

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL  
DE LAS AMÉRICAS**

**FARMACIA**

**CLASIFICACIÓN POR POTENCIA DE LAS  
PROPIEDADES BACTERICIDAS DE SEIS PLANTAS  
DE USO COMÚN EN LA COCINA COSTARRICENSE  
PARA SU UTILIZACIÓN COMO POSIBLE  
TRATAMIENTO DE APOYO DE ANTIBIÓTICOS EN  
INFECCIONES CAUSADAS POR *ESCHERICHIA  
COLI*.**

**KATIA VANESSA ALVARADO HERNÁNDEZ**

**SAN JOSÉ, DICIEMBRE, 2019**

## Contenido

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	14
Planteamiento del problema .....	14
Objetivos.....	18
Objetivo general .....	18
Objetivos específicos.....	18
Justificación .....	19
Antecedentes.....	23
Antecedentes históricos .....	23
Antecedentes Internacionales .....	24
Antecedentes nacionales.....	27
Proyecciones.....	29
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	30
Antibioticoterapia .....	30
Perspectiva histórica.....	30
Desarrollo de Antibioticoterapia .....	32
Métodos para el descubrimiento de antibióticos .....	33
Enfoques culturales.....	33
Beneficios de los antibióticos .....	36
Tratamientos actuales .....	37
Mejora de los antimicrobianos .....	37
Síntesis de nuevas moléculas y mejora de compuestos ya conocidos .....	38
Minería de genomas.....	39
Nuevos antimicrobianos .....	40
Resistencia .....	41

Carga clínica y económica de la resistencia a los antibióticos .....	41
Motivos de resistencia .....	42
Mal uso de tratamientos.....	44
Uso excesivo.....	45
Prescripción inapropiada .....	48
Residuos en alimentos .....	49
Uso de antimicrobianos en agricultura, ganadería y acuicultura.....	50
Modos de propagación a los humanos de animales de granja y alimentos .....	55
Riesgos para la salud humana.....	56
Depósitos acuíferos.....	58
Antibióticos en el agua y el riesgo de bacterias resistentes a los medicamentos .	60
Infecciones bacterianas.....	61
Bacterias multirresistentes .....	65
Staphylococcus aureus resistente a meticilina.....	66
Enterococos resistentes a la vancomicina.....	67
Streptococcus pneumoniae resistente a los medicamentos.....	68
Tuberculosis por Mycobacterium resistente a los medicamentos .....	68
Enterobacteriaceae resistente a carbapenem.....	69
Pseudomonas Aeruginosa multirresistente.....	70
Acinetobacter multirresistente .....	70
Enterobacteriaceae productoras de betalactamasas de amplio espectro .....	71
Neisseria gonorrhoeae resistente a los medicamentos.....	71
Escherichia coli.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
Patogenia de E. coli .....	73
E. coli enteropatógena (EPEC).....	75

E. coli enterohemorrágica (EHEC).....	79
E. coli enterotoxigénica (ETEC) .....	81
E. coli enteroagregativa (EAEC) .....	84
E. coli enteroinvasiva (EIEC).....	87
E. coli difusamente adherente (DAEC) .....	89
E. coli uropatógena (UPEC).....	90
E. coli asociada a meningitis / sepsis (MNEC) .....	93
Otros posibles patotipos de E. coli .....	95
Tratamientos alternativos .....	96
Opciones actuales en el mercado.....	100
Plantas medicinales.....	101
Componentes de plantas medicinales.....	101
Alcaloides (incluyendo aminas) .....	101
Alcaloides de Amaryllidaceae .....	102
Colchicina.....	103
Alcaloides de diterpeno .....	103
Alcaloides de isoquinolina (incluidos los alcaloides de protoberberina, aporfina y morfina) .....	104
Alcaloides de piperidina .....	104
Alcaloides esteroideos .....	105
Terpenos .....	105
Monoterpenos .....	107
Glucósidos Iridoides.....	107
Sesquiterpenos y Lactonas Sesquiterpénicas.....	108
Saponinas.....	108

Tetraterpenos .....	109
Fenoles.....	110
Cumarinas y Furanocumarinas .....	110
Lignanos y Lignina.....	111
Flavonoides y Antocianinas.....	111
Catequinas y Taninos.....	112
Quinonas.....	113
Quinonas y Naftoquinonas .....	113
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	114
Enfoque.....	114
Diseño de Investigación.....	114
Cuadro de operacionalización de variables .....	115
Procedimientos .....	117
Recolección de las muestras .....	120
Obtención de los extractos.....	121
Identificación de los metabolitos secundarios .....	124
Preparación de Escherichia coli (cepa AOAC-113).....	126
Medición de la actividad bactericida de las plantas solas .....	127
Medición de la actividad bactericida de las plantas en combinación con amoxicilina 125mg/5mL polvo para suspensión previamente preparada .....	128
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	129
Obtención de los extractos de cada planta.....	130
Pruebas fitoquímicas de identificación para las diferentes plantas .....	139
Tacaco.....	142
Orégano .....	143

Estragón .....	144
Canela .....	145
Jengibre.....	146
Culantro .....	147
Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano de la cepa AOAC-113 de Escherichia coli para cada extracto obtenido individualmente. ....	148
<i>Sechium tacaco</i> : Tacaco .....	151
<i>Origanum vulgare</i> : Orégano .....	151
<i>Artemisia dracunculus</i> : Estragón .....	153
<i>Cinnamomum verum</i> : Canela .....	154
<i>Zingiber officinale</i> : Jengibre .....	155
<i>Coriandrum sativum</i> : Culantro .....	156
Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano de la cepa AOAC-113 de Escherichia coli para cada extracto obtenido en combinación con 10µL de amoxicilina. ....	157
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	162
Conclusiones.....	162
Recomendaciones .....	164
Universidad Internacional de las Américas .....	164
Estudiantes de farmacia .....	164
Farmacéuticos.....	165
Colegio de farmacéuticos .....	165
Médicos .....	165
Población en general.....	165
Área investigativa .....	166
REFERENCIAS .....	167

## Tablas

Tabla 1.	Cantidad de material vegetal pesado y cantidad final de aceite esencial obtenido	138
Tabla 2.	Estudio fitoquímico de los extractos obtenidos.....	141
Tabla 3.	Control negativo y positivo para las pruebas de actividad bactericida ..	148
Tabla 4.	Mediciones de halo de inhibición de las plantas solas analizadas .....	150
Tabla 5.	Mediciones de halo de inhibición de los extractos + antibiótico .....	158

## Figuras

Figura 1	Evolución en la producción de antibióticos a nivel mundial en diversas décadas 33
Figura 2	Enfoques de cultivo sólido que destacan la inhibición entre dos especies bacterianas ..... 34
Figura 3	Enfoques de cultivo líquido destacan la inhibición entre dos especies bacterianas 36
Figura 4	Prescripción de antibióticos por cada 1000 personas de todas las edades según el estado en el 2010 ..... 47
Figura 5	Línea temporal del desarrollo de la resistencia a los antibióticos ..... 62
Figura 6	Esquema patogénico de la diarrea causada por E. coli ..... 74
Figura 7	Comparación de antibióticos aprobados por la FDA con los antibióticos descubiertos en diferentes momentos en el tiempo ..... 98
Figura 8	Número de aprobaciones de solicitudes de nuevos medicamentos antibacterianos versus intervalos de un año ..... 99
Figura 9	Interacción de metabolitos secundarios con biomembranas ..... 106
Figura 10	Dispositivo de desecación ..... 117
Figura 11	Equipo de extracción soxhlet ..... 118
Figura 12	Rotavapor 119
Figura 13	Discos y frascos estériles ..... 120
Figura 14	Colocación de la cepa de E. coli en una placa de agar nutritivo ..... 126
Figura 15	Material vegetal utilizado ..... 129
Figura 16	Dispositivo de desecación ..... 131
Figura 17	Extracción de las muestras de tacaco y culantro en soxhlet ..... 132
Figura 18	Extracción de la muestra de canela en soxhlet ..... 133
Figura 19	Extracción de la muestra de jengibre en soxhlet ..... 134

Figura 20	Extracción de la muestra de orégano en soxhlet.....	135
Figura 21	Extracción de la muestra de estragón en soxhlet.....	136
Figura 22	Muestras extraídas con soxhlet en un baño de agua tibia.....	137
Figura 23	Prueba de saponinas para el extracto de tacaco.....	139
Figura 24	Pruebas fitoquímicas de los aceites esenciales.....	140
Figura 25	Componentes principales del orégano.....	143
Figura 26	Estructura química del estragol.....	144
Figura 27	Estructura química de los componentes principales de la canela.....	145
Figura 28	Estructura química de los componentes principales del jengibre.....	146
Figura 29	Estructura química de los componentes principales del culantro.....	147
Figura 30	Resultados de inhibición de Amoxicilina en solución y el blanco.....	148
Figura 31	Resultados de inhibición de los extractos en presencia de E. coli.....	149
Figura 32	Orden descendiente de los diámetros de inhibición de cada extracto solo individualmente.....	150
Figura 33	Resultados de inhibición de los extractos en conjunto con el antibiótico en presencia de E. coli.....	157
Figura 34	Orden descendiente de los diámetros de inhibición de cada extracto solo individualmente.....	158
Figura 35	Orden descendiente de los diámetros de inhibición de cada extracto solo individualmente.....	159
Figura 36	Mecanismos de actividad antibacteriana sinérgica.....	160

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecerle a mi mamá Jenny María Hernández Chavarría y a mi papá Guillermo Enrique Alvarado Arias por brindarme siempre su apoyo incondicional, por enseñarme que, con esfuerzo, todo se puede lograr, ellos son la inspiración de mi vida y modelo por seguir. Gracias a su amor, consejos y formación, soy una persona que lucha por mejorar cada día.*

*Gracias a mi hermana Karla y a mi difunto hermano Édgar por ser ejemplos a seguir y ser mi familia, me han enseñado que la vida puede ser difícil, pero sin importar lo que pase, hay que seguir adelante. También quiero agradecer a mi tía Xenia Hernández, que siempre ha creído en mí, se enorgullece de ser mi tía y me presume con sus amigas.*

*A mi novio, Martin Dieguez, por siempre darme ánimos y confiar en mí, aumentar mis fuerzas y ayudarme siempre que lo necesito, incluso en situaciones difíciles me motiva para seguir adelante y saca lo mejor de mí. En todo momento ha sido un apoyo incondicional y motivo de inmensa felicidad en mi vida.*

*Además, a los amigos que me dejó farmacia: Elena Ku, Pamela Meneses, Andrea Guerra, Eduardo Huertas, Kristel Gómez, Mildred Camacho, Alejandro Arias, Luis Hernández, Endrina Segura, Silvia Hernández y María del Pilar Fernández, por todos los momentos juntos, trabajos en grupo, estrés, y diversión. Quiero agradecer especialmente a Omar Solórzano por toda su ayuda e interés continuo y por una amistad tan bonita y duradera.*

*Al equipo de asistentes de laboratorio, Davis Piedra, Yendri Salas y Raxel López, ellos siempre estuvieron disponibles, listos para ayudar, dar recomendaciones y pasar momentos amenos durante la longitud de mi carrera universitaria.*

*También quiero agradecerle a la Dra. Eva Diana Quirós por mostrar tanto interés y esfuerzo en mejorar la carrera de farmacia en esta universidad y preocuparse de maneras en las que ningún director anterior lo hizo. Al profesor Adam Amey por todo su entusiasmo desde el momento en que le expuse mis ideas de investigación. Le agradezco mucho al profesor Armando Calvo por toda su ayuda en la etapa experimental, todos sus consejos e ideas y los momentos de diversión en el laboratorio.*

*Por último, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Melisa Marisol Martínez Domínguez por ayudarme a realizar la investigación, por la paciencia y sabiduría, los consejos dados y por ser parte de mi formación profesional, sin su ayuda, esto no hubiese sido posible.*

## **Dedicatoria**

*Dedico este trabajo de investigación con todo mi amor y respeto a mi mamá Jenny María Hernández Chavarría y a mi papá Guillermo Enrique Alvarado Arias, ellos me forjaron cómo la persona que soy actualmente, todos mis logros se los debo ellos. No sólo son el cimiento para la construcción de mi vida profesional, son las bases de mis deseos de superación, en ellos tengo un espejo en el cual quiero reflejarme, pues sus virtudes y gran corazón me llevan a admirarlos cada día más. Sin ellos no hubiera tenido este éxito, dieron todo su esfuerzo para obtener mi título profesional y convertirme en quien soy hoy en día.*

## Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la potencia de las propiedades bactericidas de las plantas de uso culinario en la cocina costarricense como posible tratamiento para las infecciones causadas por *Escherichia coli* para proveer una alternativa que disminuya el problema de la resistencia bacteriana asociada al tratamiento antibiótico actual.

Las plantas seleccionadas para este estudio fueron *Sechium tacaco* (Tacaco), *Cinnamomum verum* (Canela), *Coriandrum sativum* (Culantro), *Zingiber officinale* (Jengibre), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Artemisia dracuncululus* (Estragón). De cinco de ellas se conoce su actividad bactericida con excepción del tacaco.

Se analizó la actividad bactericida de cada planta se realizaron extractos etanólicos utilizando un equipo soxhlet y concentrándolos por medio del uso de un rotavapor, los extractos se mantuvieron lo más estériles posibles utilizando filtros de disco estériles de 0.22  $\mu\text{m}$ . La actividad bactericida se midió con el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano frente a una cepa de *Escherichia coli* (AOAC-113).

Gracias a los resultados obtenidos se concluyó que la canela mostró la mayor capacidad antimicrobiana en presencia de *Escherichia coli* con un diámetro de halo de inhibición de 13.2mm, mientras que el extracto de tacaco no demostró actividad bactericida para *E. coli*. Éste extracto no logró ninguna inhibición bacteriana.

Según el diámetro de inhibición bacteriana observado, el orden descendente de potencia bactericida de los extractos es: canela, jengibre, estragón, orégano/culantro (mismo diámetro) y tacaco (que no presentó ninguna actividad)

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

El creciente número de patógenos bacterianos que son resistentes a numerosos antibióticos es motivo de preocupación en todo el mundo. No se han desarrollado nuevos antibióticos de amplio espectro en los últimos 40 años, y los medicamentos que actualmente se tiene, se están volviendo rápidamente ineficaces, a estos nuevos patógenos se les denomina súper bacterias, y se requieren nuevos tratamientos para innovar en el campo clínico. (Gill, Franco, & Hancock, 2014)

En los últimos años, una creciente preocupación ha sido abrumadora para los científicos con respecto a la prevalencia de los genes de resistencia a los antibióticos (ARG, por sus siglas en inglés) y las bacterias resistentes a los antibióticos (ARB, por sus siglas en inglés) que han aparecido como resultado de la prescripción / producción de antibióticos en exceso. En 2013, las infecciones resistentes a los antibióticos fueron responsables de al menos 2 000 000 casos de enfermedad y aproximadamente 23 000 muertes solo en los Estados Unidos. (Bird, Boopathy, Nathaniel, & LaFleur, 2019)

A pesar de los prolongados beneficios del uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas, su persistencia no deseada en las aguas residuales ha intensificado la resistencia a los antibióticos en las comunidades microbianas naturales. Aproximadamente 23000 muertes en los Estados Unidos y 25 000 en Europa se han atribuido a bacterias resistentes a los antibióticos (ARB, por sus siglas en inglés), junto con aproximadamente \$ 1 mil millones y \$ 1,5 mil millones en costos anuales de atención médica, respectivamente. (Zarei-Baygi, Harb, Wang, Stadler, & Smith, 2019)

Los informes han relacionado la carga de antibióticos de los hospitales y las granjas con el aumento de la resistencia dentro de las aguas superficiales, el suelo y las aguas subterráneas. La reutilización (una práctica común dada la persistente escasez de agua) eleva

esas amenazas entre las aguas residuales y la posible exposición humana. (Zarei-Baygi, Harb, Wang, Stadler, & Smith, 2019)

Estas circunstancias han creado un sentido de urgencia en todo el mundo, con la resistencia a los antibióticos citada como uno de los riesgos más críticos para la salud humana. Además, las bacterias sensibles (no resistentes) pueden adquirir mecanismos de resistencia de ARB a través del intercambio horizontal de elementos genéticos móviles que contienen genes de resistencia a los antibióticos (ARB, por ejemplo, plásmidos, integrones y transposones). (Zarei-Baygi, Harb, Wang, Stadler, & Smith, 2019)

Las malas prácticas de control de infecciones, el uso negligente de antibióticos y el rechazo constante de las advertencias contra el uso excesivo de antibióticos a menudo resultan en una condición en la que el cuerpo se vuelve más vulnerable a las enfermedades y luego el tratamiento se vuelve difícil a medida que los patógenos desarrollan inmunidad contra los antibióticos que se administran con más frecuencia de lo requerido.

