith, 2010; P. Desbois, 2012). El ácido octanoico o su sal, el octanoato de sodio, está presente en alimentos como en el coco, palmiste y leche (Alva-Murillo *et al.*, 2017). El octanoato de sodio tiene designación GRAS y se considera que es seguro, por lo que se emplea como saborizante y adyuvante en alimentos, debido a que no presenta toxicidad a grandes concentraciones (Nair *et al.*, 2005). Se ha reportado que el octanoato de sodio actúa contra bacterias como *Escherichia coli*, hongos como *Candida albicans* y parásitos como *Leishmania donovani* (Lee *et al.*, 2021; Nair *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2022). Por su parte, en el grupo de trabajo Navarro-Acosta identificó que el octanoato de sodio (solo y en combinación con nisina) afecta el crecimiento de células planctónicas de *S. aureus* asociados a mastitis bovina (Navarro-Acosta, 2023). Un grupo de investigación de Taiwán reportó la capacidad del octanoato de sodio de actuar sobre biopelículas de *S. aureus* proveniente de mastitis bovina recurrente (Lin *et al.*, 2023), pero no se ha evaluado sobre aislados mexicanos.

A nuestro entender, no se ha evaluado el efecto de la nisina ni del octanoato de sodio sobre el parásito *T. vaginalis* ni sobre las biopelículas producidas por aislados mexicanos de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina, el cual fue el principal objetivo de este estudio. Adicionalmente, se planteó combinar moléculas con distinto mecanismo de acción para identificar si se potenciaba su efecto.

Materiales y métodos

Material biológico

En el presente trabajo se emplearon dos cepas de *T. vaginalis*, una sensible (GT-13) (Padilla-Vaca & Anaya-Velázquez, 1997) y otra resistente (CDC-085) al metronidazol, que fueron cultivadas en medio TYI-S-33 con 6% de suero bovino adulto por 24 h (Ramírez-Ledesma *et al.*, 2022). Previamente se reportó que la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀) del metronidazol (M3761, Sigma-Aldrich®) sobre la cepa CDC-085 y GT-13 fue de 2.8 µM y 5.8 nM, respectivamente (Ramírez-Ledesma *et al.*, 2022).

Por otra parte, se utilizaron 3 aislados de *S. aureus* provenientes de mastitis bovina (AMC10, AMC51 y AVC2), así como una cepa certificada ATCC 27543, con mostrada multiresistencia antimicrobiana (Sánchez-Ceja *et al.*, 2018).

Identificación de aislados de *S. aureus* que producen biopelículas

La tinción con cristal violeta se empleó para identificar cuáles aislados bacterianos producían biopelículas, de acuerdo con lo reportado previamente (Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016; Khoramian *et al.*, 2015; Sharafi *et al.*, 2024; Stepanović *et al.*, 2007). Para ello, se inoculó una colonia bacteriana en 2 mL de caldo TSB (soja tripticaseína, 211768, Becton Dickinson) en un tubo de 15 mL y se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante de 180 rpm. El cultivo se ajustó a una densidad óptica (DO) de 0.2 a una longitud de onda de 600 nm (equivalente a 9.2x10⁷ UFC/mL), después se hicieron los cálculos necesarios y se diluyó el cultivo bacteriano con caldo TSB suplementado con 1% de glucosa (TSB-glu) para obtener 1x10⁶ UFC/mL en 200 µL. Este volumen se colocó por pozo en una microplaca de poliestireno, por triplicado para cada aislado de *S. aureus*. El TSB-glu se utilizó como control negativo o de esterilidad. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C sin agitación para permitir la formación de biopelículas, manteniendo un ambiente húmedo.

Cumplido el tiempo, la placa se lavó con PBS estéril (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.24g KH₂PO₄, 1.44g NaH₂PO₄*H₂O para 1 L, pH 7.4) para remover bacterias no adheridas. Después, las placas se secaron a temperatura ambiente y las biopelículas se fijaron con 100 µL de metanol/pozo durante 20 min. El metanol se retiró y las placas se secaron nuevamente a temperatura ambiente. Las biopelículas fijadas se tiñeron con 200 µL de cristal violeta al 0.1% durante 15 min. El exceso de tinción se eliminó lavando con agua de la llave hasta que no se observó color, y las placas se secaron a temperatura ambiente. Para destañar las biopelículas, se adicionaron 200 µL de ácido acético glacial al 33% por pozo, se tapó la caja y se dejó reposar durante 30 minutos, seguido de homogenización con pipeteo. Finalmente, la absorbancia se leyó a 590 nm. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Los aislados bacterianos se clasificaron como no productores, productores débiles, moderados o fuertes productores de biopelículas, para ello se calcularon los valores medios de la DO de todos los aislados analizados y el control negativo, se determinó el valor de corte (DOc):

$$DOc = \text{promedio DO del control negativo} + (3 * \text{Desv. Est. del control negativo})$$

Para cada experimento se calculó el valor de DOc. Los aislados bacterianos se clasificaron de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1. Interpretación de los resultados de la producción de biopelículas bacterianas.

