



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN
VITRO DE ANTRAQUINONAS SOBRE *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA*”**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTA**

AUTOR: IDANIA ELOÍSA SANMARTÍN RUÍZ

DIRECTOR: PhD. JUAN MARCELO CARPIO ARÉVALO

CUENCA- ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE
ANTRAQUINONAS SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*”**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICO FARMACEUTA.**

AUTOR: IDANIA ELOÍSA SANMARTÍN RUÍZ

DIRECTOR: PhD. JUAN MARCELO CARPIO ARÉVALO

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

FACULTAD DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE ANTRAQUINONAS SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Idania San Martín

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, antraquinonas, resistencia bacteriana.

Resumen

Introducción: El aumento de infecciones hospitalarias causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria resistente a múltiples antibióticos, requiere urgente búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, las antraquinonas, compuestos orgánicos hallados en plantas, se perfilan como una promisoriosa solución debido a su conocida actividad antimicrobiana; sin embargo, su efecto específico sobre *Pseudomonas aeruginosa* no ha sido suficientemente explorado.

Objetivo: Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de antraquinonas sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodología: El estudio fue de tipo experimental, en el cual se analizó la acción antibacteriana de las antraquinonas: 1,2-dihidroxiantraquinonas, 1,5-dihidroxiantraquinonas, 1,8-dihidroxiantraquinonas, 1,5-dinitroantraquinona, 1,8-dihidroxi-4,5dinitroantraquinona, 1-cloroantraquinona, 2-cloroantraquinona, 1,5-dicloroantraquinona y 1,8-dicloroantraquinona. Para este fin se emplearon los métodos de macrodilución para identificar las antraquinonas más activas y se determinó la concentración mínima inhibitoria.

Resultados: Se identificó que la 1,8-dihidroxi-antraquinona y la 1,2-dihidroxi-antraquinona exhibieron un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusión: Las antraquinonas 1,8-dihidroxi-antraquinona y 1,2-dihidroxi-antraquinona demostraron ser efectivas contra *Pseudomonas aeruginosa*, sugiriendo su potencial como agentes antimicrobianos para abordar la resistencia bacteriana en futuras aplicaciones terapéuticas.

ACADEMIC DEPARTMENT OF HEALTH AND WELLNESS

FACULTY OF BIOCHEMISTRY AND PHARMACY

EVALUATION OF THE IN VITRO ANTIBACTERIAL EFFECT OF ANTHRAQUINONES ON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Idania San Martin

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, anthraquinones, bacterial resistance.

Abstract

Introduction: The increase in hospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium resistant to multiple antibiotics, requires an urgent search for new therapeutic alternatives. In this context, anthraquinones, organic compounds found in plants, emerge as a promising solution due to their known antimicrobial activity; however, their specific effect on *Pseudomonas aeruginosa* has not been sufficiently explored.

Objective: To evaluate *in vitro* the antibacterial effect of anthraquinones on *Pseudomonas aeruginosa*.

Methodology: The study was experimental; the antibacterial action of anthraquinones was analyzed at 1,2 dihydroxyanthraquinones, 1,5 dihydroxyanthraquinones, 1,8 dihydroxyanthraquinones, 1,5 dinitroanthraquinone, 1,8 dihydroxy-4, 5 dinitro anthraquinone, 1 chloroanthraquinone, 2 chloroanthraquinone, 1,5 dichloroanthraquinone, and 1,8 dichloroanthraquinone. For this purpose, microdilution methods were used to identify the most active anthraquinones and determine the minimum inhibitory concentration.

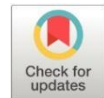
Results: It was identified that 1,8 dihydroxyanthraquinone and 1,2 dihydroxyanthraquinone exhibited an apparent inhibitory effect on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*.



Conclusion: Anthraquinones at 1,8 dihydroxyanthraquinone and 1,2 dihydroxyanthraquinone were shown to be effective against *Pseudomonas aeruginosa*, suggesting their potential as antimicrobial agents to address bacterial resistance in future therapeutic applications.

Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* de antraquinonas sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Evaluation of the in vitro antibacterial effect of anthraquinones on Pseudomonas aeruginosa

Idania San Martín, PhD. Juan Marcelo Carpio Arévalo



¹	Idania San Martín		https://orcid.org/
	Estudiante, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Iesanmartinr82@est.ucacue.edu.ec		
²	PhD. Juan Marcelo Carpio Arévalo		https://orcid.org/0000-0003-3313-4905
	Docente Bioquímico, Universidad Católica de Cuenca, Cuenca, Ecuador. jmcarpioa@ucacue.edu.ec		

Artículo de Investigación Científica y Tecnológica

Enviado: 10/10/2022

Revisado: 25/10/2022

Aceptado: 08/11/2022

Publicado: 05/01/2022

DOI:

Cítese:

Datos de la revista

Datos de la revisa

Datos de la revisa

Datos de la revisa



ANATOMÍA DIGITAL, es una revista electrónica, Trimestral, que se publicará en soporte electrónico tiene como misión contribuir a la formación de profesionales competentes con visión humanística y crítica que sean capaces de exponer sus resultados investigativos y científicos en la misma medida que se promueva mediante su intervención cambios positivos en la sociedad. <https://anatomiadigital.org>