Si bien es cierto que el uso de antibióticos requiere mayores y mejores controles, no es lo único que se debe hacer, la importancia de buscar alternativas viables para tratamientos es de suma importancia, por lo cual, ha habido un gran auge en nuevas tecnologías, pero no puede descartarse el conocimiento de los tratamientos ancestrales. Se debe volver a evaluar la importancia del uso de plantas medicinales, las cuales potencialmente podrían ser alternativas muy importantes en la lucha contra las superbacterias.

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) han clasificado una cantidad de bacterias que han desarrollado resistencia a múltiples fármacos (antibióticos), como resultado de lo cual un individuo está expuesto a un mayor riesgo de infección y la falta de opciones de tratamiento dificulta el proceso de recuperación. Estas bacterias resistentes a los antibióticos pueden propagarse a los seres humanos o animales. (Rather, Kim, Bajpai, & Park, 2017)

Algunos patógenos resistentes a los antibióticos comunes son: Ciertas cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* hiperproductor de toxina, coliformes productores de betalactamasa de espectro extendido y carbapenemasas. Dichos patógenos resistentes a los antibióticos son homogéneos, tienen mayor virulencia y pueden propagarse incluso dentro de los confines de un hospital o de la comunidad y pueden ser una grave amenaza para la salud. (Rather, Kim, Bajpai, & Park, 2017)

Hay una necesidad urgente de descubrir nuevos antibióticos o tratamientos coadyuvantes para combatir los patógenos resistentes a los medicamentos y reducir la mortalidad asociada con la resistencia a los medicamentos. Esta necesidad se puede satisfacer mediante trabajos de investigación y mediante la difusión de una mayor conciencia entre la población general sobre la automedicación y los efectos secundarios del uso excesivo de antibióticos.

A medida que más antibióticos se vuelven ineficaces por las bacterias resistentes a los medicamentos, se debe cambiar el enfoque hacia terapias alternativas para el tratamiento de infecciones. Aunque ya existen varias alternativas en la naturaleza, el desafío es implementarlas en el uso clínico. Los avances dentro de la biotecnología, la ingeniería genética y la química sintética han abierto nuevos caminos hacia la búsqueda de terapias que puedan sustituir a los antibióticos, entre esas, la utilización de plantas de uso común. (Ghosh, Sarkar, Issa, & Haldar, 2019)

Hay una serie de preocupaciones de los consumidores con respecto al uso de antibióticos en animales de alimentación, incluida la contaminación por residuos de productos avícolas y patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos. Estos problemas han dado lugar a recomendaciones para reducir el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en el ganado en los Estados Unidos. (Diaz-Sanchez, D'Souza, Biswas, & Hanning, 2015)

Por lo tanto, tanto la producción avícola convencional como la orgánica necesitan métodos alternativos para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las aves. Las hierbas, las especias y otros extractos de plantas se están evaluando como alternativas a los antibióticos y algunos tienen efectos estimuladores del crecimiento, propiedades antimicrobianas y otros beneficios relacionados con la salud. (Diaz-Sanchez, D'Souza, Biswas, & Hanning, 2015)

La importancia de tratamientos alternativos o coadyuvantes se vuelve sumamente valioso, ya que éste tema no es sólo de interés nacional, sino, mundial, en especial el uso de fuentes naturales, cada día se encuentran nuevas especies de patógenos resistentes a los antibióticos actuales, por lo cual se plantea la siguiente pregunta: ¿Cuál de las seis plantas seleccionadas de uso común en la cocina costarricense tiene mayor efecto bactericida?

Tomando en cuenta la pregunta formulada, se postula una hipótesis, “Todas las plantas elegidas poseen actividad bactericida.”

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la potencia de las propiedades bactericidas de las plantas de uso culinario en la cocina costarricense como posible tratamiento para las infecciones causadas por *E. coli* para proveer una alternativa que disminuya el problema de la resistencia bacteriana asociada al tratamiento antibiótico actual.

### **Objetivos específicos**

Clasificar por orden descendente las plantas seleccionadas para determinar su potencia y capacidad bactericida contra *Escherichia coli*.

Identificar los posibles grupos principales de componentes activos (metabolitos secundarios) de las plantas que presentan actividad bactericida.

Comparar la eficacia bactericida de la planta más potente contra la amoxicilina solución oral con el fin de demostrar tratamientos alternativos o sinergia contra la bacteria *Escherichia coli*.

## **Justificación**

La creciente incidencia de infecciones adquiridas y los problemas emergentes que plantean las cepas microbianas resistentes a los antibióticos han contribuido al aumento del costo de los tratamientos. La presencia de infección puede potencialmente detener el proceso de curación. Los regímenes tradicionales de tratamiento, ya no pueden hacer frente a las complicaciones planteadas por cepas resistentes a los antibióticos; por lo tanto, existe la necesidad de explorar el uso de agentes antimicrobianos alternativos. (Low, Kenward, Britland, Amin, & Martin , 2016)

Los compuestos pre-antibióticos, incluidos los aceites esenciales, han sido investigados nuevamente para su posible uso como agentes antimicrobianos efectivos. Los extractos tienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, antioxidantes y otros usos terapéuticos beneficiosos. Éstos antimicrobianos alternativos interactúan con muchos componentes intracelulares diferentes, lo que resulta en la interrupción de las funciones celulares vitales y, finalmente, en la muerte celular. (Low, Kenward, Britland, Amin, & Martin , 2016)

Hoy en día se están investigando varias plantas para incorporarlos en el alimento de animales para consumo humano, como sustitutos de los promotores de crecimiento antimicrobianos, especialmente porque estos últimos han demostrado una capacidad significativa para inducir resistencia en las bacterias, así como la persistencia y contaminación del medio ambiente. Algunos de estos aceites, debido a su disponibilidad, rendimiento y distribución, han encontrado un uso generalizado en la nutrición animal; tal es el caso del orégano. (Granados-Chinchilla, 2017)

Se conoce que existen muchas plantas con propiedades bactericidas, pero ha habido pocos estudios que clasifiquen cuáles presentan mayor actividad, con éste estudio se pretende proveer información acerca del potencial presentado por cada muestra, para así poder tenerlos en cuenta en futuras formulaciones terapéuticas, lo que sería de gran importancia para el

pueblo costarricense, ya que es un país de gran biodiversidad, por lo tanto, debe ser aprovechada.

Los antibióticos son vitales en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas, pero cuando se liberan en el medio ambiente pueden afectar a organismos no objetivo que realizan servicios vitales de los ecosistemas y mejoran el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos con consecuencias significativas para la salud humana. Se quiere que la orientación regulatoria actual se preocupe por evaluar los riesgos ambientales. (Page, Gunnarsson, Snape, & Tyler, 2017)

La evolución y distribución de los microbios resistentes se ha vuelto una situación alarmante a nivel mundial, la capacidad para detectar tales microbios se basa en modelos de comportamiento de la resistencia a los antibióticos y el impacto proyectado en los futuros modelos médicos, sociales y económicos. Hay vínculos conocidos de la prescripción y el uso de antibióticos con la práctica las profesiones médicas, veterinarias, y en los agronegocios; por lo tanto, se debe proyectar la capacidad de la biomedicina y especialmente la industria farmacéutica para mantenerse por delante de esa resistencia en desarrollo. (Podolsky, 2018)

Tras el descubrimiento de la transmisión de resistencia a los antibióticos entre 1981 y 1992, se destacó el encuadre explícito del uso excesivo de antibióticos como un problema global compartido por reformadores como Stuart Levy y la Alianza para el “Uso Prudente de Antibióticos”; que desde 1992 hasta 2013, tiempo durante el cual la resistencia a los antibióticos se vinculó a preocupaciones más grandes con respecto a las infecciones emergentes y recibió una mayor atención colectiva y el financiamiento. (Podolsky, 2018)

Costa Rica no se encuentra excluido de ésta problemática, se ha observado cómo la población hace caso omiso de las directrices que los profesionales en salud proveen, muchas personas dejan los tratamientos sin terminar porque se sienten mejor, y proceden a dárselo a amigos y familiares o no lo desechan de manera adecuada, una de ellas es tirando los medicamentos por el inodoro, los cuales van a dar a depósitos acuíferos, ya que en éste país no se cuenta con plantas de tratamiento de aguas negras capaces de filtrar antibióticos.

Desde 2013 hasta el presente, Podolsky, 2018 explica que la resistencia a los antibióticos es aún más palpable y se encuentra públicamente incorporada en las preocupaciones más grandes sobre las infecciones globales emergentes, esto atrae el interés de un grupo diverso de actores. Por lo tanto, la búsqueda de alternativas de tratamiento se ve evidenciada cada día más. Es por esto que la importancia del conocimiento de la capacidad bactericida de plantas medicinales se vuelve aún más relevante para luchar contra las infecciones causadas por superbacterias.

La salud humana es el centro de atención, las bacterias con genes resistentes a múltiples fármacos ahora altamente prevalentes en muchos patógenos importantes y comunes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* ha tomado gran auge en los análisis desarrollados en la actualidad. Se buscan formas de atacar la multirresistencia con tratamientos no convencionales, para lograr una disminución a la resistencia desarrollado por las llamadas superbacterias. (Robinson, et al., 2016)

Cualquier acción que se tome solo será sostenible si se basa en una comprensión sólida de los roles relativos de las personas, los animales y el medio ambiente en la aparición, propagación y persistencia de las bacterias resistentes a antibióticos (BRA). Este no es un problema que los países de altos ingresos (PAI) puedan resolver solos. El importante papel que juegan los países de bajos y medianos ingresos (PMBI), ya que afectan muchas áreas importantes. (Robinson, et al., 2016)

Los países en desarrollo como Costa Rica cuentan con una gran población de bajos recursos, dicho sector carece de la comprensión necesaria del uso adecuado de tratamientos y aumenta el crecimiento de bacterias multirresistentes. Cuando habitantes de los PAI viajan a diferentes PMBI pueden

Se debe tomar en cuenta la agricultura animal, esta problemática es subestimada por muchos en los PAI y debe ser una parte integral del pensamiento, ya que lo que el ser humano consume aporta a que se desarrollen BRA. Eso puede comprometer su desarrollo económico

a corto plazo. La ciencia parece quedarse corta cuando se trata de entender las fuerzas económicas detrás de muchas enfermedades infecciosas emergentes; es conocido que una manera fácil de mantener a los animales saludables es mediante el uso de antibióticos en su alimentación regular, evitando así enfermedades en la población agrícola, pero la carne que es luego consumida posee residuos de éstos medicamentos. (Robinson, et al., 2016)

Según Robinson, *et al.*, 2016, se deben buscar enfoques integrados para reducir la presión de selección e interrumpir los ciclos de transmisión de BRA a escala global que se basan no solo en los principios de salud tradicional con el uso de antibióticos, sino también en la evidencia económica y en los principios de equidad social y acceso global a la atención médica efectiva para las personas. Por lo tanto, el desarrollo de investigaciones de extractos naturales con capacidades antibióticas presenta una alternativa económica y accesible al público en general.

Este proyecto destaca los resultados de investigación prometedores sobre las alternativas a los antibióticos, enfocándose principalmente en las propiedades bactericidas de las plantas analizadas. Se quiere mostrar la clasificación de potencia de cada planta utilizada e identificar los componentes activos en cada extracto obtenido, con esto se pretende tener una guía para poder predecir cuales otras plantas podrían tener posibles acciones bactericidas importantes.

## **Antecedentes**

### **Antecedentes históricos**

Los productos naturales han sido la fuente de la mayoría de los ingredientes activos en las medicinas occidentales. Esto es ampliamente aceptado como cierto cuando se aplica al descubrimiento de fármacos. En los "viejos tiempos", antes del avance de la detección de alto rendimiento y la era postgenómica, más del 80% de las sustancias farmacológicas se obtuvieron de productos naturales o se inspiraron en compuestos naturales. (Mukherjee, Venkatesh, & Ponnusankar, 2017)

Más de 100 compuestos derivados de productos naturales se encuentran actualmente en ensayos clínicos y al menos 100 proyectos similares están en desarrollo preclínico. La mayoría de los medicamentos proyectados actualmente se derivan de las plantas y fuentes microbianas. Publicaciones anteriores, e investigadores de todo el mundo, han señalado que relativamente poca parte de la biodiversidad vegetal del mundo ha sido analizada exhaustivamente para determinar su bioactividad. (Mukherjee, Venkatesh, & Ponnusankar, 2017)

Los productos naturales han inspirado muchos desarrollos en química orgánica que conducen a avances en metodologías sintéticas en el desarrollo de varios análogos de compuestos de plomo con potencial terapéutico. La aceptación de Cinchona para el tratamiento de la malaria en el siglo XVII, seguida de digital, morfina, etc., y la introducción de la aspirina, llevaron al público en general a creer en las maravillas de la riqueza floral diversa, y que los productos naturales, incluidas las plantas, ofrecen una gran diversidad estructural. para el tratamiento farmacológico de diversas clases de trastornos. (Mukherjee, Venkatesh, & Ponnusankar, 2017)

El enfoque etnofarmacológico se basa en botánica, química y farmacología (observación, identificación, descripción e investigación experimental); Sin embargo, otras

disciplinas también han hecho contribuciones vitales. En base a estas consideraciones, la etnofarmacología se define como "la exploración científica interdisciplinaria de agentes biológicamente activos tradicionalmente empleados u observados por el hombre". (Mukherjee, Venkatesh, & Ponnusankar, 2017)

Los objetivos de la etnofarmacología son rescatar y documentar el patrimonio cultural importante antes de que se pierda, e investigar y evaluar a los agentes empleados. Por lo tanto, juega un papel inmenso en la evaluación de productos naturales, y más particularmente de medicamentos a base de hierbas de recursos tradicionales y folclóricos. Las observaciones de campo y las descripciones del uso y los efectos de los remedios tradicionales, la identificación botánica y los estudios fitoquímicos y farmacológicos están dentro del alcance de la etnofarmacología. (Mukherjee, Venkatesh, & Ponnusankar, 2017)

Hoy, los estudios que describen el uso de plantas medicinales y otras plantas útiles se incluyen en la investigación etnofarmacológica, pero generalmente se realizan con el objetivo de que conduzcan a un estudio experimental de algunas de estas drogas botánicas, en especial con la problemática actual del surgimiento de bacterias multirresistentes, una de ellas es *E. coli*. (Heinrich & Jäger, 2015) (Tchesnokova, et al., 2018)

### **Antecedentes Internacionales**

Según Zhang, *et al* (2016) "Actividad antibacteriana y mecanismo del aceite esencial de canela contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*" en Shanghai, China se tuvo como objetivo analizar actividad antibacteriana del aceite esencial de canela mediante el método de difusión de agar midiendo el aro de inhibición en la placa de agar al colocar el aceite de canela. El aceite esencial exhibió una actividad antibacteriana efectiva contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* y *Staphylococcus*. La concentración mínima de inhibición de la canela fue similar para ambas bacterias.

Los resultados que obtuvieron mostraron ser positivos e indicaron un buen potencial del aceite esencial de canela para su aplicación en productos alimenticios. Ellos indican que

futuras investigaciones deben llevarse a cabo para dilucidar aún más las diferentes acciones del comportamiento antibacteriano entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y para ampliar la aplicación del aceite de canela en productos alimentarios. (Zhang, Liu, Wang, Jiang, & Quek, 2016)

En Nigeria, Chibueze y Aseibai (2018) "Actividades antibacterianas y sinérgicas del extracto metanólico de hojas de hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) y rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*" tuvieron como objetivo comparar el efecto antibacteriano de los extractos de zacate de limón y raíz de jengibre por separado y analizar si hay un efecto sinérgico en la actividad antibacteriana de los dos extractos juntos.

El material fue secado y extraído con metanol por 48 horas. Observaron la actividad antimicrobiana del extracto obtenido, se cultivó en placas de agar *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*, en cada placa se realizaron hoyos de 6mm en los cuales se colocaron 3mL de los extractos. Luego de la incubación se midieron los diámetros de inhibición bacteriana para cada extracto. (Chibueze & Aseibai, 2018)

Se obtuvo una diferencia significativa en la sinergia observada contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis* en comparación con los extractos solos. Los resultados validan la información existente de que ambas plantas poseen un amplio espectro de potencial antibacteriano, adicionalmente, se vio que al colocar ambos extractos juntos el efecto sinérgico fue mayor que el de las plantas por separado. (Chibueze & Aseibai, 2018)

En Armenia, Petrosyan, Sahakyan y Trchounian (2018) "Composición química y potencial antimicrobiano del aceite esencial de *Artemisia dracunculus* L. cultivado en un paisaje armenio de gran altitud" se desarrolló un estudio en el cual se quiso analizar la composición química y el potencial microbiano del aceite esencial de Estragón cultivado a grandes altitudes frente a *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *P. aeruginosa*.