	Clasificación	Símbolo
$DO \leq DOc$	No produce biopelículas	-
$DOc < DO \leq 2*DOc$	Débil productor	+
$2*DOc < DO \leq 4*DOc$	Productor moderado	++
$4*DOc < DO$	Fuerte productor de biopelículas	+++

DO, es el promedio de la DO de cada aislado bacteriano.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida de la nisina y octanoato sobre *S. aureus*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la nisina y del octanoato de sodio sobre las células planctónicas de los aislados de *S. aureus* se determinó por el método de microdilución, de acuerdo con las directrices del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI por sus siglas en inglés) (Sharafi et al., 2024). La nisina (N5764, Sigma-Aldrich®) se disolvió en HCl (0.02 M, pH 2) según lo reportado previamente (Tong et al., 2014); mientras que, el octanoato de sodio (C5038, Sigma-Aldrich®) se disolvió en agua. Ambas soluciones esterilizaron por filtración con membranas de 0.22 µm (Millipore®, USA). Se inoculó una colonia bacteriana en 2 mL de caldo Mueller Hinton (MH, #275730, Becton Dickinson), se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante a 180 rpm. Después, se ajustó el cultivo bacteriano a una DO₆₀₀ de 0.2 y el cultivo bacteriano se diluyó para obtener 5.5x10⁶ UFC/mL. Se colocaron 100 µL de cultivo diluido de cada aislado por pozo en una microplaca. Se prepararon diluciones seriadas de la nisina y octanoato de sodio, para tener concentraciones finales de 1,000 µg/mL hasta 15.62 µg/mL y 16.6 mg/mL a 0.26 mg/mL, respectivamente, se consideró un volumen final de 110 µL. Se incluyó el cultivo bacteriano y al vehículo de la nisina como control de crecimiento y el caldo MH como control de esterilidad. Cada tratamiento se realizó por triplicado. La placa se incubó durante 24 h a 37°C. La CMI se definió como la concentración más baja en la que no se observó crecimiento bacteriano visible.

Para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB), se realizó una dilución 1:10 de los pozos con inhibición de crecimiento, se sembraron 50 µL en placas de agar MH y se incubaron toda la noche a 37°C, esperando ausencia de crecimiento colonial.

Evaluación del efecto de la combinación de la nisina y el octanoato sobre las biopelículas preformadas

Para evaluar la actividad de la nisina y el octanoato de sodio sobre biopelículas bacterianas ya establecidas, se siguió un protocolo descrito previamente por Ceotto-Vigoder y col. (2016), y Lin y col. (2023). Inicialmente se formaron biopelículas según lo mencionado anteriormente, se permitió la formación de la biopelícula por 18 h a 37°C sin agitación. Luego, se aspiró el sobrenadante y se adicionaron 50 µL de Nisina y/o Octanoato de sodio, solos o en combinación, diluidos en caldo TSB-glu. Se ensayaron las CMI y la mitad de la CMI de cada compuesto, de manera independiente y en combinación. También se incluyeron controles de vehículo y esterilidad. Posteriormente, se añadieron 150 µL de TSB-glu a cada pozo y las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a la cuantificación de las biopelículas mediante tinción con cristal violeta, como se indicó anteriormente.

Evaluación del efecto de la nisina y octanoato sobre el crecimiento de *T. vaginalis*

Tras un período de crecimiento de 24 h, los trofozoítos de cada cepa de *T. vaginalis* se despegaron del tubo al ser colocados en baño de hielo por 10 min, se centrifugaron en un tubo de 15 mL estéril a 375 x g (1,500 rpm) por 5 min. El paquete de trofozoítos se resuspendió en PBS y se procedió al conteo en la cámara de Neubauer. Se realizaron los cálculos pertinentes para adicionar 4×10^4 trofozoítos/100 μ L de medio TYI-S-33 con suero, por pozo en una placa de 96 pozos. Los tratamientos evaluados fueron i) 4,000 UI/mL de nisina de acuerdo con lo reportado para parásitos (de Carvalho Clímaco *et al.*, 2022), ii) 2% vehículo de la Nisina (v/v), y iii) 33.4 mg/mL o 200 mM octanoato de sodio en un volumen final de 200 μ L. Se utilizó la CMI₅₀ del metronidazol, para cada cepa, como control de inhibición del crecimiento. Cada cepa sin tratamiento fungió como el control de crecimiento. Se empleó medio TYIS-33 modificado (con 20 mM de bicarbonato de sodio y 100 mM HEPES) en los tratamientos con péptido antimicrobiano (Ramírez-Ledesma *et al.*, 2022). La microplaca se incubó 24 h a 37°C en condiciones de microanaerobiosis. Cumplido el tiempo, se despegaron los trofozoítos al colocarlos en baño de hielo, se fijaron con un volumen de glutaraldehído al 4%, y se procedió a contar los trofozoítos móviles y refringentes en la cámara de Neubauer. El experimento se realizó al menos 3 veces de manera independiente, por triplicado.