La revista es editada por la Editorial Ciencia Digital (Editorial de prestigio registrada en la Cámara Ecuatoriana de Libro con No de Afiliación 663) www.celibro.org.ec



Esta revista está protegida bajo una licencia Creative Commons Attribution Non Commercial No Derivatives 4.0 International. Copia de la licencia: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

<p>Palabras claves:</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i>, antraquinonas, resistencia bacteriana</p>	<p>Resumen</p> <p>Introducción. El aumento de infecciones hospitalarias causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, una bacteria resistente a múltiples antibióticos, requiere urgente búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. En este contexto, las antraquinonas, compuestos orgánicos hallados en plantas, se perfilan como una promisoriosa solución debido a su conocida actividad antimicrobiana; sin embargo, su efecto específico sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no ha sido suficientemente explorado.</p> <p>Objetivo. Evaluar <i>in vitro</i> el efecto antibacteriano de antraquinonas sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p> <p>Metodología. El estudio fue de tipo experimental, en el cual se analizó la acción antibacteriana de las antraquinonas: 1,2-dihidroxi-antraquinonas, 1,5-dihidroxi-antraquinonas, 1,8-dihidroxi-antraquinonas, 1,5-dinitro-antraquinona, 1,8 dihidroxi-4,5-dinitro-antraquinona, 1-cloro-antraquinona, 2-cloro-antraquinona, 1,5-dicloro-antraquinona y 1,8-dicloro-antraquinona. Para este fin se emplearon los métodos de macrodilución para identificar las antraquinonas más activas y se determinó la concentración mínima inhibitoria.</p> <p>Resultados. Se identificó que la 1,8-dihidroxi-antraquinona y la 1,2-dihidroxi-antraquinona exhibieron un claro efecto inhibitorio sobre el crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p> <p>Conclusión. Las antraquinonas 1,8-dihidroxi-antraquinona y 1,2-dihidroxi-antraquinona demostraron ser efectivas contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, sugiriendo su potencial como agentes</p>
--	---

	<p>antimicrobianos para abordar la resistencia bacteriana en futuras aplicaciones terapéuticas.</p> <p>Área de estudio general: Bioquímica y Farmacia</p> <p>Área de estudio específica: Farmacia</p> <p>Tipo de estudio: Artículos originales</p>
<p>Keywords: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, anthraquinones, bacterial resistance</p>	<p>Abstract</p> <p>Introduction. The increase in hospital infections caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, a bacteria resistant to multiple antibiotics, requires an urgent search for new therapeutic alternatives. In this context, anthraquinones, organic compounds found in plants, are emerging as a promising solution due to their known antimicrobial activity; however, its specific effect on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> has not been sufficiently explored.</p> <p>Objective. To evaluate in vitro the antibacterial effect of anthraquinones on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p> <p>Methodology. The study was experimental, in which the antibacterial action of anthraquinones was analyzed: 1,2-dihydroxyanthraquinones, 1,5-dihydroxyanthraquinones, 1,8-dihydroxyanthraquinones, 1,5-dinitroanthraquinone, 1,8-dihydroxyanthraquinones, 4,5dinitroanthraquinone, 1-chloroanthraquinone, 2-chloroanthraquinone, 1,5-dichloroanthraquinone and 1,8-dichloroanthraquinone. For this purpose, macrodilution methods were used to identify the most active anthraquinones and the minimum inhibitory concentration was determined.</p> <p>Results. It was identified that 1,8-dihydroxyanthraquinone and 1,2-dihydroxyanthraquinone exhibited a clear inhibitory effect on the growth of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p> <p>Conclusion. The anthraquinones 1,8-dihydroxyanthraquinone and 1,2-dihydroxyanthraquinone were shown to be effective against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, suggesting their potential as antimicrobial agents to address bacterial resistance in future therapeutic applications.</p>

Introducción

Las bacterias gram negativas son un grupo de microorganismos que abarca una variedad de patógenos importantes para la salud humana, incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (1).

Pseudomonas aeruginosa, es considerada como un patógeno oportunista que es responsable de una gama de infecciones nosocomiales; puede causar infecciones graves especialmente en personas con sistemas inmunológicos debilitados o en aquellos que están hospitalizados por periodos prolongados (2). En infecciones adquiridas en hospitales representan, a nivel mundial, entre el 11% y el 13,8% de todas las infecciones en dicho contexto; en las unidades de cuidados intensivos (UCI) esta bacteria provoca una proporción aún mayor de infecciones, con índices que varían del 13,2% al 22,6% (3).

En Latinoamérica la prevalencia de infecciones asociadas a *Pseudomonas aeruginosa* puede variar entre un 7,76% observado en Paraguay hasta un 38,8% en Colombia, según estadísticas del año 2020 al 2022 referidas por Miranda y Lucas (4). Las infecciones causadas por esta bacteria gram-negativa pueden variar desde infecciones urinarias, neumonías hasta septicemias, con tasas de mortalidad significativas asociadas (5). Se ha encontrado una alta incidencia de este tipo de infecciones en pacientes que, debido a múltiples condiciones, utilizaban un catéter del tracto urinario superior (6).