La planta *Artemisia dracunculus L.* se cultivó a una altitud de 1700-1800 m sobre el nivel del mar, y las muestras se obtuvieron del departamento de biotecnología, de la universidad del estado de Yerevan; utilizaron el aceite esencial de estragón obtenido en a partir del material seco mediante destilación. El efecto antimicrobiano se analizó por el método de difusión de agar, se prefirió este método sobre el método de dilución por la baja solubilidad del aceite esencial en agua. (Petrosyan, Sahakyan, & Trchounian, 2018)

Se realizaron controles positivos con gentamicina, ampicilina y fluticasona, y dimetil sulfóxido como control negativo y se midió el área que presentó ausencia de crecimiento microbiano. Concluyeron que el aceite de estragón puede ser utilizado como un agente natural antimicrobiano para utilizar en cosméticos, comida y medicamentos. (Petrosyan, Sahakyan, & Trchounian, 2018)

En el 2018 en Estados Unidos, Patel, Keelara y Green (2018) "Inactivación de *Escherichia coli* O157: H7 y *Salmonella* en hierbas frescas por aceites esenciales de plantas" se propuso investigar la inactivación de *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* en aceites esenciales obtenidos de hierbas frescas. Las hierbas frescas analizadas que fueron albahaca, culantro, eneldo, perejil y estragón; en cuanto al cultivo bacteriano se utilizó un coctel de 5 cepas de cada bacteria para el estudio, las plantas fueron compradas en un supermercado en donde las hierbas se mantenían a una temperatura de 4°C.

Una parte de las plantas se sumergieron por 2 minutos en 300 mL de agua estéril conteniendo las mezclas de *Salmonella* y *E. coli*, éstas se secaron al aire por 30 min, mientras que el control negativo solo se sumergió en agua estéril. Se observaron los crecimientos de colonias en las plantas utilizadas y se comparó el efecto antibacteriano de los aceites esenciales y el cloro, éstas hierbas contienen cinamaldehído y carvacol, los cuales demostraron un mayor efecto antimicrobiano que el cloro reduciendo patógenos entéricos, la hierba con efecto antibacteriano más eficaz fue el estragón. (Patel, Keelara, & Green, 2018)

En China, Pu, *et al* (2018) "Efectos protectores del ácido benzoico, *Bacillus coagulans* y aceite de orégano sobre la lesión intestinal causada por *Escherichia coli*

enterotoxigénica en cerditos destetados" como objetivo se quiso analizar los efectos protectores del ácido benzoico, *Bacillus coagulans* y aceite de orégano en heridas intestinales causadas por *E. coli* enterotóxica en cerditos destetados, se quiso ver el rendimiento de crecimiento y la barrera intestinal en 30 cerditos expuestos a *E. coli*.

Se dividieron los cerditos en 6 grupos, 5 grupos expuestos a *E. coli* y uno de control, de los 5 grupos expuestos, a 4 se les dio diferentes tratamientos (1: sulfato de colisina + ácido benzoico + *Bacillus coagulans*; 2: ácido benzoico + *Bacillus coagulans*; 3: ácido benzoico + aceite de orégano; 4: ácido benzoico + *Bacillus coagulans* + aceite de orégano). Se analizaron las heces y se observó que el grupo con el tratamiento triple mostró una mejora mucho mayor en la diarrea que presentaban los cerditos expuestos a *E. coli*. Se concluyó que el tratamiento fue eficaz y es un sustituto viable del uso de antibióticos. (Pu, et al., 2018)

El objetivo de un estudio realizado en Marruecos por El Atki, *et al* (2019) "La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de canela y su potencial sinérgico con los antibióticos" fue evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial de la canela sola y en combinación con algunos antibióticos clásicos contra tres bacterias multirresistentes, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, para buscar una posible sinergia. Las astillas de canela fueron compradas en un mercado local, y se utilizaron 200 g, los cuales se sometieron a destilación por 3 horas, el aceite se decantó para separarlo del agua antes del análisis.

La actividad antibacteriana se determinó mediante la difusión de disco, y se utilizaron tres cepas bacterianas (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*); se midieron los diámetros de inactividad bacteriana y todas las pruebas se realizaron por triplicado. Se obtuvo un resultado positivo, ya que hubo sinergia, lo que puede desembocar en la utilización de menores concentraciones de fármacos para los tratamientos antibacterianos. (El Atki, et al., 2019)

### **Antecedentes nacionales**

En una tesis realizada en la UNIBE por Acosta (2004) "Actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano", el objetivo fue comprobar la

presencia de compuestos fenólicos como timol y carvacrol en los aceites esenciales de orégano y tomillo para comprobar la existencia de potencial inhibitorio para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25 922 y *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Los aceites esenciales se obtuvieron mediante la técnica de arrastre por vapor de agua.

Se llevó a cabo un análisis cromatográfico e infrarrojo, éstos demostraron la presencia de compuestos fenólicos como timol y carvacrol. Se prepararon cuatro diluciones a partir de una concentración madre de 10% utilizando como solvente etanol y se demostró la actividad antibacterial de ambos aceites frente a las tres cepas mediante la técnica de difusión de disco, se observó que superan a los antibióticos tradicionales como la amoxicilina. (Acosta, 2004)

Se realizó una búsqueda bibliográfica en las bases de datos de las universidades de Costa Rica que ofrecen la carrera de Farmacia, fueron la Universidad Internacional de las Américas, Universidad de Costa Rica, Universidad de Ciencias Médicas y la Universidad Latina y no se encontraron antecedentes (tesis o artículos científicos) relacionados al tema de investigación.

## **Proyecciones**

- Se espera encontrar una actividad antimicrobiana significativa en la mayoría de las plantas estudiadas, de esta manera se pueden clasificar según la potencia demostrada por cada extracto.
- Mediante esta investigación también se identificarán los componentes principales de las plantas analizadas, con esto se pretende tener la capacidad de predecir que otras plantas tengan posibles actividades bactericidas, basadas en las sustancias que las componen.
- Se quiere llegar a obtener extractos que se puedan utilizar en la industria farmacéutica para obtener posibles nuevos tratamientos.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **Antibioticoterapia**

El advenimiento de los antibióticos modernos contribuyó enormemente a la extensión dramática de la vida humana desde su descubrimiento en virtud de su acción letal y selectiva contra los microbios patógenos. Sin embargo, a pesar de nuestro poderoso arsenal de armas contra estos agentes patógenos, la guerra contra ellos no se ha ganado. Puede que nunca se logre. Por lo tanto, es importante analizar brevemente la aparición y evolución de los antibióticos. (Nicolaou & Rigol, 2018)

El manejo de las infecciones microbianas en el antiguo Egipto, Grecia y China está bien documentado. La era moderna de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1928. Desde entonces, los antibióticos han transformado la medicina moderna y han salvado millones de vidas. Los antibióticos se prescribieron por primera vez para tratar infecciones graves en la década de 1940. (Ventola, 2015)

La penicilina tuvo éxito en el control de las infecciones bacterianas entre los soldados de la Segunda Guerra Mundial. Sin embargo, poco después, la resistencia a la penicilina se convirtió en un problema clínico sustancial, por lo que, en la década de 1950, muchos de los avances de la década anterior se vieron amenazados. En respuesta, se descubrieron, desarrollaron y desplegaron nuevos antibióticos betalactámicos, restaurando la confianza. (Ventola, 2015)

### **Perspectiva histórica**

El origen del término 'antibiótico' se remonta a la palabra antibiose que Paul Vuillemin utilizó por primera vez como antónimo de la simbiosis en su publicación de 1890 para describir la acción antagónica entre diferentes microorganismos (por ejemplo, hongos

contra bacterias; bacterias contra protozoos). Más tarde, la palabra antibiótico se usó para describir los metabolitos secundarios naturales producidos por bacterias y hongos que poseen actividades inhibitoras del crecimiento (bacteriostáticas) o que matan (bactericidas) contra bacterias u hongos. (Nicolaou & Rigol, 2018)

Hoy en día, el término tiene un significado más amplio, en un sentido para incluir moléculas diseñadas y una definición más estrecha y con los términos antibacteriano o antifúngico, para designar sus acciones específicas contra bacterias y hongos, respectivamente, pero no virus. El término antiviral se reserva para este último. En la Edad Media, la teoría del miasma (o miasmática, del griego μίασμα, que significa contaminación, aire de aves o vapores contaminados) se usó para explicar las causas de varias enfermedades. (Nicolaou & Rigol, 2018)

En 1546, el erudito italiano Girolamo Fracastoro (*Hieronymus Fracastorius*) propuso partículas transmisibles e imperceptibles similares a semillas (*Seminaria morbi*) como agentes causantes del brote de ciertas enfermedades. Llevó varios siglos demostrar que las bacterias son un ejemplo de tales "partículas". Mientras tanto, el médico húngaro Ignaz Semmelweis, también conocido como el "salvador de las madres", reconoció la importancia de la higiene en los hospitales y sugirió el lavado de manos con soluciones de cal clorada antes de los exámenes de los pacientes. (Nicolaou & Rigol, 2018)

El cirujano escocés Sir Joseph Lister trató heridas quirúrgicas. Con soluciones de fenol para evitar infecciones. En los 1860's, el médico francés Casimir Davaine demostró que las inyecciones de sangre de animales infectados con ántrax a animales sanos causaban infección. En la segunda mitad del siglo XIX, el químico y bacteriólogo francés Louis Pasteur contribuyó de manera decisiva a nuestra comprensión de las causas subyacentes de las enfermedades infecciosas a través de sus estudios experimentales con bacterias que culminaron en su teoría de los gérmenes de la enfermedad. (Nicolaou & Rigol, 2018)

## Desarrollo de Antibioticoterapia

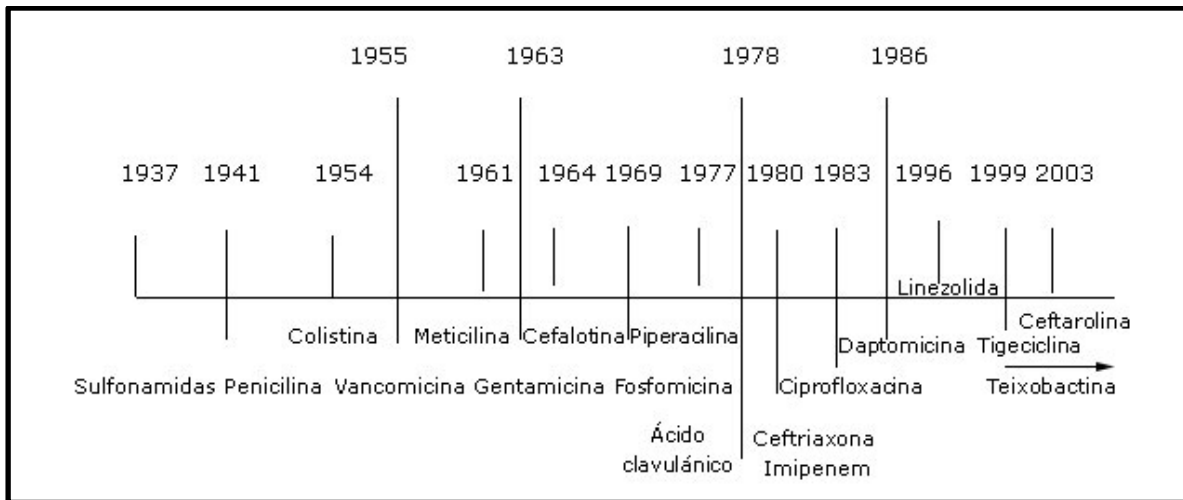
El primer antibiótico descubierto de la naturaleza fue el ácido micofenólico. Reportado por el médico y microbiólogo italiano Bartolomeo Gosio en 1893, este antibiótico fue aislado de *Penicillium glaucum* como un sólido cristalino mientras estudiaba pelagra. En ese momento se demostró que el ácido micofenólico inhibe el crecimiento de *Bacillus anthracis* y, posteriormente, que también posee propiedades antivíricas, antifúngicas, antitumorales y antipsoriasis. (Nicolaou & Rigol, 2018)

Este descubrimiento seminal pasó desapercibido (probablemente debido a su publicación en italiano) hasta que el ácido micofenólico fue redescubierto en 1913 en los Estados Unidos. Sin embargo, su estructura permaneció desconocida hasta 1952, mientras que su síntesis total se logró en 1969. Hasta 1995 el 2- (morfolin-4-il) etil éster del ácido micofenólico fue aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), aunque no como un fármaco antibacteriano sino como un inmunosupresor para prevenir el rechazo del trasplante. (Nicolaou & Rigol, 2018)

Se deben reconocer los experimentos de Paul Ehrlich que condujeron al descubrimiento de las anfetaminas, el primer gran triunfo de la quimioterapia en el siglo XX, cuando dio inicio la era moderna de la terapia antimicrobiana en 1934 con la descripción de Gerhard Domagk acerca de la eficacia de la primera sulfonamida en el tratamiento de infecciones estreptocócicas experimentales. (Quiñones, 2017)

Sin embargo, la llamada "edad de oro" de los antibióticos vio su inicio en 1941 con la producción de penicilina, y más tarde con el desarrollo de nuevos antibióticos como estreptomina, cloranfenicol y aureomicina. La eritromicina y la vancomicina surgieron en la década de 1950 y la gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina en la década de 1960. Por lo tanto, el desarrollo sucesivo de la nueva producción de antibióticos continúa, algunos de los cuales se muestran en la Figura 1. Después de 2000 Se registró la aparición de quinolonas de amplio espectro. (Quiñones, 2017)

**Figura 1 Evolución en la producción de antibióticos a nivel mundial en diversas décadas**



(Quiñones, 2017)

## Métodos para el descubrimiento de antibióticos

### Enfoques culturales

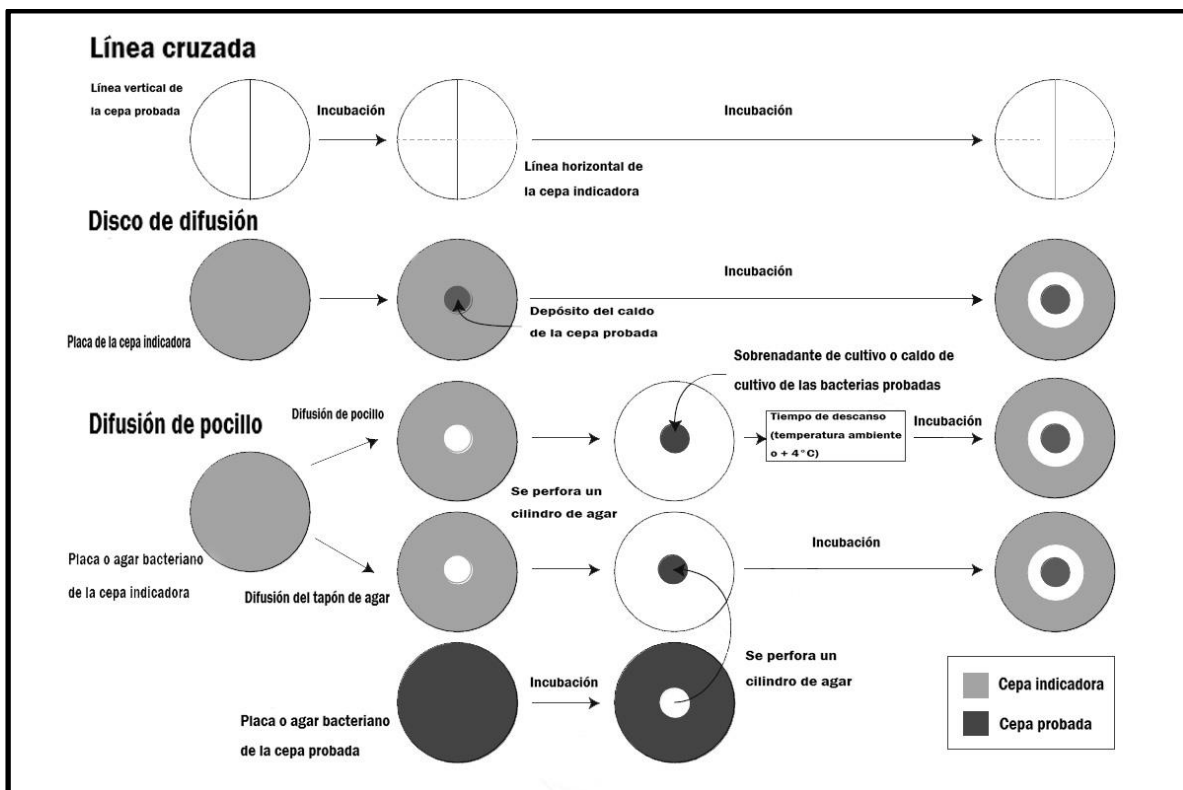
En la década de 1940, Selman Waksman analizó sistemáticamente las bacterias del suelo en busca de antagonismos. Su enfoque basado en el cultivo todavía está en uso hoy en día. Todos los métodos se basan en el mismo principio: mostrar una inhibición de una cepa probada sobre una cepa indicadora cultivada de cerca. La cepa probada es la cepa que se sospecha que produce antimicrobianos dirigidos a la cepa utilizada como indicador. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Existen varias técnicas para detectar la actividad antimicrobiana, ya sea en cultivo sólido o líquido. Existen tres métodos principales con respecto a los enfoques de cultivo sólido: el método de rayas o líneas cruzadas, el método de difusión de disco y el método de

difusión de pocillos (Figura 2). La línea cruzada es la inoculación de la cepa bacteriana probada verticalmente en la placa de agar. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