Resultados y discusión

La capacidad de formar biopelículas es un factor de virulencia crucial en la patogénesis en las infecciones por *S. aureus*, ya que contribuye a la resistencia a los antibióticos y a la persistencia de la infección (Touaitia *et al.*, 2025). Al evaluar la capacidad de los cuatro aislados fármaco resistentes de *S. aureus*, asociados a mastitis bovina en la producción de biopelículas, se observó que tres de ellos son fuertes productores (AMC10, AMC51 y AVC2); mientras que uno de ellos (ATCC 27543) es débil productor de biopelículas (Tabla 2).

Tabla 2. Formación de biopelículas de aislados de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina.

Aislado	Clasificación	Abs 590 nm
AMC10	+++	1.925 $\pm$ 0.256
AMC51	+++	1.091 $\pm$ 0.140
AVC2	+++	2.081 $\pm$ 0.314
ATCC 27543	+	0.432 $\pm$ 0.095

Nota. -, no producción; +, débil producción; ++, moderada producción; +++, fuerte producción. Los resultados representan la media y el error estándar de al menos cinco experimentos independientes por triplicado.

Este hallazgo concuerda con lo reportado por la literatura de apoyo, que asocia la alta producción de biopelículas con la persistencia de las infecciones intramamarias en bovinos (Ceotto-Vigoder *et al.*, 2016; Demontier *et al.*, 2024). Esta matriz extracelular protege del sistema inmune del hospedero y de los agentes antimicrobianos a las bacterias, lo que explicaría por qué la mastitis estafilocócica a menudo se vuelve crónica y recurrente. Estos resultados reafirman la importancia de esta característica como un factor clave de virulencia en los aislados de *S. aureus* de origen bovino.

En la búsqueda de alternativas a los antibióticos tradicionales, evaluamos la actividad antimicrobiana de la nisina y el octanoato de sodio contra los aislados de *S. aureus* de mastitis bovina. Además, se cuantificó la capacidad de degradar biopelículas ya establecidas. La nisina es un péptido antimicrobiano de origen bacteriano, mientras que el octanoato de sodio es un derivado de ácido graso (Jozala *et al.*, 2015; P. Desbois, 2012).

Primero se determinó la CMI y la CMB de la nisina y del octanoato de sodio sobre los cuatro aislados de *S. aureus* multiresistentes provenientes de vacas con mastitis. En cuanto a la CMI de la nisina, no se observó crecimiento visible al emplear la concentración de 500 µg/mL en ningún aislado bacteriano (Tabla 3); no obstante, en el primer ensayo, al recuperar el cultivo de esa condición e inocular en agar MH, se detectaron colonias bacterianas. Por lo que, en los ensayos posteriores se decidió probar 1000 µg/mL, donde no se observó crecimiento visible. Al igual que en el caso anterior, se identificaron colonias bacterianas en el agar MH. Por lo que, la CMB de la nisina es mayor que 1000 µg/mL (Tabla 3). Estos hallazgos indican que, si bien la nisina puede retrasar el crecimiento de los aislados (bacteriostático), se requieren concentraciones significativamente mayores para lograr un efecto bactericida.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de la nisina sobre aislados de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina.

Aislado	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
AMC10	500	>1000
AMC51	500	>1000
AVC2	500	>1000
ATCC 27543	500	>1000

Nota. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. CMI, concentración mínima inhibitoria; CMB, concentración mínima bactericida.

Por su parte, el octanoato de sodio (Tabla 4) demostró ser eficaz contra todos los aislados con una CMI de 8.3 mg/mL (48.15 mM) y una CMB de 16 mg/mL (96.3 mM). La acción de estos compuestos se atribuye a su capacidad para desestabilizar las membranas celulares bacterianas (Royce *et al.*, 2013). Se ha sugerido como un mecanismo prometedor para combatir la resistencia a los antibióticos. Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos en entornos reales, como la glándula mamaria, puede variar, ya que la actividad *in vitro* no siempre se mantiene al ser probada *in vivo*, debido a la posible interferencia de los componentes de la leche.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y bactericida del octanoato de sodio sobre aislados de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina.

Aislado	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
AMC10	8.3	16
AMC51	8.3	16
AVC2	8.3	16
ATCC 27543	8.3	16

Nota. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. CMI, concentración mínima inhibitoria; CMB, concentración mínima bactericida.