La resistencia bacteriana a los antibióticos ha emergido como una de las principales amenazas para la salud pública mundial. Específicamente, *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista, ha sido identificado como uno de los microorganismos más desafiantes en este contexto, dada su capacidad intrínseca para resistir la acción de diversos antibióticos (7). Uno de los aspectos más desafiantes de *Pseudomonas aeruginosa* es su capacidad para desarrollar y mantener mecanismos de resistencia contra varios antibióticos (5).

Entre los antibióticos a los que comúnmente muestra resistencia se incluyen las penicilinas y cefalosporinas de primera y segunda generación, limitando el uso de estos agentes beta-lactámicos tradicionales en el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* (8,9). Además, la resistencia a aminoglucósidos se desarrolla por modificaciones enzimáticas que inactivan estos antibióticos o por alteraciones en los sitios de unión (10). Las fluoroquinolonas también enfrentan resistencia debido a mutaciones en las topoisomerasas, que son los objetivos de estos medicamentos, o a la expresión de bombas de eflujo que reducen la concentración intracelular del antibiótico (11). Incluso los carbapenem, que son considerados entre los antibióticos más efectivos, no están exentos, ya que la bacteria puede producir carbapenemasas o modificar su permeabilidad (12). Los esfuerzos para combatir infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* requieren, por tanto, pruebas de sensibilidad específicas para cada aislamiento, con el fin de identificar el tratamiento antibiótico más efectivo y combatir la propagación de cepas multirresistentes (13).

La bacteria es capaz de formar biopelículas, estructuras complejas que le permiten adherirse a diversas superficies y protegerse de agentes antibacterianos (9). Entre estos mecanismos destaca la producción de beta-lactamasas, enzimas capaces de hidrolizar e inactivar una diversidad de antibióticos, como las penicilinas y cefalosporinas (14). Asimismo, la bacteria puede modificar el objetivo del antibiótico, tal como la alteración de las proteínas de unión a penicilinas, lo que disminuye la eficacia de estos fármacos. Otra estrategia de resistencia es la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, restringiendo de esta manera el acceso del antibiótico al interior bacteriano. Además, *Pseudomonas aeruginosa* manifiesta la expresión de bombas de eflujo, sistemas de transporte que eliminan activamente sustancias tóxicas, incluidos los antibióticos, de su interior, reduciendo la concentración intracelular del medicamento y, consecuentemente, su efectividad (15).

En el marco de la búsqueda de nuevos agentes con potencial antibacteriano, las antraquinonas, moléculas presentes en diversas plantas, han captado el interés científico. Estos compuestos han demostrado tener propiedades inhibitorias sobre distintas cepas bacterianas, sugiriendo su posible utilidad en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (16). Las antraquinonas son compuestos orgánicos derivados del antraceno, constituidos por tres anillos aromáticos fusionados y dos grupos cetona en posiciones adyacentes del anillo central constituyendo el esqueleto 9,10-dioxoantraceno (17).

Se encuentran naturalmente en algunas plantas y hongos y han sido utilizadas desde la antigüedad en diversas culturas por sus propiedades medicinales, especialmente como laxantes y agentes antimicrobianos (18). Su naturaleza aromática y las unidades cetona les confieren propiedades químicas particulares, como la capacidad de participar en reacciones redox (17). Las antraquinonas coloradas, también conocidas como antraquinonas tintóreas, son derivados de las antraquinonas que se han utilizado históricamente como colorantes debido a su capacidad para producir tonalidades vibrantes y duraderas (19).

Químicamente, la adición de grupos hidroxilo puede modificar significativamente las propiedades de la molécula original, aumentando su solubilidad y reactividad. Desde el punto de vista terapéutico, estas variantes hidroxiladas de antraquinonas han despertado interés debido a sus potenciales propiedades farmacológicas, incluyendo actividades antiinflamatorias, antivirales y anticancerígenas (20).

Las antraquinonas nitradas son derivados de las antraquinonas que incorporan uno o más grupos nitro (-NO₂) en su esqueleto básico de 9,10-dioxoantraceno. Desde un enfoque terapéutico, las antraquinonas nitradas han suscitado interés debido a su potencial actividad farmacológica, incluyendo propiedades antitumorales y antioxidantes. La adición del grupo nitro no solo puede incrementar la potencia de estas moléculas, sino también dirigir y diversificar su mecanismo de acción en contextos biológicos (21).

Las antraquinonas han sido evaluadas por su actividad antimicrobiana en diversas bacterias gram negativas, dadas sus propiedades potencialmente terapéuticas. Entre las

más estudiadas se encuentran: *Escherichia coli* (22), *Pseudomonas aeruginosa* (23), *Klebsiella pneumoniae* (22) y *Salmonella typhi* (24). De acuerdo con Peerzada et al., la capacidad de estas moléculas para combatir infecciones causadas por estos microorganismos se ha convertido en un tema relevante, especialmente en el contexto de la creciente resistencia antibacteriana observada en la medicina moderna, observándose que la emodina mostró la mayor inhibición contra *Pseudomonas aeruginosa* (23).