El tiempo de incubación de la placa depende del ciclo de vida de la cepa bacteriana necesaria para alcanzar la fase exponencial, que es el momento en que se excretan los metabolitos secundarios. Luego, la cepa indicadora se inocula en rayas horizontales y la placa se incuba (Figura 2). Esta técnica es fácil y potente para la detección, pero requiere que ambas cepas bacterianas tengan las mismas condiciones de cultivo (por ejemplo, atmósfera, temperatura y duración del crecimiento). (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

**Figura 2** Enfoques de cultivo sólido que destacan la inhibición entre dos especies bacterianas



(Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

El segundo y el tercer método se denominan respectivamente "difusión de disco" y "método de difusión de pocillos". El método de "difusión de disco" consiste en depositar una gota de la cepa probada en una placa de la cepa indicadora. Después de la incubación, se busca una zona de inhibición alrededor del sedimento. El "método de difusión de pocillos" se basa en la difusión de antimicrobianos por medio de agar que inhibe las especies sensibles. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Una placa de agar se agrupa con la cepa indicadora o se inocular con una placa del indicador y los agujeros de agar se perforan asépticamente. Entonces, existen dos variantes principales. El primero es el método de difusión de tapón de agar que consiste en retirar un cilindro de agar de una placa previamente inoculada con la cepa probada. Este cilindro de agar se coloca luego en el orificio de la placa indicadora. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

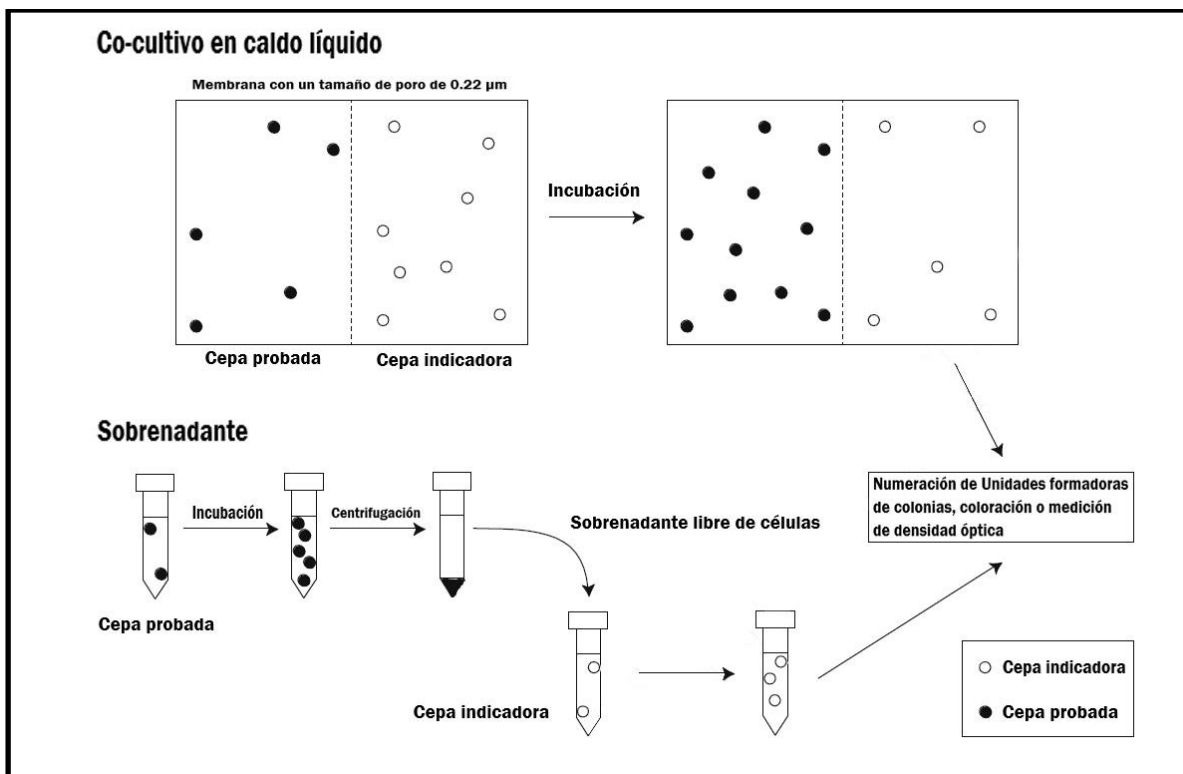
El segundo método variante consiste en colocar un caldo líquido de la cepa probada o un sobrenadante de crecimiento en el orificio. Después de un tiempo de descanso opcional a +4 °C, la placa de agar se incuba y se miden las zonas de inhibición de crecimiento (Figura 2). Se desarrollaron varias variantes, como el uso de condiciones de estrés o el quelante de hierro. La principal limitación de las pruebas de cultivo sólido se refiere a especies bacterianas que tienen diferentes condiciones de crecimiento o especies exigentes. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Los enfoques basados en cultivos líquidos pueden resolver este problema. El co-cultivo de caldo líquido se ha utilizado desde la existencia de la plataforma Waksman. Este es el cultivo simultáneo de las especies probadas y la cepa indicadora separada por un filtro que permite la difusión de nutrientes, pero no la difusión de las células. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Después de la incubación, el crecimiento bacteriano de la cepa indicadora se determina por numeración, coloración o densidad óptica. Otro método es agregar el sobrenadante de crecimiento de las especies de prueba previamente filtradas y concentradas

a un cultivo líquido de la cepa indicadora. El último método permite que las bacterias analizadas crezcan en condiciones diferentes a las de la cepa indicadora (Figura 3). (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

**Figura 3** Enfoques de cultivo líquido destacan la inhibición entre dos especies bacterianas



(Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

### Beneficios de los antibióticos

Los antibióticos no solo han salvado la vida de los pacientes, sino que también han desempeñado un papel fundamental en el logro de importantes avances en medicina y cirugía. Han prevenido o tratado con éxito las infecciones que pueden ocurrir en pacientes que reciben tratamientos de quimioterapia; quienes tienen enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad renal en etapa terminal o artritis reumatoide; o que han tenido cirugías complejas,

como trasplantes de órganos, reemplazos de articulaciones o cirugía cardíaca. (Ventola, 2015)

Los antibióticos también han ayudado a extender la esperanza de vida al cambiar el resultado de las infecciones bacterianas. En 1920, se esperaba que las personas en los Estados Unidos vivieran solo 56.4 años; ahora, sin embargo, el promedio de vida de los Estados Unidos es de casi 80 años. Los antibióticos han tenido efectos beneficiosos similares en todo el mundo. En los países en desarrollo donde el saneamiento aún es deficiente, los antibióticos disminuyen la morbilidad y mortalidad causadas por las infecciones transmitidas por los alimentos y otras infecciones relacionadas con la pobreza. (Ventola, 2015)

### **Tratamientos actuales**

La introducción de antibióticos en la práctica clínica revolucionó el tratamiento tradicional y el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Antes de la introducción de antibióticos, estas enfermedades eran la principal causa de morbilidad y mortalidad en las poblaciones humanas. Hoy en día se cuenta con una amplia gama de antibióticos, que lastimosamente, por su indebido uso, están perdiendo sus propiedades bactericidas. (Aminov, 2016)

### **Mejora de los antimicrobianos**

La estrategia de modificación de los antimicrobianos existentes se inició (y se implementó con éxito) durante el período, cuando la tasa de descubrimiento de nuevas clases de medicamentos se redujo repentinamente en la década de 1970, y el creciente problema de resistencia obligó a los investigadores a proporcionar la posible modificación del arsenal que podría conferir una actividad mejorada, menos sensibilidad a los mecanismos de resistencia y menos toxicidad. (Aminov, A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, 2010)

Si bien este enfoque aún proporciona exitosamente antimicrobianos para el mercado, una de las lecciones aprendidas durante esta carrera de armamentos es que, tarde o temprano, las bacterias adquirirán resistencia a estas versiones modificadas también a través de la adquisición horizontal de nuevos mecanismos de resistencia o la rápida evolución molecular de resistencias existentes a los antibióticos más antiguos. (Aminov, A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, 2010)

### **Síntesis de nuevas moléculas y mejora de compuestos ya conocidos**

El diseño racional de medicamentos consiste en la síntesis empírica de nuevas moléculas que están diseñadas de acuerdo con varias reglas para ser bien absorbidas, no tóxicas y activas contra un objetivo específico. Las reglas más famosas utilizadas por la industria son las reglas de Lipinski. A pesar de que se sintetizaron más de 10 millones de nuevas moléculas, solo unas pocas moléculas activas han llegado al mercado, en particular los fármacos antituberculosos. Esto puede explicarse por el hecho de que los antibióticos generalmente tienen una economía pobre. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

La mejora de las moléculas ya conocidas es otra estrategia que puede generar beneficios. La modificación de la cefalosporina condujo al desarrollo de cefiderocol, que demostró seguridad y tolerabilidad en sujetos sanos, y los ensayos clínicos para el tratamiento de infecciones del tracto urinario están en curso. Otro ejemplo es la modificación del aminoglucósido sisomicina que conduce al desarrollo de plazomicina. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Este antibiótico fue aprobado recientemente por la FDA y un pequeño ensayo clínico de fase 2 encontró que tenía una eficacia comparable a la de la levofloxacin en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y pielonefritis aguda. Si el uso potencial de estos antibióticos queda por determinar, su mecanismo de acción no es novedoso, y se espera la aparición de resistencia de la misma manera que para su padre antibiótico relacionado. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

## Minería de genomas

Los metabolitos secundarios están codificados por un grupo de genes biosintéticos (BGC, por sus siglas en inglés). Miles de genomas procariotas están disponibles en bases de datos de secuencias. Estos datos han generado miles de BGC que potencialmente codifican moléculas desconocidas. A pesar de que muchos de ellos no tienen ninguna actividad antimicrobiana, se sabe poco sobre ellos. Walsh, et. al en el 2015 encontraron 74 BGC putativos de 59 genomas del Proyecto del Microbioma Humano. (Walsh, et al., 2015)

Son posibles varios enfoques de la minería del genoma. Los más utilizados son el enfoque basado en secuencias, la minería del genoma basada en la ecología, la minería del genoma basada en el modo de acción o la minería del genoma basada en funciones. Por ejemplo, la liquenicidina es una bacteriocina sintetizada por *Bacillus licheniformis* que se descubrió utilizando el enfoque de minería del genoma en modo de acción. (Walsh, et al., 2015)

Los autores examinaron las bases de datos de genes LanM, que participan en la biosíntesis de los lantibióticos. La identificación de bacteriocinas que se asume son codificadas por BGC a partir de la secuencia del genoma es posible utilizando algoritmos bioinformáticos. Las bacteriocinas se encuentran fácilmente utilizando herramientas bioinformáticas en comparación con NRPS o PKS. (Walsh, et al., 2015)

Herramientas como BAGEL, antiSMASH o PRISM son ampliamente utilizadas para este propósito. Estas herramientas explotan dos enfoques principales. El primero consiste en encontrar nuevos congéneres de andamios ya conocidos. Este enfoque se basa en la comparación de homología por la investigación de dominios conservados (anclas), como para el dominio de tiotemplato de NRPS y PKS. (Walsh, et al., 2015)

Pequeños cambios estructurales del nuevo homólogo pueden dar como resultado un cambio significativo en la actividad del producto. El segundo enfoque es más difícil y consiste en encontrar nuevos andamios. Predecir la estructura química y la actividad biológica de una secuencia informática BGC es un verdadero desafío. El principal problema es probar la actividad funcional. (Walsh, et al., 2015)

Ambos enfoques requieren la expresión de ingeniería de BGC del huésped nativo o de un huésped heterólogo, que representa el principal cuello de botella de la minería del genoma para el descubrimiento de nuevos antibióticos. La minería del genoma es un enfoque prometedor para el descubrimiento de nuevos antibióticos, a pesar de que el método es fastidioso y requiere mucho tiempo. (Walsh, et al., 2015)

### **Nuevos antimicrobianos**

Las opciones de tratamiento con antibióticos para infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos ya existentes o emergentes son limitadas, lo que resulta en altas tasas de morbilidad y mortalidad. Aunque existen algunas alternativas potenciales al tratamiento con antibióticos, como la inmunización pasiva o la terapia con fagos, el enfoque general se basa en el descubrimiento y desarrollo de antibióticos más nuevos y más eficientes. (Aminov, A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, 2010)

La gran mayoría de las clases de antimicrobianos en uso en la actualidad se han aislado en la era dorada del descubrimiento de antibióticos a partir de un número limitado de nichos ecológicos y grupos taxonómicos, principalmente de *Actinomyces* en el suelo. Sin embargo, la exploración adicional de este nicho ecológico, junto con las tecnologías más nuevas, como los ensayos sin células y el cribado de alto rendimiento, no produjo nuevas clases de medicamentos en los últimos 20 años. (Aminov, A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future, 2010)

## **Resistencia**

Los antibióticos son uno de los descubrimientos más importantes en el siglo XX y se han utilizado ampliamente para tratar enfermedades animales en el siglo XXI. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos entre los patógenos bacterianos y las preocupaciones generalizadas sobre su uso en animales ha recibido una gran atención en todo el mundo. Ésta gran atención se ha centrado en los avances científicos de las alternativas a los antibióticos. (Wang, et al., 2016)

La rápida aparición de bacterias resistentes está ocurriendo en todo el mundo, poniendo en peligro la eficacia de los antibióticos, que han transformado la medicina y salvado millones de vidas. Muchas décadas después de que los primeros pacientes fueron tratados con antibióticos, las infecciones bacterianas se han convertido nuevamente en una amenaza. La crisis de resistencia a los antibióticos se ha atribuido al uso excesivo y al uso indebido de estos medicamentos, así como a la falta de desarrollo de nuevos medicamentos por parte de la industria farmacéutica debido a la reducción de los incentivos económicos y a los requisitos reglamentarios desafiantes. (Ventola, 2015)

### **Carga clínica y económica de la resistencia a los antibióticos**

Las infecciones resistentes a los antibióticos son una carga económica y de salud considerable para el sistema de atención médica de los Estados Unidos y del mundo entero, Así como para los pacientes y sus familias. Ocurren comúnmente en hospitales, debido a la agrupación de pacientes altamente vulnerables, el uso extensivo de procedimientos invasivos y las altas tasas de uso de antibióticos en este entorno. (Ventola, 2015)

Casi dos millones de estadounidenses al año desarrollan infecciones relacionadas con el sistema de salud (HAI, por sus siglas en inglés), lo que resulta en 99000 muertes, la mayoría debido a patógenos resistentes a los antibacterianos. En 2006, se descubrió que dos HAI comunes (sepsis y neumonía) eran responsables de la muerte de casi 50000

estadounidenses y le costaron al sistema de atención médica de los Estados Unidos Más de \$ 8 mil millones. (Ventola, 2015)

Las infecciones resistentes a los antibióticos agregan costos considerables al sistema de atención médica ya sobrecargado de las naciones. Cuando las opciones de tratamiento con antibióticos de primera línea y luego de segunda línea son limitadas o no están disponibles, los profesionales de la salud pueden verse obligados a usar antibióticos que son más tóxicos para el paciente y con frecuencia más caros. (Ventola, 2015)

Incluso cuando existen tratamientos efectivos, los datos muestran que, en la mayoría de los casos, los pacientes con infecciones resistentes requieren estadías en el hospital significativamente más largas, más visitas al médico y recuperaciones más prolongadas y experimentan una mayor incidencia de discapacidad a largo plazo. La duración de las estadías en el hospital para pacientes con antibióticos. Se encontró que las infecciones resistentes a la infección se prolongaban entre 6.4 y 12.7 días, agregando colectivamente ocho millones de días adicionales de hospitalización. (Ventola, 2015)