Una vez determinada la CMI de la nisina y del octanoato de sodio para los cuatro aislados bacterianos, se decidió evaluar su efecto sobre las biopelículas preformadas, empleando las CMI de los compuestos, así como la mitad de dichas concentraciones, solos y en combinación. Los resultados preliminares indican que las biopelículas formadas por los aislados bacterianos que son fuertes productores de biopelículas, se inhibe su formación un 34-52% al tratarlas 24 h con 4.15 mg/mL de octanoato de sodio (Figuras 1-3).

El octanoato de sodio redujo en un 10 y 34% la biopelícula preformada por el asilado AMC10, al ser utilizado a 8.3 y 4.15 mg/mL, respectivamente (Figura 1). No se detectó que la nisina tuviera un efecto en este parámetro. Al mezclar 500 µg/mL de nisina con 4.15 mg/mL de octanoato de sodio, disminuyó cerca de un 25% la biopelícula preformada, ello puede deberse al ácido graso.

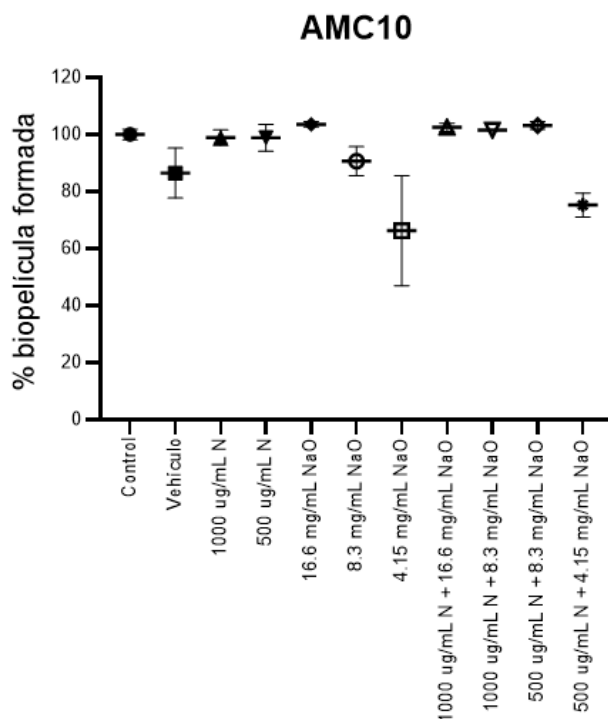


Figura 1. Efecto de la nisina y del octanoato de sodio sobre la biopelícula preformada del aislado AMC10. Se permitió la formación de la biopelícula por 18 h, después se trató con distintas concentraciones de nisina (N) y octanoato de sodio (NaO), solos y en combinación, por 24 h. Se realizó un experimento por triplicado.

La nisina no afectó la biopelícula preformada por el aislado AMC51, en ninguna de las concentraciones empleadas (Figura 2). El octanoato de sodio redujo la biopelícula preformada en un 13.73, 21.4 y 56% al ser tratada con 16.6, 8.3 y 4.15 mg/mL, respectivamente. Al igual que con el aislado bacteriano anterior, la mezcla de 500 µg/mL de nisina con 4.15 mg/mL de octanoato de sodio disminuyó un 35.4% la biopelícula preformada, lo cual pudiera deberse solamente al efecto del octanoato.

El porcentaje de biopelícula preformada del aislado AVC2, se incrementó ligeramente (7%) al ser tratada con 500 µg/mL (Figura 3). 4.15 mg/mL de octanoato de sodio redujo un 52.5% la biopelícula. Mientras que, la mezcla de 500 µg/mL de nisina con 8.3 mg/mL de octanoato, y 500 µg/mL de nisina con 4.15 mg/mL de octanoato disminuyeron ~16% la biopelícula preformada.

En cuanto a la cepa certificada ATCC 27543, que es débil productora de biopelícula (Tabla 2), se identificaron más tratamiento con efecto sobre la biopelícula preformada. Las concentraciones de 16.6 y 8.3 mg/mL de octanoato de sodio redujeron la biopelícula formada en ~30 y 37%, respectivamente (Figura 4). A diferencia del efecto de 4.15 mg/mL de octanoato de sodio sobre las biopelículas de los aislados AMC10, AMC51 y AVC2, en este caso no la afectó. La combinación de 1000 µg/mL de nisina con 16.6 mg/mL de octanoato de sodio, así como 500 µg/mL del péptido con 8.3 mg/mL del octanoato o con 4.15 mg/mL del ácido graso, disminuyeron la biopelícula preformada en un 43.5, 44 y 18.1%.

Es necesario realizar dos ensayos independientes por triplicado para poder sugerir una conclusión.