A pesar de la evidencia existente sobre la actividad antibacteriana de antraquinonas naturales, hay una brecha en el conocimiento sobre el impacto de derivados específicos de estas moléculas, en particular las antraquinonas nitradas, cloradas y algunos derivados hidroxilados, frente a *Pseudomonas aeruginosa* (25).

En términos de resistencia a antibióticos específicos, *Pseudomonas aeruginosa* ha demostrado resistencia a una variedad de clases de antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, quinolonas y carbapenémicos, entre otros. Esta resistencia multifármaco, combinada con la capacidad de la bacteria de colonizar y formar biopelículas en dispositivos médicos, la posiciona como una seria amenaza en el ámbito hospitalario (9).

Dado el crecimiento exponencial de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* y la necesidad urgente de nuevos agentes terapéuticos, esta investigación busca evaluar *in vitro* la acción antibacteriana de una serie de antraquinonas sintéticas sobre esta bacteria.

Con este propósito se evaluaron 10 antraquinonas sintéticas cloradas, nitradas e hidroxiladas sobre *Pseudomonas aeruginosa* mediante ensayos *in vitro*, utilizando una cepa específica de la bacteria la ATCC 27853, para determinar su sensibilidad. Se espera que los hallazgos no solo amplíen la comprensión de las interacciones entre estas moléculas y la bacteria, sino que también orienten futuras investigaciones y aplicaciones en el ámbito médico.

Metodología

Evaluación del efecto antibacteriano de antraquinonas sintéticas sobre Pseudomonas aeruginosa

La efectividad antibacteriana de cada antraquinona fue evaluada utilizando el método de dilución en microplacas. Se prepararon placas con agar Mueller Hinton, añadiendo 250 µg/ml de cada antraquinona, listadas en la tabla 1. Estas se disolvieron previamente en dimetilsulfóxido (DMSO) alcanzando una concentración final del 5% de este solvente. Posteriormente, se inoculó la bacteria en tres densidades distintas, aplicando gotas de 10 µL. Para esto, se utilizó una suspensión bacteriana ajustada a un estándar de 0,5 de McFarland, verificado mediante espectrofotometría a 600 nm (con una absorbancia de 0.08-0.1). Se realizaron dos series de diluciones, de 1:100 y 1:10.000; para la primera, se tomaron 5 µL de la suspensión bacteriana original y se diluyeron en 495 µL de solución salina, mientras que, para la segunda dilución, se tomaron 5 µL de la solución 1:100 y se diluyeron en 495 µL de solución salina, siendo esta última dilución utilizada para la

observación de los resultados. Adicionalmente, se preparó un control negativo con una placa de solo agar Mueller Hinton y otra con DMSO al 5% (siendo esta la concentración final del solvente en cada agar) sin antraquinonas. Las placas de Petri se incubaron a 37°C durante 24 horas, tras lo cual se contó el número de colonias formadas. Se consideró que hubo inhibición del crecimiento bacteriano cuando no se observó formación de colonias en la gota correspondiente a la dilución más alta.

TABLA 1. Antraquinonas usadas en el estudio

#	Antraquinona
1	Antraquinona
2	1,8-dihidroxiantraquinonas
3	1,2-dihidroxiantraquinonas
4	1,5-dihidroxiantraquinonas
5	1,5-dinitroantraquinona
6	1,8 dihidroxi-4,5dinitroantraquinona
7	1-cloroantraquinona
8	2-cloroantraquinona
9	1,8-dicloroantraquinona
10	1,5-dicloroantraquinona

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Para determinar la MIC, se inició preparando el agar Müller Hinton, incorporando específicamente la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona y la 1,2-dihidroxiantraquinona. Se comenzó con una concentración inicial de 250 µg/ml, de la cual se realizaron cuatro diluciones sucesivas para obtener concentraciones finales de 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 32,25 µg/ml y 16 µg/ml. La inoculación de *Pseudomonas aeruginosa* se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente para la evaluación de la actividad antibacteriana de las antraquinonas sintéticas. Se prepararon igualmente los controles negativos. Posteriormente, las placas se incubaron a 37°C por un período de 24 horas, después del cual se realizó el conteo de las colonias presentes.

Determinación de la sensibilidad de Pseudomonas aeruginosa a antibióticos tradicionales

Para el análisis de sensibilidad antibiótica, se prepararon los medios de cultivo utilizando agar Mueller Hinton. Posteriormente, se inoculó la bacteria extendiéndola uniformemente por la superficie del medio con un hisopo. Para esto se usaron colonias frescas que fueron suspendidas en solución salina estéril para alcanzar una densidad equivalente a 0,08–0,10 unidades de absorbancia (UA). Se aplicaron discos antimicrobianos conteniendo:

gentamicina (CN, 10 µg), piperacilina/tazobactam (TPZ, 100/10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), cefepime (FEP, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), imipenem (IPM, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg) y amikacina (AK, 30 µg), las cuales se presentan en la tabla 2. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al concluir este periodo, se midió el diámetro del halo de inhibición generado alrededor de cada disco antimicrobiano en milímetros utilizando una regla.