Las estimaciones sobre el costo médico por paciente con una infección resistente a los antibióticos oscilan entre \$18588 y \$29069. Se estima que la carga económica total que las infecciones resistentes a los antibióticos imponen a la economía de los Estados Unidos asciende a \$20 mil millones en costos de atención médica y \$35 mil millones al año en pérdida de productividad. Las infecciones resistentes a los antibióticos también son una carga para las familias y las comunidades por la pérdida de salarios y costos de atención médica. (Ventola, 2015)

### **Motivos de resistencia**

Los mecanismos más comunes de resistencia a los antibióticos que se observan hoy en día incluyen la producción de enzimas especializadas en metabolizar antibióticos, las bombas de flujo de salida que evitan que el antibiótico permanezca en la célula bacteriana,

las modificaciones en la pared celular que impiden que un antibiótico se adhiera al objetivo, alternando las vías metabólicas que evite la acción del antibiótico y la regulación negativa de las porinas que permitirían la infiltración de antibióticos de la célula. (Bird, Boopathy, Nathaniel, & LaFleur, 2019)

Aunque los ARB son la amenaza final para la salud pública, los genes de resistencia a los antibióticos son el mecanismo subyacente de la proliferación. Debido a la aplicación generalizada de antibióticos, las bacterias en presencia de antibióticos viven con una presión selectiva que influye en los requisitos genéticos. Las bacterias susceptibles a un agente antimicrobiano se volverán estáticas o morirán; sin embargo, las bacterias con una resistencia al agente no solo tendrán el potencial de replicación, sino que también tendrán la oportunidad de transferir genes de resistencia a bacterias susceptibles. (Bird, Boopathy, Nathaniel, & LaFleur, 2019)

La capacidad de las bacterias para intercambiar y adoptar información genética es el fenómeno principal que conduce a la prevalencia de ARB en las instalaciones de atención médica y en el medio ambiente. Los ARB tienen el potencial de influir en las bacterias ambientales y propagar la propagación de ARG principalmente a través de la transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés), mientras que persisten a través de la autorreplicación o la transferencia vertical de genes (VGT, por sus siglas en inglés). (Bird, Boopathy, Nathaniel, & LaFleur, 2019)

Las bacterias contienen genes cromosómicos extra conocidos como plásmidos. A través del intercambio / adquisición de plásmidos, las bacterias tienen una capacidad única para alterar el ADN en función de los genes bacterianos en su entorno. Esto permite que las bacterias sensibles se vuelvan resistentes a los antibióticos a través de una serie de diferentes mecanismos debido a la absorción de genes de resistencia de bacterias resistentes. (Bird, Boopathy, Nathaniel, & LaFleur, 2019)

## **Mal uso de tratamientos**

A pesar de los esfuerzos considerables para aumentar la conciencia de los pacientes con riesgo de infecciones por bacterias Gram Negativas resistentes a los antibióticos, las tasas de terapia apropiadas retrasadas siguen siendo altas para tales pacientes y las consecuencias negativas de la terapia apropiada retrasada han sido bien documentadas. Aunque existe una relación entre la terapia apropiada diferida y los resultados perjudiciales entre los pacientes con infecciones gramnegativas, no está claro si la asociación es causal o simplemente está confundida por la resistencia a los antibióticos (Gidaya, et al., 2018)

Los pacientes que reciben un tratamiento apropiado diferido tienen más probabilidades de tener una infección debida a patógenos resistentes a los antibióticos, y también se ha demostrado que los pacientes con infecciones debidas a patógenos resistentes a los antibióticos experimentan resultados más deficientes, que incluyen tasas de mortalidad más altas y una estadía más prolongada del patógeno y mayores costos hospitalarios en comparación con pacientes con infecciones por patógenos sensibles a los antibióticos. (Gidaya, et al., 2018)

La defensa evita la acumulación del fármaco al atacar químicamente el fármaco, las enzimas designadas modifican las moléculas del fármaco o las hidrolizan. Estas reacciones pueden ocurrir dentro de la célula, o preventivamente fuera de la célula si las enzimas se secretan. Incluso si los medicamentos se acumulan sin modificar en el citoplasma bacteriano, la unión e inhibición de su objetivo puede verse obstaculizada por un cambio en el objetivo: modificación química del objetivo, unión del objetivo por un factor protector, o cambio en la abundancia del objetivo (nivel de expresión). (Yelin & Kishony, 2018)

Notablemente, mientras que para algunas drogas la sobreexpresión del objetivo aumenta la resistencia, para otros es una expresión reducida que puede conferir resistencia. En última instancia, la última línea de defensa puede ser evitar el efecto tóxico de la unión del objetivo, evitando la necesidad de la reacción química en la que está involucrado el

objetivo, o cambiando la composición química y la funcionalidad de la célula. (Yelin & Kishony, 2018)

Los cambios genéticos varían en escala desde mutaciones puntuales a través del reclutamiento de elementos preexistentes hasta la importación horizontal de genes. En la mejor escala genotípica, las mutaciones puntuales de novo (cambio de un solo nucleótido) que aparecen en sentido ascendente o dentro de los genes pueden afectar la expresión o alterar las estructuras de ARN o proteínas de los objetivos farmacológicos o los genes que confieren resistencia. (Yelin & Kishony, 2018)

En la escala genómica, los elementos genéticos se pueden barajar a través del genoma para ensamblar nuevas combinaciones, que pueden afectar la expresión de genes relevantes, ya sea introduciendo un promotor fuerte de un gen no expresado previamente o generando copias múltiples de genes específicos o amplificación de genes. La adquisición de la resistencia se define por un tipo específico de cambio genotípico que conduce a un tipo específico de mecanismo de resistencia. (Yelin & Kishony, 2018)

### **Uso excesivo**

Desde 1945, Sir Alexánder Fleming dio la alarma sobre el uso excesivo de antibióticos cuando advirtió que "...el público exigirá el medicamento y luego iniciará una era de abusos". El uso excesivo de antibióticos claramente impulsa la evolución de resistencia. Los estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición y diseminación de cepas de bacterias resistentes. (Ventola, 2015)

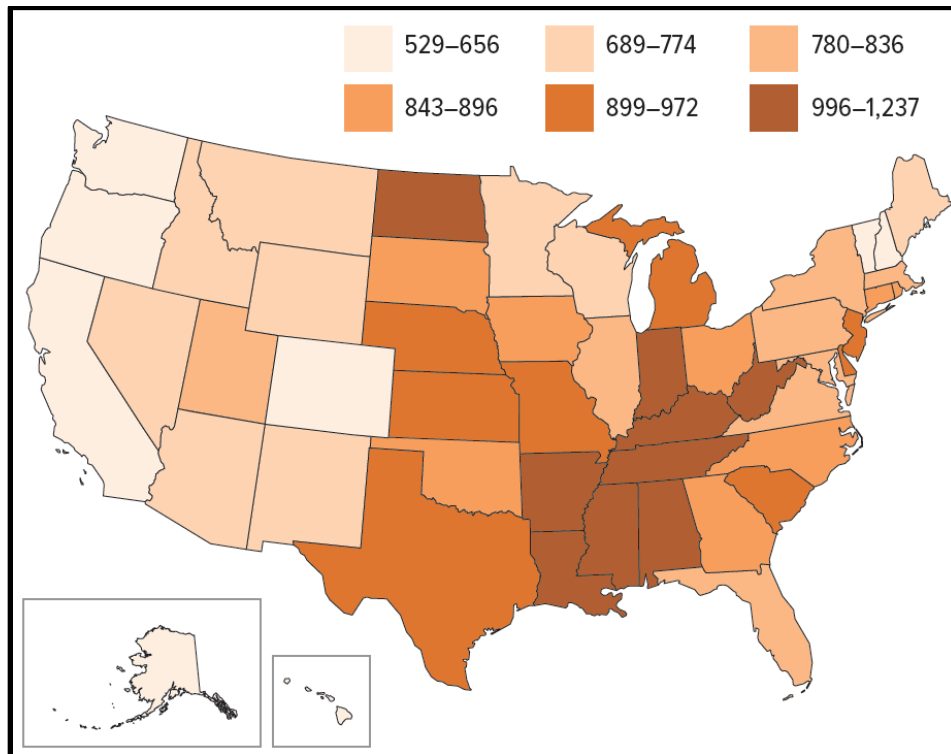
En general, se ha encontrado que existen conceptos erróneos sobre el uso y las indicaciones de los antibióticos. La falta de conocimiento con respecto a la resistencia a los antibióticos es frecuente. Pero se ha intentado informar a la población para que sean conscientes de los riesgos asociados con el uso de antibióticos excesivos, en especial en

niños. Una mayor interacción con los pediatras puede ayudar a mejorar el conocimiento de los padres y las prácticas de uso de los antibióticos para así controlar el problema de la resistencia a los antibióticos. (Agarwal, Yewale, & Dharmapalan, 2015)

En las bacterias, los genes pueden heredarse de parientes o pueden adquirirse de no parientes en elementos genéticos móviles como los plásmidos. Esta transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) puede permitir la transferencia de resistencia a antibióticos entre diferentes especies de bacterias. La resistencia también puede ocurrir espontáneamente a través de la mutación. Los antibióticos eliminan a los competidores sensibles a los medicamentos, dejando atrás las bacterias resistentes para reproducirse como resultado de la selección natural. (Ventola, 2015)

A pesar de las advertencias sobre el uso excesivo, los antibióticos se recetan en exceso en todo el mundo. En los Estados Unidos, la gran cantidad de antibióticos recetados indica que se debe hacer mucho trabajo para reducir el uso de estos medicamentos. Un análisis de la base de datos Midas de IMS Health, estima el consumo de antibióticos en función del volumen vendido en farmacias minoristas y hospitalarias, indicó que, en 2010, 22.0 unidades estándar (una unidad que equivale a una dosis, es decir, un comprimido, cápsula o ampolla) de antibióticos se prescribieron por persona en los Estados Unidos (Ventola, 2015)

**Figura 4 Prescripción de antibióticos por cada 1000 personas de todas las edades según el estado en el 2010**



(Ventola, 2015)

El número de recetas de antibióticos varía según el estado, en la Figura 4 se puede observar la distribución por estados, y la mayoría se escribe en los estados que van desde los Grandes Lagos hasta la Costa del Golfo, mientras que la Costa Oeste tiene el menor uso. En algunos estados, el número de los cursos de tratamiento prescritos con antibióticos por año exceden a la población, lo que equivale a más de un tratamiento por persona por año. (Ventola, 2015)

En muchos otros países, los antibióticos no están regulados y están disponibles sin receta médica. Esta falta de regulación da como resultado, antibióticos que son fácilmente accesibles, abundantes y baratos, lo que promueve el uso excesivo. La capacidad de comprar dichos productos en línea también los ha hecho accesibles en países donde los antibióticos están regulados. (Ventola, 2015)

## **Prescripción inapropiada**

Los antibióticos recetados incorrectamente también contribuyen a la promoción de bacterias resistentes. Los estudios han demostrado que la indicación del tratamiento, la elección del agente o la duración de la terapia con antibióticos es incorrecta en 30% a 50% de los casos. Un estudio realizado en los Estados Unidos informó que se definió un patógeno en solo el 7,6% de 17.435 pacientes hospitalizados con neumonía adquirida en la comunidad (NAC). (Ventola, 2015)

En comparación, los investigadores del Instituto Karolinska en Suecia pudieron identificar un patógeno probable en el 89% de los pacientes con NAC mediante el uso de técnicas de diagnóstico molecular (reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y PCR semicuantitativa). Además, se ha descubierto que entre el 30% y el 60% de los antibióticos recetados en las unidades de cuidados intensivos (UCI) son innecesarios, inapropiados o subóptimos. (Ventola, 2015)

Los antibióticos recetados incorrectamente tienen un beneficio terapéutico cuestionable y exponen a los pacientes a posibles complicaciones de la terapia con antibióticos. El subinhibidor y las concentraciones de antibióticos subterapéuticos pueden promover el desarrollo de resistencia a los antibióticos al apoyar las alteraciones genéticas, tales como cambios en la expresión génica, HGT y mutagénesis. (Ventola, 2015)

Los cambios en la expresión génica inducida por antibióticos pueden aumentar la virulencia, mientras que el aumento de la mutagénesis y la HGT promueven la resistencia a los antibióticos y su propagación. Se ha demostrado que los bajos niveles de antibióticos contribuyen a la diversificación de la cepa en organismos como *Pseudomonas aeruginosa*. También se ha demostrado que las concentraciones de subinhibidores y de piperacilina y / o tazobactam inducen amplias alteraciones proteómicas en *Bacteroides fragilis*. (Ventola, 2015)

## **Residuos en alimentos**

En todo el mundo hay una gran preocupación por las superbacterias emergentes resistentes a los medicamentos y la falta de nuevos antibióticos para el tratamiento de enfermedades humanas y animales. Para la industria agrícola, existe una necesidad urgente de desarrollar estrategias para reemplazar los antibióticos para los animales productores de alimentos, especialmente las aves de corral y el ganado. (Lillehoj, et al., 2018)

El 2° Simposio Internacional sobre Alternativas a los Antibióticos se llevó a cabo en la Organización Mundial de Sanidad Animal en París, Francia, del 12 al 15 de diciembre de 2016 para discutir los avances científicos recientes sobre planes estratégicos de manejo sin antibióticos, para evaluar las diferencias regionales en las políticas con respecto a la reducción de antibióticos en la agricultura animal y desarrollar alternativas a los antibióticos para combatir el aumento global de la resistencia a los antibióticos. (Lillehoj, et al., 2018)

Tanto en el mundo desarrollado como en desarrollo, los antibióticos se usan ampliamente como suplementos de crecimiento en el ganado. Se estima que el 80% de los antibióticos vendidos en el mundo se usan en animales, principalmente para promover el crecimiento y prevenir la infección. Se dice que el tratamiento del ganado con antimicrobianos mejora la salud general de los animales, produciendo mayores rendimientos y un producto de mayor calidad. (Ventola, 2015)

Los antibióticos utilizados en el ganado son ingeridos por los humanos cuando consumen alimentos. La transferencia de bacterias resistentes a los humanos por los animales de granja se observó por primera vez hace más de 35 años, cuando se encontraron altas tasas de resistencia a los antibióticos en la flora intestinal de animales de granja y granjeros. Más recientemente, los métodos de detección molecular han demostrado que las bacterias resistentes en los animales de granja llegan a los consumidores por medio de productos agrícolas. (Ventola, 2015)

Esto ocurre a través de la siguiente secuencia de eventos: 1) el uso de antibióticos en animales productores de alimentos mata o suprime las bacterias susceptibles, permitiendo que prosperen las bacterias resistentes a los antibióticos; 2) las bacterias resistentes se transmiten a los humanos a través del suministro de alimentos; 3) estas bacterias pueden causar infecciones en humanos que pueden tener consecuencias adversas para la salud. (Ventola, 2015)

El uso agrícola de antibióticos también afecta el microbioma ambiental. Hasta el 90% de los antibióticos administrados al ganado se excretan en orina y heces, luego se dispersan ampliamente a través de fertilizantes, aguas subterráneas y escorrentía superficial. Además, las tetraciclinas y la estreptomicina se rocían en los árboles frutales para actuar como pesticidas en el oeste y el sur de los Estados Unidos (Ventola, 2015)

Si bien esta aplicación representa una proporción mucho menor del uso general de antibióticos, la extensión geográfica resultante puede ser considerable. Esta práctica también contribuye a la exposición de microorganismos en el medio ambiente a agentes inhibidores del crecimiento, alterando la ecología ambiental al aumentar la proporción de microorganismos resistentes versus susceptibles. (Ventola, 2015)

Los productos antibacterianos vendidos con fines higiénicos o de limpieza también pueden contribuir a este problema, ya que pueden limitar el desarrollo de inmunidades a los antígenos ambientales tanto en niños como en adultos. En consecuencia, la versatilidad del sistema inmunitario puede verse comprometida, posiblemente aumentando la morbilidad y la mortalidad debido a infecciones que normalmente no serían virulentas. (Ventola, 2015)

### **Uso de antimicrobianos en agricultura, ganadería y acuicultura**

Los antimicrobianos se han utilizado en animales para el tratamiento de enfermedades, para la prevención y el control de enfermedades, y también como promotores del crecimiento. El uso terapéutico de antimicrobianos en la cría de animales debe ir

acompañado idealmente de una prueba de susceptibilidad antimicrobiana. De acuerdo con la determinación de los resultados, las atribuciones del medicamento, la edad, el estado inmune del animal, el costo del medicamento y la aprobación de la especie, el medicamento apropiado es elegido. (Economou & Gousia, 2015)