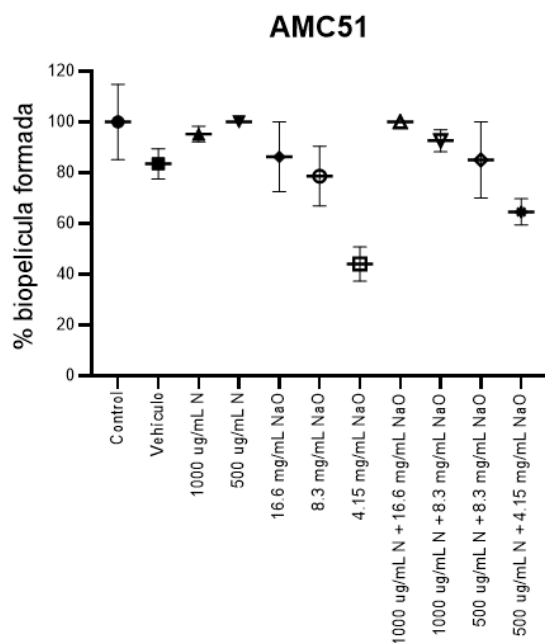


Figura 2. Efecto de la nisina y del octanoato de sodio sobre la biopelícula preformada del aislado AMC51. Se permitió la formación de la biopelícula por 18 h, después se trató con distintas concentraciones de nisina (N) y octanoato de sodio (NaO), solos y en combinación, por 24 h. Se realizó un experimento por triplicado.

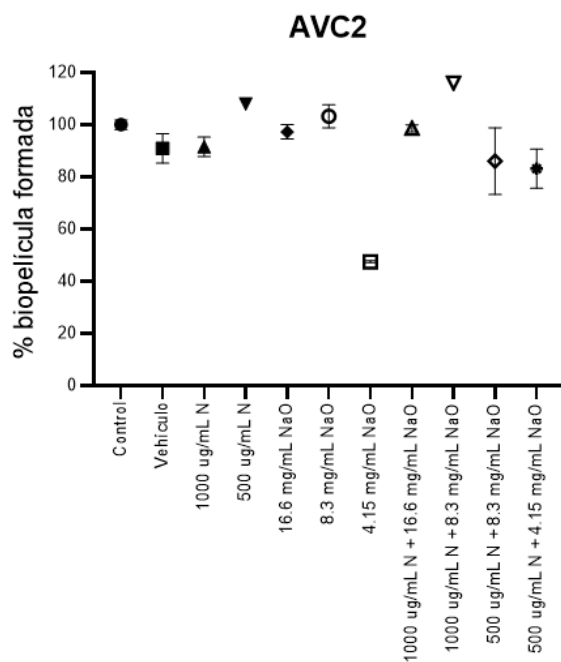


Figura 3. Efecto de la nisina y del octanoato de sodio sobre la biopelícula preformada del aislado AVC2. Se permitió la formación de la biopelícula por 18 h, después se trató con distintas concentraciones de nisina (N) y octanoato de sodio (NaO), solos y en combinación, por 24 h. Se realizó un experimento por triplicado.