TABLA 2. Antibióticos empleados para determinar la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

#	Antibiótico	Cantidad	Código
1	Gentamicina	10 µg	CN 10
2	Piperacilina/tazobactam	100/10 µg	TPZ 110
3	Aztreonam	30 µg	ATM 30
4	Cefepime	30 µg	FEP 30
5	Ciprofloxacina	5 µg	CIP 5
6	Imipenem	10 µg	IPM 10
7	Meropenem	10 µg	MEM 10
8	Amikacina	30 µg	AK 30

Resultados

Evaluación del efecto antibacteriano de antraquinonas sintéticas sobre Pseudomonas aeruginosa

Se examinó la actividad antibacteriana de diez antraquinonas sintéticas en *Pseudomonas aeruginosa* y tras 24 horas de incubación se observó si existió o no crecimiento bacteriano. En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana de las diez antraquinonas.

#	Antraquinonas	Resultados
1	Antraquinona	–
2	1,8-dihidroxiantraquinonas	–
3	1,2-dihidroxiantraquinonas	+
4	1,5-dihidroxiantraquinonas	–
5	1,5-dinitroantraquinona	–
6	1,8 dihidroxi-4,5dinitroantraquinona	+
7	1-cloroantraquinona	–
8	2-cloroantraquinona	–
9	1,8-dicloroantraquinona	–
10	1,5-dicloroantraquinona	–

Tabla 3. Efecto de antraquinonas sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Los signos + y - indican si las antraquinonas inhibieron o no el crecimiento bacteriano, respectivamente.

De las antraquinonas examinadas, la 1,2-dihidroxiantraquinona, la 1,5-dinitroantraquinona y la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona demostraron una actividad inhibitoria significativa contra la bacteria al impedir su crecimiento en los respectivos agares como se muestra en la figura 1.

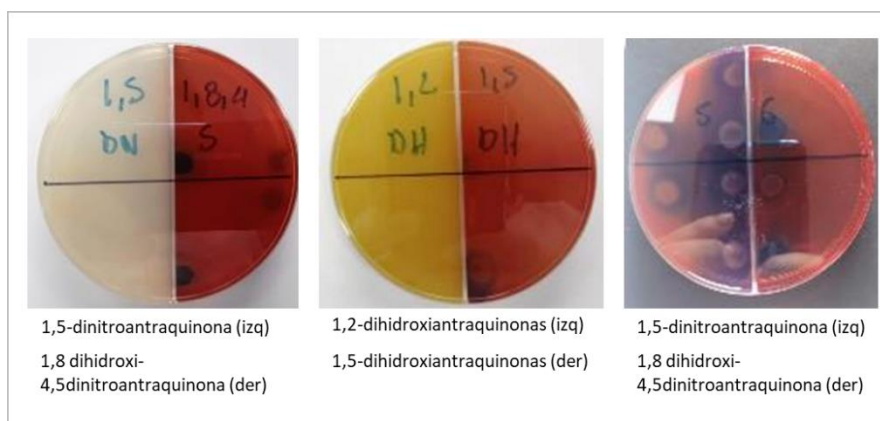


Figura 1. Fotografías representativas de los resultados del experimento para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano

La inhibición del crecimiento bacteriano observado sugiere que las antraquinonas 1,2-dihidroxiantraquinona y 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona poseen propiedades antibacterianas potenciales contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Las diluciones sucesivas de las antraquinonas 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona y 1,2-dihidroxiantraquinona mostraron que en las concentraciones más bajas a la que se usó previamente (250 µg/mL) no hubo una reducción del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, indicando que esta concentración corresponde a la CMI.

Determinación de la sensibilidad de Pseudomonas aeruginosa a antibióticos convencionales

Los ocho antibióticos probados arrojaron los siguientes diámetros de zona de inhibición: gentamicina (2,0 cm), piperacilina/tazobactam (2,8 cm), aztreonam (3,0 cm), cefepime (2,4 cm), ciprofloxacina (2,5 cm), imipenem (2,5 cm), meropenem (3,1 cm) y amikacina (2,5 cm), presentados en la tabla 3.

En las imágenes de los antibiogramas, se corroboraron los halos de inhibición alrededor de los discos, confirmando la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos ensayados.

TABLA 3. Resultados de la prueba de sensibilidad para cada antibiótico

#	Antibiótico	Código	Medida	Fecha
1	Gentamicina	CN 10	2,0 cm	18/1/2023
2	Piperacilina/tazobactam	TPZ 110	2,8 cm	25/1/2023
3	Aztreonam	ATM 30	3,0 cm	25/1/2023
4	Cefepime	FEP 30	2,4 cm	25/1/2023
5	Ciprofloxacina	CIP 5	2,5 cm	18/1/2023
6	Imipenem	IPM 10	2,5 cm	18/1/2023
7	Meropenem	MEM 10	3,1 cm	25/1/2024
8	Amikacina	AK 30	2,5 cm	25/1/2023

Discusión

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es un agente patógeno por su capacidad de resistencia a una amplia gama de antibióticos y su prevalencia en infecciones nosocomiales. En este contexto, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es imperativa. En el presente estudio, evaluamos la efectividad antibacteriana de diez antraquinonas sintéticas frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Después de un período de incubación de 16 horas, se identificó que, si bien la antraquinona sin grupos funcionales y sus derivados clorados y dinitro no mostraron una capacidad significativa para inhibir el crecimiento bacteriano, dos compuestos, específicamente la 1,2-dihidroxiantraquinona y la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona, evidenciaron un efecto inhibitorio. Este hallazgo es particularmente relevante ya que indica que la presencia de hidroxilos en las moléculas de antraquinona, pueden generar actividad antimicrobiana en estas moléculas.