En el caso de enfermedades infecciosas, generalmente se trata a toda la parvada para prevenir la diseminación de la enfermedad en la población de aves, a pesar de la exposición de síntomas clínicos en algunos animales. Esto se conoce como metafilaxia, en la que generalmente se administran altas dosis de antibióticos por un período corto. Aún así, la línea roja entre el uso de antibióticos para el tratamiento o la prevención no está clara. (Economou & Gousia, 2015)

En contraste, el uso de antimicrobianos para la prevención (también conocido como profilaxis) se refiere a la administración de antimicrobianos en el alimento o en el agua potable en dosis bajas durante un período de tiempo más largo, generalmente durante varias semanas. Durante este período, los animales no muestran signos clínicos, pero existe el riesgo de infección. (Economou & Gousia, 2015)

Stokstad y Jukes reportaron por primera vez en 1950 sobre los beneficios del uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento antimicrobiano, cuando notaron que pequeñas dosis subterapéuticas de penicilina y tetraciclina podrían mejorar el aumento de peso. Los promotores de crecimiento antimicrobiano ya no están permitidos en la Unión Europea, pero todavía se usan en América del Norte y otros países. (Economou & Gousia, 2015)

Los niveles subterapéuticos de antibióticos promueven el crecimiento, pero aún no está claro el mecanismo de esta acción. Entre las hipótesis probadas se encuentran la estimulación de la síntesis intestinal de vitaminas, la reducción del total de bacterias en el tracto intestinal y la posterior reducción en la competencia de nutrientes entre los microorganismos y el huésped, la inhibición de bacterias dañinas, la estimulación

inmunológica reducida y la modificación del rumen metabolismo microbiano. (Economou & Gousia, 2015)

Estas dosis subterapéuticas no son suficientes para destruir las bacterias objetivo, permitiendo que las más resistentes sobrevivan. Hace unos años, la FDA emitió un borrador de orientación para los ganaderos, veterinarios y fabricantes de medicamentos, lo que representa un paso para detener el uso de antibióticos para promover el crecimiento. En la Unión Europea, los promotores del crecimiento antimicrobiano se retiraron en 2006, aunque los ionóforos continúan administrándose en los alimentos. (Economou & Gousia, 2015)

El uso de agentes antimicrobianos veterinarios en animales productores de alimentos en países de la Unión Europea y los Estados Unidos de América informan que el consumo de antibióticos para uso animal se ha incrementado en aproximadamente un 4% en la Unión Europea, mientras que, en los Estados Unidos, sigue una tendencia ascendente, a pesar del llamado a limitar el uso de antimicrobianos en el ganado. (Economou & Gousia, 2015)

En el ganado bovino, se usan ampliamente antimicrobianos como amoxicilina, penicilina, eritromicina, quinolonas, gentamicina, novobiocina, tilosina, tilmicosina y tetraciclina. En los animales productores de carne, los antibióticos se usan principalmente para el tratamiento y la prevención de la neumonía bovina, la diarrea y la fiebre de envío, que son los problemas más comunes. (Economou & Gousia, 2015)

Para el tratamiento de la neumonía, las oxitetraciclinas y la espectinomicina son los antibióticos de primera elección, con florfenicol y macrólidos (particularmente tilmicosina) considerados como la segunda opción, y las cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación son la última opción. Aún así, los antibióticos se administran al menos una vez a través de la alimentación por varias razones, como abscesos hepáticos, aumento del crecimiento y enfermedades respiratorias. (Economou & Gousia, 2015)

El uso de antimicrobianos de espectro estrecho se ve favorecido en casos de mastitis clínica, siendo los antimicrobianos de primera elección los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos utilizados para tratar la mastitis resultante de estreptococos o penicilina cuando se trata la mastitis causada por estafilococos. En ciertos casos, el uso de antibióticos intramamarios en el período sin lactancia se administra a todo el rebaño para prevenir la mastitis infecciosa. (Economou & Gousia, 2015)

En los cerdos, las tendencias actuales en la cría requieren la segregación de los animales en grupos de acuerdo con la edad, donde los cerdos son de tamaño y peso similares, y, por lo tanto, los antimicrobianos se pueden administrar en grupos de cerdos por vía oral mediante la adición en el alimento o agua. La terapia individual de cerdos por inyección de antimicrobianos se considera principalmente en cerdos criados para la reproducción. (Economou & Gousia, 2015)

El uso de antimicrobianos para la prevención es una práctica común en granjas porcinas, especialmente en períodos estresantes que predisponen a enfermedades infecciosas. Dichos períodos son el tiempo entre el nacimiento y la primera lactancia, donde tiene lugar el corte del cordón umbilical y la cola; el período de ablación, donde cambian el ambiente, la dieta, la castración, las vacunas y finalmente el período de engorde, donde el hacinamiento, aireación inadecuada y las temperaturas bajas o altas pueden formar un ambiente bastante estresante. (Economou & Gousia, 2015)

Se considera que el uso profiláctico de antimicrobianos es mayor en el período de ablactación, mientras que al final de los cerdos de engorde, no reciben antimicrobianos para evitar la detección de residuos después del sacrificio. Para la prevención y el tratamiento de la neumonía enzoótica, se utilizan grandes cantidades de diversos antibióticos, siendo los más comunes ceftiofur, tetraciclinas, tiamulina, lincomicina y enrofloxacin. (Economou & Gousia, 2015)

Además, en la enteritis bacteriana, especialmente cuando el agente etiológico es *E. coli* o *Clostridium perfringens*, se requiere tratamiento antibiótico con penicilinas, tetraciclinas (clortetraciclina, oxitetraciclina), quinolonas (enrofloxacina) o aminoglucósidos (gentamicina, neomicina). Finalmente, en la disentería porcina (*Brahyspira hyodysenteriae*) y en la ileitis (*Lawsonia intracellularis*), se utilizan principalmente lincomicina, tiamulina, macrólidos o tetraciclinas. (Economou & Gousia, 2015)

En las aves de corral, los antibióticos utilizados por razones terapéuticas generalmente se administran a través del agua, en contraste con el uso que promueve el crecimiento, donde se agregan antibióticos en los alimentos. Los antibióticos más utilizados son las penicilinas (amoxicilina), quinolonas (enrofloxacina), tetraciclinas (doxiciclina, oxitetraciclina), macrólidos (eritromicina, tilosina), aminoglucósidos, la combinación de sulfonamida / trimetoprima, polimixinas (otra antimicrobiana) y la antimicrobiana y la colimina.) (Economou & Gousia, 2015)

En los Estados Unidos, se usan los antibióticos mencionados anteriormente, con la excepción de las fluoroquinolonas. La ampicilina, la eritromicina, la lincomicina, la combinación de trimetoprima y sulfonamida, y ciertas sulfonamidas (p. Ej., Sulfatiazol) pueden alterar significativamente la flora microbiana del rumen cuando se administran por vía oral y, en ciertos casos, pueden causar la muerte. (Economou & Gousia, 2015)

Por lo tanto, en los pequeños rumiantes maduros, es preferible administrar antimicrobianos de otra manera que no sea la vía oral (alimento o agua), con la excepción de ciertas sulfonamidas y tetraciclinas, que pueden ser absorbidas eficientemente por el rumen. Han surgido preocupaciones sobre el uso extenso de agentes no terapéuticos después de la duplicación del uso de antimicrobianos en la acuicultura en la década de 1994-2004. (Economou & Gousia, 2015)

En animales de acuicultura, se han utilizado varias clases de antibióticos. Entre ellos se encuentran antibióticos como sulfonamidas, penicilinas, quinolonas, tetraciclinas y

fenicoles, que se enumeran como antimicrobianos críticos o muy importantes para la medicina humana. Las últimas tres clases de antimicrobianos se usan ampliamente en el cultivo de salmón. Las quinolonas, las tetraciclinas y los fenicoles son selectivos para una variedad de genes de resistencia a los antimicrobianos que se encuentran en los transposones, plásmidos e integrones que, cuando son móviles, pueden inducir su diseminación. (Economou & Gousia, 2015)

### **Modos de propagación a los humanos de animales de granja y alimentos**

Las posibles rutas de transporte entre animales y humanos son numerosas. Aún así, las formas más probables de interacción se resumen en la transmisión a través de la cadena alimentaria; a través del contacto directo o indirecto con personas que trabajan en contacto cercano con animales, como granjeros y trabajadores de salud animal; ya través de ambientes contaminados con estiércol y acuicultura. (Economou & Gousia, 2015)

En particular, el papel del medio ambiente es extremadamente importante, ya que puede servir como reservorio de genes de resistencia a antibióticos. Aunque el riesgo inmediato de los patógenos transmitidos por los alimentos resistentes a los antibióticos es más fácil de comprender, quizás la situación más peligrosa es la transferencia de características de resistencia a los antimicrobianos a través del conjunto genético contenido en bacterias, bacteriófagos o fragmentos de ADN. (Economou & Gousia, 2015)

Se ha observado que la transferencia horizontal de genes, el mecanismo por el cual la mayoría de las bacterias podría transferir genes de resistencia a antibióticos, puede ocurrir en todas las matrices. Aún así, es más probable en las categorías de alimentos que contienen un alto número de células microbianas (alimentos fermentados, mínimamente procesados o crudos). (Economou & Gousia, 2015)

La convivencia de estos factores con bacterias patógenas en diversos entornos, y especialmente en el intestino humano, podría dar lugar a la aparición de cepas resistentes.

Esto ha sido demostrado *in vitro* y se ha demostrado la transferencia de genes de resistencia a la eritromicina de bacterias del ácido láctico a *L. monocytogenes*. Además, se ha informado la transferencia de genes de resistencia a la tetraciclina y la eritromicina de *Enterococcus faecalis* a cepas de *L. monocytogenes* *in vitro* y en el tracto gastrointestinal de ratones. (Economou & Gousia, 2015)

La resistencia a la ampicilina se ha transferido de *Salmonella typhimurium* a *E. coli* en la leche y la carne molida. Se ha logrado transferir genes de resistencia a la tetraciclina de *E. faecalis* a *Listeria innocua* en carne. Además, la transferencia de resistencia está bien documentada en bacterias de la misma especie en el tracto digestivo humano. En *E. coli*, los genes que codifican para  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro podrían estar alojados en elementos genéticos móviles y, por lo tanto, podrían transmitirse a otras cepas de *E. coli*, como se ha demostrado *in vitro*. (Economou & Gousia, 2015)

Además, se ha logrado proporcionar evidencia indirecta de la transferencia de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos a través de la cadena alimentaria. Informan que el 54% de la *E. coli* de origen humano portaba genes para  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro que eran genéticamente idénticos a los de origen avícola. Por lo tanto, las bacterias que contienen genes de resistencia a los antimicrobianos pueden ser un peligro indirecto para la salud pública, independientemente de su patogenicidad, a medida que aumenta el conjunto genético de resistencia disponible. (Economou & Gousia, 2015)

### **Riesgos para la salud humana**

La mayor carga sobre la salud humana de los patógenos transmitidos por los alimentos resistentes a los antibióticos frente a los sensibles a los antibióticos ha sido bien documentada. Con respecto a *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.*, el aumento de la resistencia a los antimicrobianos ha dado como resultado un mayor número de hospitalizaciones y una mayor morbilidad y mortalidad. (Economou & Gousia, 2015)

E una revisión de patógenos emergentes de la carne, se informan brotes seleccionados en los que se exhibió una mayor gravedad, coincidiendo con que los agentes etiológicos son bacterias resistentes a los antibióticos. En general, la mayor gravedad de la infección resultante de las bacterias resistentes a los antibióticos podría resumirse de la siguiente manera: (Economou & Gousia, 2015)

1. Retraso o fracaso del tratamiento. La administración de antibióticos en pacientes, especialmente en casos severos, a menudo se administra empíricamente antes de los resultados del antibiograma. Por lo tanto, la terapia con antibióticos falla. En algunos casos, el deterioro del paciente en el tiempo de recaída es fatal. (Economou & Gousia, 2015)
2. Elección limitada de antimicrobianos. Los antimicrobianos disponibles son limitados debido a la aparición de agentes patógenos resistentes a los antibióticos. Además, el mayor uso de los antimicrobianos efectivos aumenta la posibilidad de aparición de nuevas cepas resistentes. (Economou & Gousia, 2015)
3. Selección de cepas patógenas resistentes suprimidas cuando se administra terapia antibiótica para el tratamiento de otras enfermedades bacterianas. (Economou & Gousia, 2015)
4. Coexistencia y posiblemente aumento de la regulación de genes de patogenicidad con genes de resistencia como resultado de la selección. El resultado es la aparición de cepas altamente patógenas resistentes a los antibióticos. Como ejemplo, en *S. typhimurium*, la resistencia múltiple a antibióticos DT104 se expresa mediante un grupo de genes (SGII), en el que están contenidos los genes que codifican las proteínas de virulencia. (Economou & Gousia, 2015)

Los riesgos para la salud humana asociados con el consumo de leche cruda o no pasteurizada y productos lácteos están bien establecidos y han sido revisados previamente.

En general, la cuantificación precisa del efecto total de la resistencia a los antibióticos en términos de morbilidad y mortalidad es bastante difícil, ya que es un problema agregado a la infección inicial. (Economou & Gousia, 2015)

Se espera que la gravedad de la infección en términos de duración total y gravedad sea más profunda. Se ha documentado que la aparición creciente de bacterias resistentes a los antibióticos ha provocado un aumento de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Más específicamente, los porcentajes crecientes de *Salmonella spp.* resistentes a antibióticos, y *Campylobacter spp.* se han relacionado con un aumento en las hospitalizaciones, el riesgo de infecciones invasivas y la mortalidad. (Economou & Gousia, 2015)

Según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades / Agencia Europea de Medicamentos, se estimó que la carga de bacterias resistentes a los antibióticos que causaron infecciones del torrente sanguíneo en la Unión Europea, Islandia y Noruega en 2007 sumó 386 100 casos, 25100 muertes y 2 536 000 días de hospitalización. Aunque el número de casos causados por bacterias resistentes a los antibióticos de las grampositivas fue comparable al de las gramnegativas, casi dos tercios de las muertes se atribuyeron a la resistencia a los antibióticos gramnegativas bacterias. (Economou & Gousia, 2015)

### **Depósitos acuíferos**

La presencia de productos farmacéuticos en el agua potable ha sido motivo de preocupación durante los últimos diez años porque muchos de estos contaminantes son persistentes en tales matrices acuáticas. Los últimos estudios han demostrado que pueden presentar un riesgo ecotoxicológico debido a sus posibles efectos negativos a largo plazo sobre los organismos vivos, a pesar de las concentraciones relativamente bajas de estos compuestos en el agua potable. (Caban, Bialk-Bielinska, Stepnowski, & Kumirska, 2016)

Por esta razón, varios investigadores han estado investigando los roles de varios procesos de tratamiento de agua potable en la eficiencia de la eliminación de estos

contaminantes polares para disminuir su liberación en el sistema de agua potable. Además, desde hace varios años, los programas de monitoreo y la evaluación anticipada de riesgos se llevan a cabo con el fin de brindar información importante para la búsqueda de indicadores (para el monitoreo futuro) y regulaciones consecuentes. (Caban, Bialk-Bielinska, Stepnowski, & Kumirska, 2016)

Este estudio revisa críticamente la literatura disponible sobre residuos farmacéuticos en el agua potable, comenzando por su ocurrencia, destino y finalmente importancia toxicológica. La revisión presentada también presenta el problema de la detección de productos farmacéuticos y los productos ocurridos después del tratamiento del agua potable. (Caban, Bialk-Bielinska, Stepnowski, & Kumirska, 2016)

Además, también tiene la intención de proporcionar una propuesta sobre qué direcciones futuras podrían tomar los reguladores de agua potable, los gobiernos y los proveedores de agua en su difícil tarea de mejorar la disponibilidad de datos sobre el destino, el comportamiento y la ecotoxicidad de los residuos farmacéuticos en agua potable, para ser plenamente conscientes de los riesgos potenciales para los humanos por la exposición a trazas de productos farmacéuticos a través del agua potable. (Caban, Bialk-Bielinska, Stepnowski, & Kumirska, 2016)

La proliferación de ARG en el agua potable y su posible transferencia horizontal a microbios patógenos pueden provocar el fracaso de los antibióticos. Los huéspedes bacterianos de los ARG, especialmente los microbios de pequeño tamaño en el agua potable, no pueden eliminarse de manera efectiva por la desinfección por filtración con membrana y representan amenazas para la salud. Estos nuevos conocimientos sobre resistencia antibiótica de los pequeños microbios en el agua potable a gran escala indican la necesidad de monitoreo y vigilancia de los suministros de agua potable. (Ma, Li, & Tong, 2018)