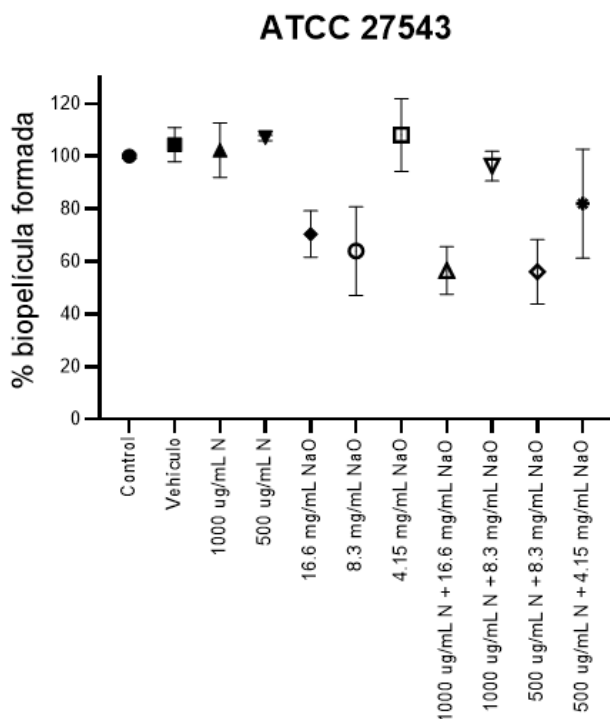


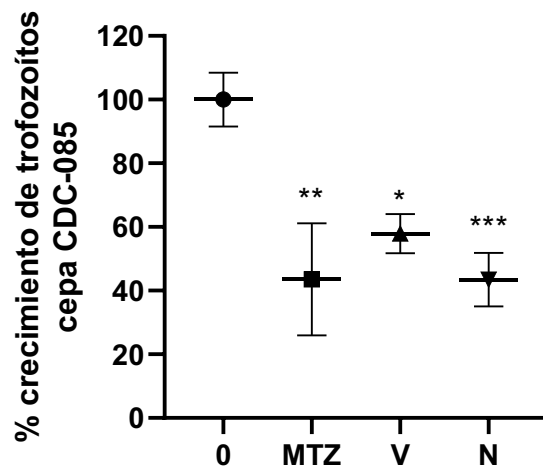
Figura 4. Efecto de la nisina y del octanoato de sodio sobre la biopelícula preformada del aislado ATCC 27543. Se permitió la formación de la biopelícula por 18 h, después se trató con distintas concentraciones de nisina (N) y octanoato de sodio (NaO), solos y en combinación, por 24 h. Se realizó un experimento por triplicado.

Simultáneamente, se realizaron estudios para evaluar el crecimiento de trofozoítos de *T. vaginalis*, empleando una cepa resistente al metronidazol (CDC-085) y una cepa sensible al metronidazol (GT-13). Se aplicaron tratamientos específicos según la cepa, incluyendo la CMI₅₀ de metronidazol para cada cepa, el vehículo de la nisina al 2% (v/v), y la nisina (4,000 UI/mL de nisina). Después de 24 h de incubación en anaerobiosis, se contabilizaron los trofozoítos viables. Como era de esperarse, el metronidazol redujo en $43.5\% \pm 17.6$ y $64.5\% \pm 12.2$ el crecimiento de la cepa resistente y sensible, respectivamente (Figura 5). Contrario a lo que se esperaba, el vehículo disminuyó el crecimiento de ambas cepas, en la misma proporción que lo hizo la nisina. Por ello, la reducción del crecimiento parasitario observado con la nisina podría deberse al efecto del vehículo, más que al del péptido antimicrobiano.

En cuanto al octanoato de sodio, este ácido graso de cadena media (200 mM) disminuyó el crecimiento de la cepa CDC-085 (resistente) un 57.79%; mientras que, solo se recuperó el 12.17% de trofozoítos viables de la cepa sensible (GT-13) (Figura 6). El efecto generado por el octanoato de sodio parece ser dependiente de la sensibilidad al metronidazol.

Actualmente se están realizando ensayos para determinar la CMI₅₀ del octanoato de sodio para ambas cepas. Con ello se pretende realizar la mezcla de la CMI₅₀ del metronidazol con la CMI₅₀ del octanoato y evaluar el efecto sobre el crecimiento de cada cepa.

A)



B)

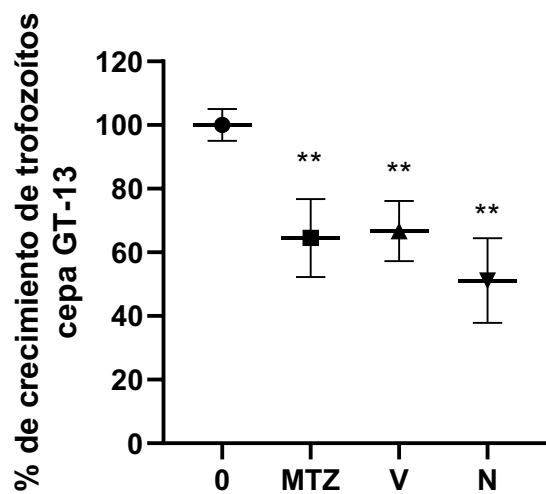
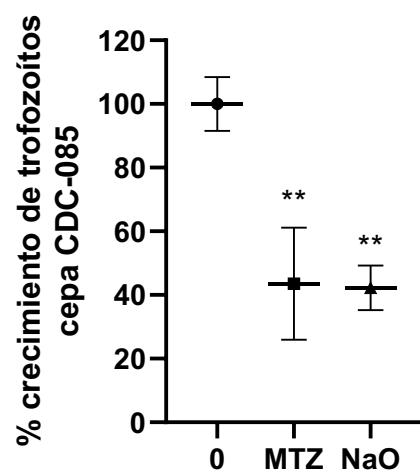


Figura 5. Efecto de la nisina sobre el crecimiento de *T. vaginalis*.

Trofozoítos de la cepa resistente CDC-085 (A) y de la cepa sensible GT-13 (B) se pusieron a interactuar con nisina (4,000 UI/mL), con el vehículo de la nisina (2% de HCl 0.2 M, pH 2), así como con su respectiva CMI₅₀ de metronidazol (2.8 μ M y 5.8 nM, respectivamente) por 24 h. Se gráfica el promedio de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, seguida por una prueba post-hoc de Tukey.

*, $p=0.01$; **, $p<0.003$; ***, $p<0.0009$. MTZ, metronidazol; N, nisina; V, vehículo.