Investigaciones previas han revelado que las antraquinonas poseen una significativa eficacia antimicrobiana, particularmente contra bacterias como *E. coli* y *S. aureus*, tal como se documenta en los trabajos de Malmir et al. (26) y Hamed et al (27). Además, Abu-darwish y Ateyyat (28) han identificado que la capacidad antimicrobiana específica de la 1,8-dihidroxiantraquinona podría estar asociada a su acción inhibitoria sobre enzimas esenciales para la supervivencia de los microorganismos. Interesantemente, en nuestros experimentos esta antraquinona no mostró efectos sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Este resultado confirma que la sola presencia de los grupos hidroxilos es insuficiente para generar efecto antibacteriano y éste depende de la posición, así como de la combinación con otros grupos como en el caso de la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona. Aunque los mecanismos subyacentes que contribuyen a la actividad antibacteriana entre las diferentes antraquinonas aún no están claros, se puede especular que las diferencias en la solubilidad y la capacidad para interactuar con componentes celulares son determinantes para explicar por qué algunas de estas moléculas no son activas.

Es importante destacar que se observó que las disoluciones de las antraquinonas efectivas (250 µg/mL) no mostraron crecimiento bacteriano, lo que podría indicar una mejor penetración en las células bacterianas o una interacción más efectiva con los blancos bacterianos. Por otro lado, los compuestos que no mostraron actividad podrían estar sufriendo una inactivación rápida o no alcanzar concentraciones intracelulares efectivas. Según Qin et al. (9), *Pseudomonas aeruginosa* ha desarrollado una estrategia de alteración en su permeabilidad celular que le permite eludir la acción de algunos agentes antimicrobianos. Es necesario puntualizar que a las concentraciones que fueron activas las 1,2-dihidroxiantraquinona y la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona la concentración de DMSO fue del 5%. Conspirando que es una concentración de DMSO, que, si bien no inhibió el crecimiento de la bacteria, si provocó algunos cambios morfológicos que sugieren ciertas condiciones de stress para la bacteria.

Adicionalmente, el análisis de la CMI de las antraquinonas 1,2-dihidroxiantraquinona y la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona reveló una limitación en su potencial terapéutico contra *Pseudomonas aeruginosa*. A pesar de la actividad antibacteriana de ciertas antraquinonas, el presente estudio indica que, incluso en concentraciones decrecientes, no se logró alcanzar un nivel de inhibición del crecimiento bacteriano que pudiera ser considerado clínicamente relevante para *Pseudomonas aeruginosa*. Este hallazgo sugiere que las concentraciones probadas de estas antraquinonas están por debajo del umbral necesario para ejercer un efecto bactericida o bacteriostático efectivo. De hecho, en la investigación de Durairandiyar et al. (29), se identificó una antraquinona, 6,61-bis (1,5,7-trihidroxi-3-hidroximetilantraquinona), producida por una cepa de *Streptomyces sp.* la cual presentó potente actividad antibacteriana. Este compuesto demostró efectos contra diversos microorganismos, inhibiendo eficazmente tanto bacterias como hongos en concentraciones de 3.90 a 62.5 µg/ml, destacando su potencial para aplicaciones antimicrobianas.

La ausencia de una disminución significativa en el crecimiento bacteriano incluso en las diluciones más bajas puede implicar que las antraquinonas examinadas no poseen la potencia necesaria para actuar como agentes antibacterianos independientes contra esta bacteria. Esto podría deberse a una variedad de factores, como la estabilidad química de las antraquinonas en el medio de cultivo, su capacidad para penetrar la membrana celular de *Pseudomonas aeruginosa*, o la presencia de mecanismos de resistencia innatos en la bacteria que impiden la acción de estos compuestos. Además, la propia presencia de DMSO al 5% en nuestros experimentos podría ser una explicación para el efecto presentando por las dos antraquinonas antes señaladas ya que podría alterar la permeabilidad de la pared o membrana celular.

El estudio de Rao et al. (30) revela que las antraquinonas de *Rheum emodi* tienen efectos inhibidores significativos en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, con bajísimas concentraciones mínimas inhibitorias. Estos hallazgos complementan nuestros resultados, demostrando la eficacia antimicrobiana de las antraquinonas, especialmente en su capacidad para interferir con las bombas de expulsión de *Pseudomonas aeruginosa*.

La evidencia sugiere que las antraquinonas podrían ser valiosas para desarrollar tratamientos contra bacterias resistentes, destacando su potencial en la inhibición de mecanismos de resistencia bacteriana.