## **Antibióticos en el agua y el riesgo de bacterias resistentes a los medicamentos**

Debido a la amenaza de nuevas bacterias resistentes a los medicamentos que evolucionan cuando los antibióticos entran en contacto con las bacterias presentes en el agua, los científicos están reuniendo evidencia para comprender mejor el riesgo potencial. Hay datos que confirman que los niveles de residuos de antibióticos en el agua potable son altos y representan un riesgo para la salud humana. (Hub, 2019)

Los residuos de antibióticos se pueden encontrar en niveles más altos en las aguas residuales, las aguas superficiales, la escorrentía agrícola y el agua utilizada para la acuicultura (granjas de peces, moluscos, algas y otras especies marinas). Los científicos pretenden determinar la concentración mínima de antibióticos que podría causar resistencia en las bacterias, de modo que los límites futuros se puedan basar en evaluaciones de riesgos que tengan en cuenta este potencial. (Hub, 2019)

Se destaca que el desarrollo y la propagación de la resistencia a los antimicrobianos puede verse limitada si se toman medidas para mejorar la eficacia de los procesos de tratamiento de aguas residuales y controlar el uso de antibióticos en la medicina y ganadería. Los antibióticos se recetan para una amplia gama de infecciones bacterianas en humanos y han salvado la vida de millones desde su descubrimiento. Las bacterias resistentes evolucionan regularmente en lugares donde los antibióticos se usan comúnmente, como en hospitales donde a menudo se encuentran superbacterias MRSA. (Hub, 2019)

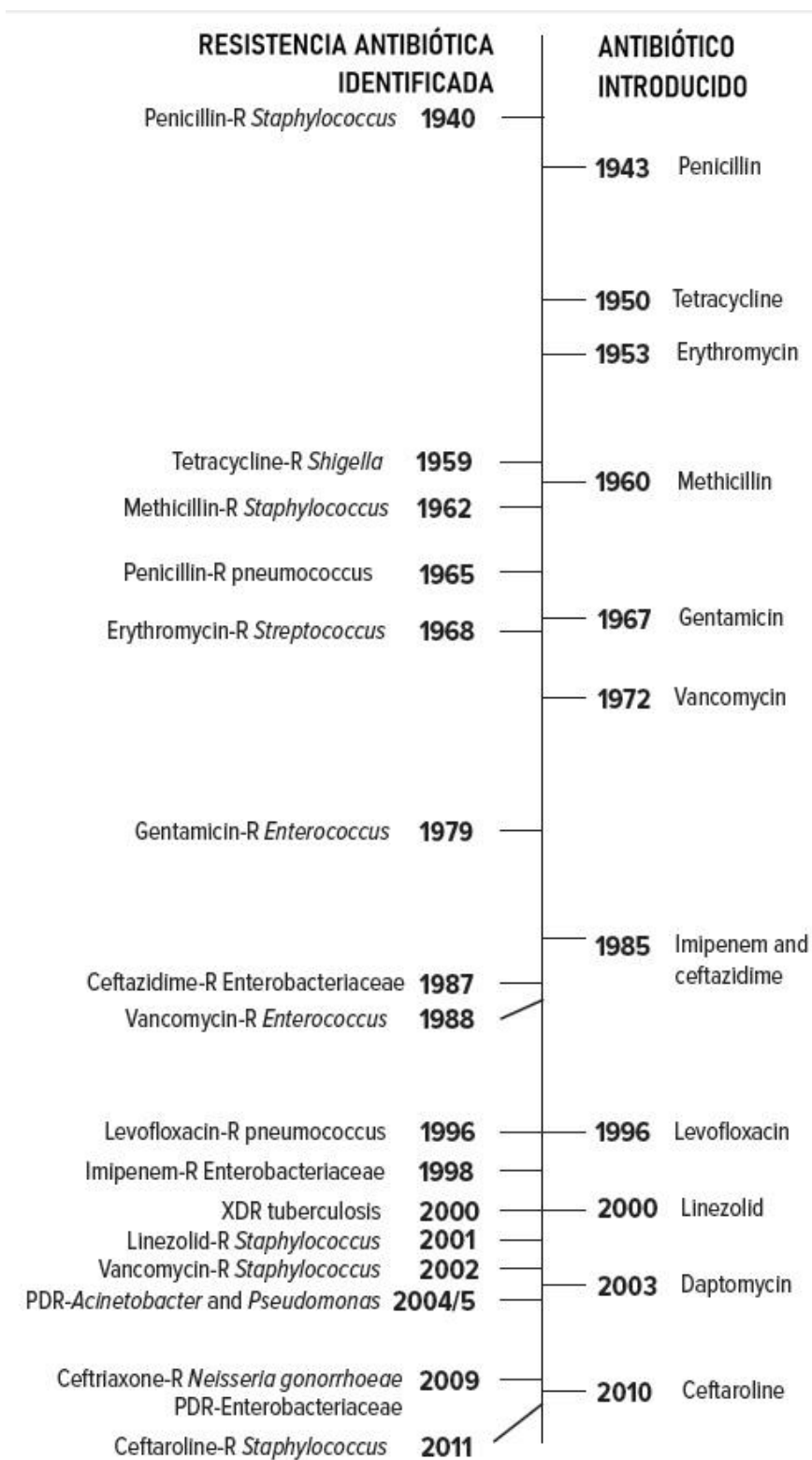
Además de esto, los antibióticos no desaparecen simplemente después de haber hecho su trabajo de combatir una infección. Se excretan del cuerpo, por lo que también existe el riesgo de que proliferen bacterias similares en el agua en las plantas de tratamiento, en el estiércol y la leche, y en el medio ambiente si la concentración de antibióticos es lo suficientemente alta como para seleccionar su supervivencia. (Hub, 2019)

La prevalencia del uso de antibióticos ha generado una creciente preocupación por la propagación de la resistencia antimicrobiana. En Europa, alrededor de 25000 personas mueren de infecciones por bacterias resistentes a los antimicrobianos cada año. También se estima que dicha resistencia le cuesta a la Unión Europea € 1.5 mil millones por año en costos de atención médica y pérdidas de productividad. (Hub, 2019)

### **Infecciones bacterianas**

El Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) ha clasificado una serie de bacterias que presentan amenazas urgentes, graves y preocupantes, muchas de las cuales ya son responsables de colocar una carga clínica y financiera sustancial en el sistema de atención médica de los Estados Unidos, los pacientes y sus familias. (Ventola, 2015)

**Figura 5** Línea temporal del desarrollo de la resistencia a los antibióticos



PDR = multiresistente; R = resistente; XDR = ampliamente resistente a los medicamentos (Ventola, 2015)

En la Figura 5 se puede observar cómo algunos microorganismos fueron adquiriendo resistencia, el primer caso de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) se identificó durante esa misma década, en el Reino Unido en 1962 y en los Estados Unidos en 1968. Desafortunadamente, finalmente se ha observado resistencia a casi todos los antibióticos que se han desarrollado. La vancomicina se introdujo en la práctica clínica en 1972 para el tratamiento de la resistencia a la meticilina tanto en *S. aureus* como en los estafilococos negativos de coagulasa. Había sido tan difícil inducir resistencia a la vancomicina que se creía poco probable que ocurriera en un entorno clínico. (Ventola, 2015)

Sin embargo, se informaron casos de resistencia a la vancomicina en estafilococos negativos de coagulasa en 1979 y 1983. Desde fines de la década de 1960 hasta principios de la década de 1980, la industria farmacéutica introdujo muchos antibióticos nuevos para resolver el problema de la resistencia, pero después de eso la línea de descubrimiento de antibióticos comenzó a secarse y se introdujeron menos medicamentos nuevos. (Ventola, 2015)

Las infecciones resistentes a los antibióticos ya están muy extendidas en los Estados Unidos y en todo el mundo. Una encuesta del 2011 de especialistas en enfermedades infecciosas, realizada por la Red de Infecciones Emergentes de IDSA (por sus siglas en inglés), descubrió que más del 60% de los participantes habían visto una infección bacteriana intrarresistente y multiresistente en el año anterior. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

Muchas organizaciones de salud pública han descrito la rápida aparición de bacterias resistentes como una "crisis" o "escenario de pesadilla" que podría tener "consecuencias catastróficas". La CDC declaró en el 2013 que la raza humana se encuentra ahora en la "era post-antibiótica", y en 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) advirtió que la crisis de resistencia a los antibióticos se está volviendo grave. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

Las bacterias multirresistentes han sido declaradas una amenaza sustancial para la salud pública y la seguridad nacional de Estados Unidos por IDSA y el Instituto de Medicina, así como por la Fuerza de Tarea Interagencial federal sobre resistencia a los antimicrobianos. Entre los patógenos grampositivos, una pandemia mundial de especies resistentes de *S. aureus* y *Enterococcus* actualmente representa la mayor amenaza. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

MRSA mata a más estadounidenses cada año que el VIH / SIDA, la enfermedad de Parkinson, el enfisema y el homicidio combinados. Los enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) y un número creciente de patógenos adicionales están desarrollando resistencia a muchos antibióticos comunes. La propagación mundial de la resistencia a los medicamentos entre los respiradores y agentes patógenos comunes, incluidos *Streptococcus pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis*, es epidémica. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

Los patógenos gramnegativos son particularmente preocupantes porque se están volviendo resistentes a casi todas las opciones de antibióticos disponibles, creando situaciones que recuerdan la era pre antibiótica. La aparición de bacilos gramnegativos multirresistentes (y cada vez más resistentes) ha afectado la práctica en todos los campos de la medicina. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

Las infecciones gramnegativas más graves ocurren en entornos de atención médica y son causadas más comúnmente por *Enterobacteriaceae* (principalmente *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter*. Los patógenos gramnegativos multirresistentes también se están volviendo cada vez más frecuentes en la comunidad. Estos incluyen *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido y *Neisseria gonorrhoeae*. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

El CDC evaluó las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos de acuerdo con siete factores: impacto clínico, impacto económico, incidencia, proyección de incidencia a 10 años, transmisibilidad, disponibilidad de antibióticos efectivos y barreras para la

prevención. En general, las amenazas urgentes o graves requieren más actividades de monitoreo y prevención, mientras que las que se consideran preocupantes requieren menos. (Golkar, Bagazra, & Pace, 2015)

### **Bacterias multirresistentes**

La aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés) es un importante problema de salud que se ha comparado en su futuro impacto global en la salud humana con el terrorismo. El uso inapropiado generalizado de antimicrobianos en la producción de alimentos (especialmente carne / mariscos, algunas frutas) se ha relacionado con la contaminación ambiental con patógenos MDR y brotes de infecciones MDR en humanos, pero la causa y efecto directo a menudo ha sido difícil de confirmar, a pesar de la fuerza de las asociaciones observadas. (McLellan, et al., 2018)

La mayoría de los programas de pruebas de alimentos para la resistencia a los antimicrobianos (AMR) se han centrado en organismos específicos (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*), Suponiendo la transferencia directa de patógenos de alimentos a humanos, en lugar de considerar la transferencia de genes resistentes entre bacterias. Además, se ha debatido el sitio óptimo de recolección de muestras (por ejemplo, animales de granja, estiércol, matadero, productos de supermercados en puntos de venta). (McLellan, et al., 2018)

Aunque muchos sitios tienen regulaciones razonablemente estrictas con respecto al uso de antimicrobianos en la agricultura, el uso de algunos agentes para la profilaxis y el tratamiento (por ejemplo, trimetoprim-sulfametoxazol, algunos betalactámicos y macrólidos) es común en algunos sectores de alimentos, de modo que esto puede tener algunas implicaciones para adquisición por parte de los consumidores de patógenos multirresistentes a través del consumo de alimentos. (McLellan, et al., 2018)

### ***Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**

Los *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) se identificaron por primera vez hace cinco décadas. Desde entonces, las infecciones por MRSA se han extendido por todo el mundo, apareciendo con una alta incidencia en varios países de Europa, América y la región Asia-Pacífico. Las infecciones por MRSA pueden ser muy graves y se encuentran entre las amenazas resistentes a los antibióticos más frecuentes. En los Estados Unidos, se han atribuido 11285 muertes por año solo al MRSA. (Prevention, 2015)

Los MRSA son resistentes a los antibióticos betalactámicos similares a la penicilina. Sin embargo, varios medicamentos aún conservan actividad contra MRSA, incluidos los glucopéptidos (por ejemplo, vancomicina y teicoplanina), linezolid, tigeciclina, daptomicina e incluso algunos betalactámicos nuevos, como ceftarolina y ceftobiprol. Sin embargo, MRSA ha demostrado una versatilidad sobresaliente en emergencias y propagación en diferentes entornos epidemiológicos a lo largo del tiempo (en hospitales, la comunidad y, más recientemente, en animales). (Prevention, 2015)

Esto agrava la epidemiología de las infecciones por MRSA y crea un desafío para los sistemas de control de infecciones que se centran solo en las infecciones asociadas a la atención médica (HAI). Además, aunque la resistencia a los agentes anti-MRSA generalmente ocurre a través de la mutación bacteriana, ha habido informes de la transferencia de resistencia a los antibióticos linezolid y glucopéptidos, lo que es motivo de gran preocupación. (Prevention, 2015)

Afortunadamente, la incidencia de infecciones por HAI MRSA parece estar disminuyendo, ya que las medidas agresivas de higiene preventiva en hospitales en algunas áreas (es decir, los Países Bajos y el Reino Unido) han tenido un efecto positivo. Entre 2005 y 2011, las tasas generales de MRSA invasivo cayeron un 31%; Los mayores descensos (alrededor del 54%) se observaron en las HAI. (Prevention, 2015)

Este resultado proporciona evidencia de que el control de infecciones puede ser altamente efectivo para limitar la propagación de MRSA. Sin embargo, durante la última década, las tasas de infecciones por MRSA adquiridas en la comunidad han aumentado rápidamente entre la población general. Si bien existe alguna evidencia de que estos aumentos están disminuyendo, no siguen las mismas tendencias a la baja que se han observado para las infecciones por SARM adquiridas en el hospital. (Prevention, 2015)

### ***Enterococos resistentes a la vancomicina***

Los Enterococos resistentes a vancomicina (VRE, por sus siglas en inglés) presentan un gran desafío terapéutico. Los enterococos causan una amplia gama de enfermedades, principalmente entre pacientes en hospitales u otros entornos de atención médica, incluidas las infecciones del torrente sanguíneo, sitio quirúrgico y tracto urinario. Las infecciones por VRE, a menudo causadas por *Enterococcus faecium* y con menos frecuencia por *Enterococcus faecalis*, tienen una prevalencia e impacto epidemiológico más bajo que el MRSA en todo el mundo. (Prevention, 2015)

Se estima que 66000 infecciones por enterococos HAI ocurren en los Estados Unidos cada año. La proporción de infecciones resistentes a la vancomicina depende de la especie. En general, 20000 (30%) de las infecciones por enterococos adquiridas en el hospital por año son resistentes a la vancomicina, lo que lleva a 1300 muertes. Pocas opciones antimicrobianas están disponibles para tratar los VRE. (Prevention, 2015)

Los antibióticos utilizados contra VRE incluyen linezolid y quinupristin / dalfopristin, mientras que el papel de la daptomicina y la tigeciclina debe definirse con más detalle. Los VRE siguen siendo una gran amenaza; en consecuencia, existe un enorme interés en desarrollar nuevos fármacos que puedan tener actividad bactericida contra los VRE, como la oritavancina. (Prevention, 2015)

### ***Streptococcus pneumoniae* resistente a los medicamentos**

*S. pneumoniae* puede causar infecciones graves y, en ocasiones, potencialmente mortales. Es una causa importante de neumonía bacteriana y meningitis, así como infecciones del torrente sanguíneo, del oído y de los senos paranasales. Las infecciones resistentes por *S. pneumoniae* complican el tratamiento médico, resultando en casi 1.2 millones de enfermedades y 7000 muertes por año. (Prevention, 2015)

La mayoría de estos casos y muertes ocurren entre adultos de 50 años de edad o mayores, con las tasas más altas entre los mayores de 65 años. *S. pneumoniae* ha desarrollado resistencia a los fármacos en la clase de penicilina y eritromicinas, como amoxicilina y azitromicina, respectivamente. También ha desarrollado resistencia a las drogas menos utilizadas. (Prevention, 2015)

En el 30% de los casos graves de *S. pneumoniae*, las bacterias son completamente resistentes a uno o más antibióticos clínicamente relevantes. Por lo general, una nueva versión de la vacuna conjugada neumocócica (PCV13), introducida en 2010, protege contra las infecciones causadas por las cepas de neumococo más resistentes, por lo que las tasas de infecciones resistentes por *S. pneumoniae* están disminuyendo. (Prevention, 2015)

De 2000 a 2009, una vacuna conjugada neumocócica anterior, PCV7, proporcionó protección contra siete cepas neumocócicas, pero PCV13 amplió esta protección a 13 cepas. El uso de esta vacuna no solo ha evitado la enfermedad neumocócica, sino que también ha reducido la resistencia a los antibióticos al bloquear la transmisión de cepas resistentes de *S. pneumoniae*. (Prevention, 2015)

### **Tuberculosis por *Mycobacterium* resistente a los medicamentos**

Las infecciones por *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos son una amenaza urgente en todo el mundo. La OMS informó que, en 2012, 170000 personas murieron por

infecciones de tuberculosis (TB) resistentes a los medicamentos. *M. tuberculosis* se transmite con mayor frecuencia a través del aire. Las infecciones causadas por esta bacteria pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero con mayor frecuencia aparecen en los pulmones. (Prevention, 2015)

De un total de 10528 casos de TB reportados en Estados Unidos. En 2011, se identificó resistencia a los antibióticos en 1042, o 9%. Los principales factores que impulsan la resistencia a los medicamentos contra la tuberculosis son el tratamiento incompleto, incorrecto o no disponible y la falta de nuevos medicamentos. En la mayoría de los casos, las infecciones de TB son tratables y curables con medicamentos disponibles de primera línea, como isoniazida o rifampicina. (Prevention, 2015)

En algunos casos, *M. tuberculosis* puede ser resistente a uno o más de estos medicamentos de primera línea. El tratamiento de la TB resistente a los medicamentos puede ser complejo, lo que requiere períodos de tratamiento más largos y medicamentos más caros que a menudo tienen más efectos secundarios. La TB altamente resistente a los medicamentos (XDR-TB) es resistente a la mayoría de los medicamentos, incluidas la isoniazida y la rifampicina, cualquier fluoroquinolonas y cualquiera de los tres medicamentos inyectables de segunda línea, es decir, amikacina, kanamicina y capreomicina. (Prevention, 2015)

Hay menos opciones de tratamiento disponibles para pacientes con XDR-TB, y los medicamentos disponibles son mucho menos efectivos. Aunque las infecciones por TB resistente a los medicamentos y la TB XDR son una amenaza creciente en todo el mundo, estas infecciones son poco comunes en los Estados Unidos debido a la implementación de un programa sólido de prevención y manejo de la infección por TB.