A)



B)

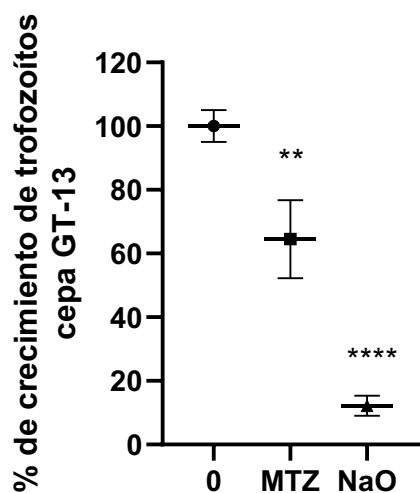


Figura 6. Efecto de la nisina sobre el crecimiento de *T. vaginalis*.

Trofozoítos de la cepa resistente CDC-085 (A) y de la cepa sensible GT-13 (B) se pusieron a interaccionar con octanoato de sodio (33.4 mg/mL o 200 mM), así como con su respectiva CMI₅₀ de metronidazol (2.8 μ M y 5.8 nM, respectivamente) por 24 h. Se gráfica el promedio de tres experimentos independientes por triplicado. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, seguida por una prueba post-hoc de Tukey. **, $p < 0.001$;

****, $p < 0.0001$. MTZ, metronidazol; NaO, octanoato de sodio.

Conclusiones

En conclusión, el octanoato es un agente prometedor para combatir patógenos de interés en la medicina humana y veterinaria, tales como *T. vaginalis* y *S. aureus*, respectivamente, aunque su eficacia varía según la cepa. Además, el octanoato de sodio disrumpe las biopelículas producidas por *S. aureus*. No obstante, se requieren estudios adicionales para optimizar concentraciones y explorar combinaciones que mejoren su aplicación en el tratamiento de infecciones resistentes asociadas a mastitis bovina.

Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por la Convocatoria de Investigación e Innovación Tecnológica 2024-2 de la Universidad La Salle Bajío, a través del MC. FJRM (CIIT-2024-02-06).

Referencias

- Alva-Murillo, N., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2017). Sodium octanoate modulates the innate immune response of bovine mammary epithelial cells through the TLR2/P38/JNK/ERK1/2 pathway: Implications during *Staphylococcus aureus* internalization. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00078>
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., de Oliveira Mendes, T. A., Fitzgerald, J. R., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2022). Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives. In *BMC Veterinary Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03197-5>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2024, April 25). *Acerca de la tricomoniasis*. <https://www.cdc.gov/trichomoniasis/es/about/acerca-de-la-tricomoniasis.html>
- Ceotto-Vigoder, H., Marques, S. L. S., Santos, I. N. S., Alves, M. D. B., Barrias, E. S., Potter, A., Alviano, D. S., & Bastos, M. C. F. (2016). Nisin and lysostaphin activity against preformed biofilm of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1). <https://doi.org/10.1111/jam.13136>
- de Carvalho Clímaco, M., de Oliveira, Y. L. M., Ramos, A. C. S., Ramos-de-Souza, J., Silva, A. R. S. T., Jain, S., Rott, M. B., Scher, R., Correa, C. B., Barbosa, A. A. T., & Dolabella, S. S. (2022). Nisin induces cell-cycle arrest in free-living amoebae *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Parasitologica*, 67(1). <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00436-x>
- Demontier, E., Ster, C., Chamberland, S., Ramanathan, S., Dufour, S., & Malouin, F. (2024). Biofilm Dairy Foods Review: Effect of biofilm production on antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis strains from the most prevalent Canadian spa types. *Journal of Dairy Science*, 108(8), 8176-8186. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25238>
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629-1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Ghapanvari, P., Taheri, M., Jalilian, F. A., Dehbashi, S., Dezfuli, A. A. Z., & Arabestani, M. R. (2022). The effect of nisin on the biofilm production, antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Medical Research*, 27(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00804-x>
- Giacani, L., Bradshaw, C. S., Muzny, C. A., Graves, K. J., Pasricha, S., Jordan, S. J., & Allan-Blitz, L.-T. (2025). Antimicrobial resistance in curable sexually transmitted infections. *Current HIV/AIDS Reports*, 22(1), 14. <https://doi.org/10.1007/s11904-025-00722-7>
- Graves, K. J., Novak, J., Secor, W. E., Kissinger, P. J., Schwebke, J. R., & Muzny, C. A. (2020). A systematic review of the literature on mechanisms of 5-nitroimidazole resistance in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, 147(13). <https://doi.org/10.1017/S0031182020001237>
- Jozala, A. F., Novaes, L. C. de L., & Pessoa, A. (2015). Nisin. *Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials*. InTech. <https://doi.org/10.5772/60932>