Es importante considerar que la determinación de la MIC es solo un paso inicial en el proceso de evaluación de la eficacia de un nuevo antibiótico. Los resultados obtenidos subrayan la necesidad de continuar con estudios más detallados que incluyan un rango más amplio de concentraciones, así como modificaciones estructurales de las antraquinonas, para mejorar su actividad antimicrobiana. Además, sería beneficioso examinar la sinergia de las antraquinonas con otros antibióticos establecidos para evaluar su potencial como parte de una terapia combinada, lo cual podría ser una estrategia viable para superar la resistencia bacteriana y aumentar la eficacia antibacteriana.

En el presente estudio, la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a una gama de antibióticos convencionales fue confirmada a través de la medición de los halos de inhibición en pruebas de antibiograma. Los resultados mostraron que la bacteria es susceptible a todos los agentes probados, con zonas de inhibición que varían entre 2,0 y 3,1 cm lo que indica que las antraquinonas que mostraron efectividad lo hicieron sobre una bacteria con este perfil de sensibilidad. Sin embargo, en el futuro será necesario realizar nuevos experimentos usando bacterias con resistencia a antibióticos con la finalidad de profundizar en la comprensión de sus capacidades antibacterianas.

A pesar de que las otras antraquinonas como las cloradas fueron inactivas contra esta bacteria, es también un resultado interesante ya que hasta donde conocemos no existen antecedentes de que estas antraquinonas han sido evaluadas sobre esta bacteria. Esta información será útil para futuras investigaciones y estudios de la relación estructura actividad de antraquinonas sobre estas bacterias.

Conclusiones

Este estudio proporciona evidencia adicional sobre el potencial de las antraquinonas sintéticas como agentes antibacterianos contra *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno clínicamente relevante. Específicamente, se demostró que la 1,2-dihidroxi-antraquinona y la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona poseen capacidades inhibitorias sobre esta bacteria. Sin embargo, la concentración de DMSO que se usó es un aspecto que debe ser explorado en próximas investigaciones para determinar su influencia en el efecto observado de las dos antraquinonas. Aunque las concentraciones probadas no permitieron determinar la CMI, los resultados subrayan la importancia de futuras investigaciones para optimizar su potencia y potencial empleo en nuevas investigaciones *in vivo*. Este estudio contribuye a la ciencia no solo identificando compuestos con actividad antimicrobiana potencial sino también instando a la exploración de modificaciones estructurales en antraquinonas que podrían mejorar su eficacia y superar los desafíos presentados por la resistencia antibiótica. Además, ofrece información sobre la inactividad de otras antraquinonas de las que no se tenía evidencia experimental sobre esta bacteria.

Referencias bibliográficas

1. Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: structure, function and bacterial identification. OCL [Internet]. 2020 [citado 24 de octubre de 2023];27(31):1-10. Disponible en: <https://www.ocl-journal.org/10.1051/oc/2020025>
2. De Sousa T, Hébraud M, Alves O, Costa E, Maltez L, Pereira JE, et al. Study of Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Motility of *Pseudomonas aeruginosa* Derived from Urine Samples. Microorganisms [Internet]. 2023;11(5):1345. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1345>
3. Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. Drugs [Internet]. 2021;81(18):2117-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>
4. Miranda Ayala MA, Lucas Parrales EN. Prevalencia de *Pseudomonas Aeruginosa* productora de Carbapenemasa en pacientes de cuidados intensivos en hospitales de Latinoamérica. Pentaciencias [Internet]. 2023;5(3):343-57. Disponible en: <https://doi.org/10.59169/pentaciencias.v5i3.546>
5. Sambrano H, Castillo JC, Ramos CW, De Mayorga B, Chen O, Durán O, et al. Prevalence of antibiotic resistance and virulent factors in nosocomial clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Panamá. The Brazilian Journal of Infectious Diseases [Internet]. 2021;25(101038):1-8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413867020301653>
6. Restrepo-González JA, Medina Polo J, Abad López P, González Padilla D, García Rojo E, Santos Pérez de la Blanca R, et al. El reto de las infecciones por *pseudomonas aeruginosa* en un Servicio de Urología: epidemiología, factores de riesgo y patrones de resistencia a antibióticos. Archivos españoles de urología [Internet]. 2020;73(4):299-306. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7415879>
7. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv [Internet]. 2019;37(1):177-92. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
8. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. Genes Dis [Internet]. 2019;6(2):109-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
9. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Sig Transduct Target Ther [Internet]. 2022;7(1):1-27. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01056-1>
10. Usman Y, Hafiz TR, Aliyu IA, Sharif AA, Umar K, Idris AN, et al. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa*: An Overview. Bayero

Journal of Medical Laboratory Science [Internet]. 2023;8(1):93-103. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/bjmls/article/view/253331/239363>