- Karau, M. J., Kosciński, C. A., Badley, A. D., Bedard, N. A., Zinckgraf, J. W., & Patel, R. (2025). In vitro activity of nisin A against Staphylococci isolated from periprosthetic joint infection. *Antibiotics*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050515>
- Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., & Emameini, M. (2015). Comparison of virulence factors and biofilm formation among Staphylococcus aureus strains isolated from human and bovine infections. *Microbial Pathogenesis*, 88. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.007>
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Khadke, S. K., & Lee, J. (2021). Antibiofilm and antifungal activities of medium-chain fatty acids against Candida albicans via mimicking of the quorum-sensing molecule farnesol. *Microbial Biotechnology*, 14(4). <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13710>
- Lin, W. C., Hsu, K. C., You, M. F., Lee, K. H., Chi, C. H., & Chen, J. Y. (2023). Octanoic acid promotes clearance of antibiotic-tolerant cells and eradicates biofilms of Staphylococcus aureus isolated from recurrent bovine mastitis. *Biofilm*, 6. <https://doi.org/10.1016/j.biofm.2023.100149>
- Nair, M. K. M., Joy, J., Vasudevan, P., Hinckley, L., Hoagland, T. A., & Venkitanarayanan, K. S. (2005). Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*, 88(10). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73033-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73033-2)
- Navarro-Acosta, F. A. (2023). La mezcla de nisina y octanoato como alternativa potencial contra la formación de biopelículas de Staphylococcus aureus: implicaciones en la mastitis bovina [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Guanajuato.
- Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020(1). <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Ngalame, A. N., Mubiana-Mbewe, M., & Dionne, J. A. (2022). Genital tract infections in women, pregnancy and neonates. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 49(4). <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2022.07.004>
- Organización Mundial de la Salud (Ed.). (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos.
- P. Desbois, A. (2012). Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other industries. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(2). <https://doi.org/10.2174/157489112801619728>
- Padilla-Vaca, F., & Anaya-Velázquez, F. (1997). Biochemical properties of a neuraminidase of Trichomonas vaginalis. *Journal of Parasitology*, 83(6). <https://doi.org/10.2307/3284352>
- Peng, Q., Tang, X., Dong, W., Sun, N., & Yuan, W. (2023). A review of biofilm formation of Staphylococcus aureus and its regulation mechanism. *Antibiotics*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>
- Prasad, S. R., Kumar, P., Mandal, S., Mohan, A., Chaurasia, R., Shrivastava, A., Nikhil, P., Aishwarya, D., Ramalingam, P., Gajbhiye, R., Singh, S., Dasgupta, A., Chourasia, M., Ravichandiran, V., Das, P., & Mandal, D. (2022). Mechanistic insight into the role of mevalonate kinase by a natural fatty acid-mediated killing of Leishmania donovani. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20509-9>
- Ramírez-Ledesma, M. G., Rodríguez, M. C., Alva-Murillo, N., & Avila, E. E. (2022). The antimicrobial peptides LL-37, KR-20, FK-13 and KR-12 inhibit the growth of a sensitive and a metronidazole-resistant strain of Trichomonas vaginalis. *Parasitology Research*, 121(12). <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07674-6>
- Royce, L. A., Liu, P., Stebbins, M. J., Hanson, B. C., & Jarboe, L. R. (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on Escherichia coli membranes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(18). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5113-5>
- Sánchez-Ceja, M., Arceo-Martínez, M. T., Sandoval-Flores, M. G., Alva-Murillo, P. N., Jiménez-Mejía, R., & Loeza-Lara, P. D. (2018). Use of nisin and chitosan for the inhibition of antibiotic resistant Staphylococcus aureus bovine mastitis-associated. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 9(4). <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i4.4468>
- Sharafi, T., Ghaemi, E. A., Rafiee, M., & Ardebili, A. (2024). Combination antimicrobial therapy: in vitro synergistic effect of anti-staphylococcal drug oxacillin with antimicrobial peptide nisin against Staphylococcus epidermidis clinical isolates and Staphylococcus aureus biofilms. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00667-6>

- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8). https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Tong, Z., Zhang, L., Ling, J., Jian, Y., Huang, L., & Deng, D. (2014). An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on biofilms as well as on planktonic bacteria of *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099513>
- Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Idres, T., & Touati, A. (2025). *Staphylococcus aureus*: A review of the pathogenesis and virulence mechanisms. *Antibiotics*, 14(5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/antibiotics14050470>
- Venkateswaran, P., Vasudevan, S., David, H., Shaktivel, A., Shanmugam, K., Neelakantan, P., & Solomon, A. P. (2023). Revisiting ESKAPE pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1159798>
- World Health Organization (WHO). (2021). Guidelines for the management of symptomatic sexually transmitted infections. In *World Health Organization*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/342523/9789240024168-eng.pdf?sequence=1>