11. Roy S, Chowdhury G, Mukhopadhyay AK, Dutta S, Basu S. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infection. *Front Med* [Internet]. 2022;9(793615):1-32. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.793615>
12. Saxena D, Maitra R, Bormon R, Czekanska M, Meiers J, Titz A, et al. Tackling the outer membrane: facilitating compound entry into gram-negative bacterial pathogens. *npj Antimicrob Resist* [Internet]. 2023;1(17):1-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00016-1>
13. Golden MM, Post SJ, Rivera R, Wuest WM. Investigating the Role of Metabolism for Antibiotic Combination Therapies in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infect Dis* [Internet]. 2023;9(12):2386-93. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00452>
14. Glen KA, Lamont IL. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens* [Internet]. 2021;10(12:1638):1-32. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/12/1638>
15. Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *IJMS* [Internet]. 13 de diciembre de 2022 [citado 24 de octubre de 2023];23(24):15779. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/24/15779>
16. Cui Y, Chen LJ, Huang T, Ying JQ, Li J. The pharmacology, toxicology and therapeutic potential of anthraquinone derivative emodin. *Chinese Journal of Natural Medicines* [Internet]. 2020;18(6):425-35. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32503734/>
17. Baviera GS, Donate PM. Recent advances in the syntheses of anthracene derivatives. *Beilstein J Org Chem* [Internet]. 2021;17:2028-50. Disponible en: <https://doi.org/10.3762/bjoc.17.131>
18. Diaz G, Miranda I, De Rezende DC. Anthraquinones: An Overview. *Studies in Natural Products Chemistry* [Internet]. 2018;58:313-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00011-8>
19. Li Y, Jiang JG. Health functions and structure–activity relationships of natural anthraquinones from plants. *Food Funct* [Internet]. 2018;9(12):6063-80. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C8FO01569D>
20. Gallmetzer J, Kröll S, Werner D, Wielend D, Irimia-Vladu M, Portenkirchner E, et al. Anthraquinone and its derivatives as sustainable materials for electrochemical applications – a joint experimental and theoretical investigation of the redox potential in solution. *Physical Chemistry Chemical Physics* [Internet]. 2022;24(26):16207-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/D2CP01717B>
21. Li Y, Guo F, Guan Y, Chen T, Ma K, Zhang L, et al. Novel Anthraquinone Compounds Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation via the Reactive Oxygen

Species/JNK Pathway. *Molecules* [Internet]. 2020;25(7:1672):1-18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7180728/>

22. Hammerle F, Fiala J, Höck A, Huymann L, Vrabl P, Husiev Y, et al. Fungal Anthraquinone Photoantimicrobials Challenge the Dogma of Cationic Photosensitizers. *J Nat Prod* [Internet]. 2023;86(10):2247-57. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c01157>
23. Peerzada Z, Kanhed AM, Desai KB. Effects of active compounds from *Cassia fistula* on quorum sensing mediated virulence and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *RSC Adv* [Internet]. 2022;12(24):15196-214. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/d1ra08351a>
24. Stanislaus OO, Etsuyankpa MB, Tanko OO. Antibacterial Activities of selected Medicinal Plants Against *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *B* and *C*, Clinical Isolates in North Central, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* [Internet]. 2022;21(11):528-38. Disponible en: <https://doi.org/10.5897/AJB2021.17363>
25. Safiarian MS, Ugboya A, Khan I, Marichev KO, Grant KB. New Insights into the Phototoxicity of Anthracene-Based Chromophores: The Chloride Salt Effect. *Chemical Research in Toxicology* [Internet]. 2023;36(7):1002-20. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00235>
26. Malmir M, Serrano R, Silva O. Anthraquinones as potential antimicrobial agents - A review. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs* [Internet]. 2017;55-61. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/319620317_Anthraquinones_as_potential_antimicrobial_agents-A_review
27. Hamed MM, Refahy LA, Abdel-aziz MS. Evaluation of Antimicrobial Activity of Some Compounds Isolated from *Rhamnus cathartica*. *Oriental Journal of Chemistry* [Internet]. 2015;31:1133-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/310266>
28. Abu-Darwish SM, Ateyyat AM. The Pharmacological and Pesticidal Actions of Naturally Occurring 1, 8- dihydroxyanthraquinones Derivatives. *World Journal of Agricultural Sciences* [Internet]. 2008;4:495-505. Disponible en: [http://idosi.org/wjas/wjas4\(4\)/16.pdf](http://idosi.org/wjas/wjas4(4)/16.pdf)
29. Duraipandiyan V, Al-Dhabi NA, Ignacimuthu S. New antimicrobial anthraquinone 6,61-bis (1,5,7-trihydroxy-3-hydroxymethylanthraquinone) isolated from *Streptomyces* sp. isolate ERI-26. *Saudi J Biol Sci* [Internet]. 2016;23(6):731-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.008>
30. Rao S, Kumar S, Kumar R, Kumar N, Bhargava P, Kumari S, et al. In-vitro Antioxidant and Anti-microbial Properties of Anthraquinones from Rhizomes of *Rheum emodi* against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Int J Pharm Sci Rev Res* [Internet]. 2023;81(1):26-32. Disponible en: <https://globalresearchonline.net/ijpsrr/v81-1/06.pdf>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no haber conflicto de competencia.

Declaración de contribución de los autores

El artículo deberá acompañarse de una nota, que exprese la contribución de cada autor al estudio realizado.



El artículo que se publica es de exclusiva responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan el pensamiento de la **Revista Anatomía Digital**.



El artículo queda en propiedad de la revista y, por tanto, su publicación parcial y/o total en otro medio tiene que ser autorizado por el director de la **Revista Anatomía Digital**.



Indexaciones