### ***Enterobacteriaceae* resistente a carbapenem**

Las Enterobacteriaceae resistentes a carbapenem (CRE, por sus siglas en inglés) son un grupo de bacterias que se han vuelto resistentes a "todos o casi todos" los antibióticos

disponibles, incluidos los carbapenems, que generalmente se reservan como el "tratamiento del último recurso" contra los patógenos resistentes a los medicamentos. Una enzima llamada metalo-beta-lactamasa de Nueva Delhi (NDM-1) está presente en algunas bacterias gramnegativas (especialmente *Escherichia coli* y *K. pneumoniae*) que las hace resistentes a prácticamente todos los betalactámicos, incluidos los carbapenems. (Prevention, 2015)

Las infecciones intratables o difíciles de tratar debido a las bacterias CRE están en aumento entre los pacientes en las instalaciones médicas. Se estima que cada año se producen 140000 infecciones por enterobacterias asociadas con la atención médica en los Estados Unidos; 9300 de estos son causados por CRE. Cada año, aproximadamente 600 muertes resultan de infecciones causadas por los dos tipos más comunes de CRE, especies de *Klebsiella* resistentes a carbapenem y *E. coli* resistente a carbapenem. (Prevention, 2015)

### ***Pseudomonas Aeruginosa* multirresistente**

*P. aeruginosa* es una causa común de HAI, incluidas la neumonía y el torrente sanguíneo, el tracto urinario y las infecciones del sitio quirúrgico. Más de 6000 (13%) de las 51000 infecciones de *P. aeruginosa* asociadas a la atención médica que ocurren en los Estados Unidos cada año son multirresistentes. Aproximadamente 400 muertes por año se atribuyen a estas infecciones. Se ha encontrado que algunas cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes son resistentes a casi todos los antibióticos, incluidos aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y carbapenems. (Prevention, 2015)

### ***Acinetobacter* multirresistente**

*Acinetobacter* es una bacteria gramnegativa que causa neumonía o infecciones del torrente sanguíneo, especialmente en pacientes críticos con ventilación mecánica. Algunas especies de *Acinetobacter* se han vuelto resistentes a todos o casi todos los antibióticos, incluidos los carbapenems, que a menudo se consideran el último recurso. Alrededor de 12000 infecciones de *Acinetobacter* adquiridas por el cuidado de la salud ocurren en los

Estados Unidos cada año, y 7300 (63%) de estas son multirresistentes (resistentes a al menos tres clases diferentes de antibióticos), causando 500 muertes por año. (Prevention, 2015)

### ***Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de amplio espectro**

Enterobacterias productoras de betalactamasas de amplio espectro (ESBL, por sus siglas en inglés) puede volverse resistentes a una gran variedad de antibióticos de penicilina y cefalosporina. Éstas enterobacterias causan 26000 HAI y 1700 muertes por año. Algunas de éstas enterobacterias son resistentes a casi todos los antibióticos en las clases de penicilina y cefalosporina. En tales casos, la opción de tratamiento restante es un antibiótico de la familia de carbapenem. Sin embargo, estos medicamentos deben usarse con precaución, ya que su uso contribuye a la resistencia. (Prevention, 2015)

### ***Neisseria gonorrhoeae* resistente a los medicamentos**

En los últimos años, las formas resistentes a los medicamentos de *N. gonorrhoeae*, han comenzado a surgir en los Estados Unidos, la gonorrea se caracteriza por secreción e inflamación de la uretra, cérvix, faringe o recto. Aunque normalmente no es fatal, la gonorrea se propaga fácilmente y puede causar complicaciones graves en las funciones reproductivas. (Prevention, 2015)

El CDC estima que ocurren anualmente más de 800000 casos de gonorrea, lo que la convierte en la segunda enfermedad infecciosa reportada con mayor frecuencia en los Estados Unidos en caso de que *N. gonorrhoeae* resistente a los medicamentos se generalice, se estima que causaría 75000 casos adicionales de enfermedad inflamatoria pélvica, 15000 casos de epididimitis y 222 infecciones adicionales por el virus de la inmunodeficiencia humana durante un período proyectado de 10 años. (Prevention, 2015)

*N. gonorrhoeae* resistente a las cefalosporinas a menudo es resistente a otros tipos de antibióticos, como fluoroquinolonas, tetraciclinas y penicilinas. Por lo tanto, las infecciones

causadas por estas bacterias probablemente fracasarán en los regímenes de tratamiento empírico. En respuesta a este desafío, el CDC ha actualizado sus pautas de tratamiento para recomendar ceftriaxona, además de azitromicina o doxiciclina, como el tratamiento de primera línea para la gonorrea. (Prevention, 2015)

### *Escherichia coli*

Entre las cepas resistentes a los antibióticos de las bacterias gramnegativas, las enterobacterias resistentes a los carbapenem han sido identificadas como amenazas urgentes para la salud pública; sin embargo, especies como *Escherichia coli* no se quedan de lado, ya que se han descubierto algunas cepas multirresistentes a antibióticos. Éstas resistencias a antibióticos han sido clasificadas como amenazas graves (Gidaya, et al., 2018)

Las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos son un importante problema de salud pública, y los niños y adultos en entornos de bajos recursos representan un grupo de riesgo particularmente alto. Hay pocos datos disponibles sobre la dinámica y los factores de riesgo para el transporte gastrointestinal de bacterias resistentes a los antibióticos en estas poblaciones vulnerables. (Fleece, et al., 2019)

Los perfiles de susceptibilidad a antibióticos de *Escherichia coli* aislada de muestras de heces recolectadas de niños de 6 a 60 meses inscritos en un estudio de cohorte de nacimiento en Haydom, Tanzania fueron estudiados. El transporte de *E. coli* resistente a antibióticos fue común a principios de la vida. La mayoría de *E. coli* aislado fue resistente a ampicilina (89.5%), cefazolina (88.6%) y cotrimoxazol (86.1%). También se observó resistencia a la amoxicilina / clavulanato (43.2%), ampicilina / sulbactam (21.7%), ácido nalidíxico (15.8%) y azitromicina (13.7%). (Fleece, et al., 2019)

### **Patogenia de *E. coli***

*Escherichia coli* generalmente coloniza el tracto gastrointestinal de los bebés humanos unas pocas horas después del nacimiento. Por lo general, *E. coli* y su huésped humano coexisten en buena salud y con beneficio mutuo durante décadas. Estas cepas de *E. coli* comunes rara vez causan enfermedad, excepto en huéspedes inmunocomprometidos o donde se rompen las barreras gastrointestinales normales, como en la peritonitis, por ejemplo. (Kaper, Nataro , & Mobley, 2014)

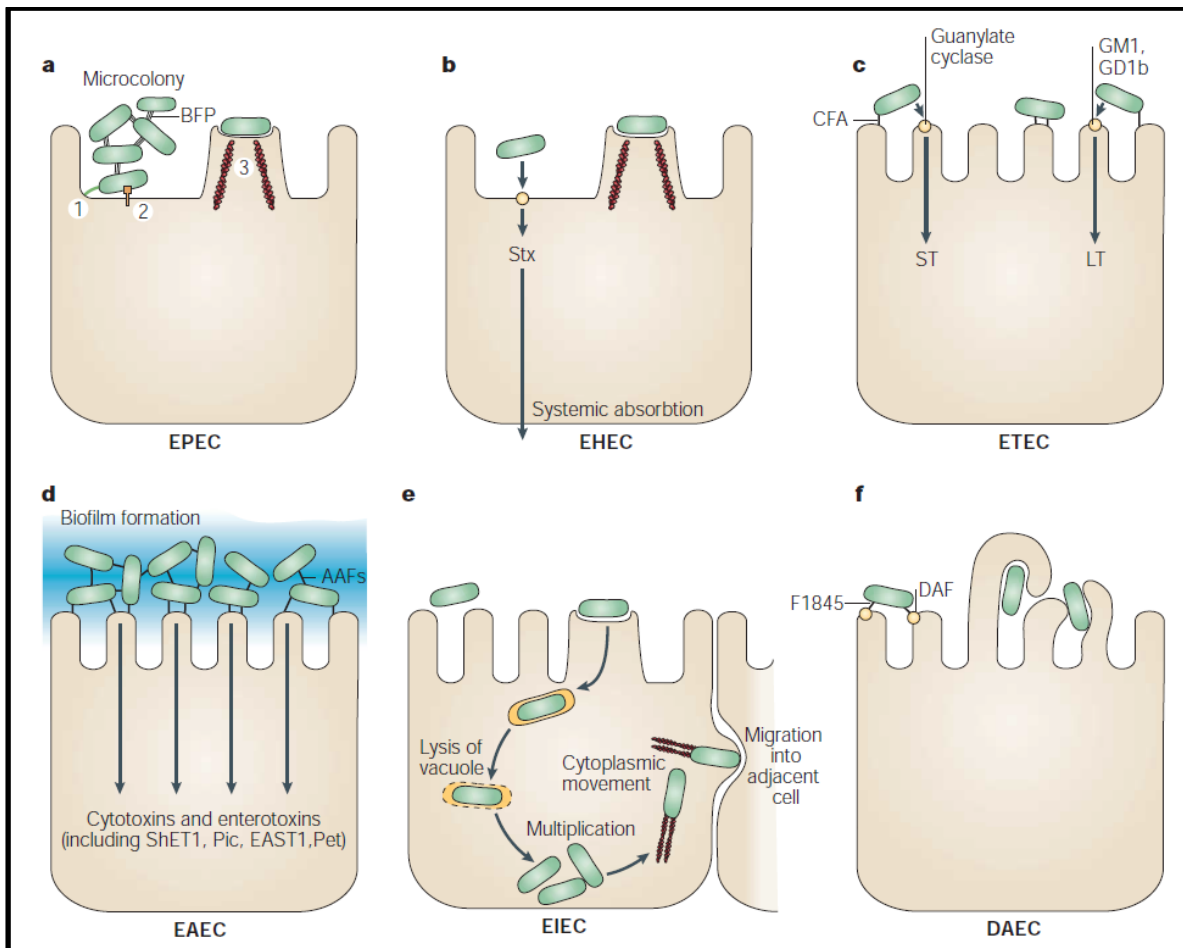
El nicho de *E. coli* comensal es la capa mucosa del colon de mamíferos. La bacteria es un competidor muy exitoso en este sitio, que comprende el anaerobio facultativo más abundante de la microflora intestinal humana. A pesar de la enorme cantidad de literatura sobre la genética y la fisiología de esta especie, los mecanismos mediante los cuales *E. coli* asegura esta simbiosis en el colon está poco caracterizada. (Kaper, Nataro , & Mobley, 2014)

Una hipótesis sugiere que *E. coli* podría utilizar gluconato en el colon de manera más eficiente que otras especies residentes, lo que le permitiría ocupar un nicho metabólico altamente específico. Sin embargo, hay varios clones de *E. coli* altamente adaptados que han adquirido atributos de virulencia específicos, lo que confiere una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos y les permite causar un amplio espectro de enfermedades. (Kaper, Nataro , & Mobley, 2014)

Estos atributos de virulencia se codifican con frecuencia en elementos genéticos que pueden mobilizarse en diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia, o en elementos genéticos que alguna vez pudieron haber sido móviles, pero que ahora han evolucionado para convertirse en secciones "bloqueadas" en el genoma. Solo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido para convertirse en "patotipos" específicos de *E. coli* que son capaces de causar enfermedades en individuos sanos. (Kaper, Nataro , & Mobley, 2014)

Tres síndromes clínicos generales pueden resultar de la infección con uno de estos patotipos: enfermedad entérica / diarreica, infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis / meningitis. Entre los patógenos intestinales hay seis categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y difusamente adherente (DAEC). (Kaper, Nataro , & Mobley, 2014)

**Figura 6 Esquema patogénico de la diarrea causada por *E. coli***



(Kaper, Nataro , & Mobley, 2014)

### *E. coli enteropatógena (EPEC)*

Grandes brotes de diarrea infantil en el Reino Unido llevaron que en 1945 se describiera un grupo de cepas de *E. coli* serológicamente distintas que se aislaron de niños con diarrea, pero no de niños sanos. Aunque los grandes brotes de diarrea infantil debidos a EPEC han desaparecido en gran medida de los países industrializados, sigue siendo una causa importante de diarrea infantil potencialmente mortal en los países en desarrollo. Durante décadas, los mecanismos por los cuales EPEC causaba diarrea eran desconocidos y este patotipo solo podía identificarse sobre la base del serotipo O:H. (Russo & Johnson, 2015)

Sin embargo, desde 1979, se han realizado numerosos avances en nuestra comprensión de la patogénesis de la diarrea EPEC, de modo que EPEC se encuentra ahora entre los mejor conocidos de todos los patógenos de *E. coli*. Una histopatología intestinal característica está asociada con las infecciones por EPEC; las bacterias se unen íntimamente a las células epiteliales intestinales y causan cambios sorprendentes en el citoesqueleto, incluida la acumulación de actina polimerizada directamente debajo de las bacterias adherentes. (Russo & Johnson, 2015)

Las microvellosidades del intestino están borradas y tienen forma de pedestal sobre las cuales las bacterias se posan frecuentemente de la célula epitelial. La capacidad de inducir esta histopatología está codificada por genes en una isla de patogenicidad llamada locus de borrados de enterocitos (LEE). Los homólogos de LEE también se encuentran en otros patógenos humanos y animales que producen la histopatología, incluidos EHEC, EPEC de conejo (REPEC) y *Citrobacter rodentium*, que induce hiperplasia de colon en ratones. (Russo & Johnson, 2015)

El LEE codifica una proteína de membrana externa llamada intimina, que media la unión íntima de EPEC a las células epiteliales. La intimina no solo funciona como un ligando para la adhesión de las células epiteliales, sino que también estimula las respuestas inmunitarias de la mucosa y la hiperplasia de la cripta intestinal. La mayoría de los marcos

de lectura de LEE codifican un sistema de secreción de tipo III, chaperonas y proteínas efectoras asociadas. (Russo & Johnson, 2015)

Una de estas proteínas efectoras, conocida como Tir (receptor de intimina translocada), se inserta en la membrana de la célula huésped, donde funciona como un receptor para la proteína de la membrana externa de la intimina. Este es un ejemplo fascinante de un patógeno que proporciona su propio receptor para unirse a las células eucarióticas, aunque también se ha informado que las proteínas eucarióticas adicionales actúan como receptores para la intimina. (Russo & Johnson, 2015)

Un estudio reciente mostró que EPEC puede alterar la polaridad celular, causando que las proteínas de la membrana basolateral, en particular las  $\beta$ -integrinas, migren a la superficie celular apical donde pueden unirse a la intimina. Además de su papel como receptor de intimina, Tir tiene importantes funciones de señalización en las células epiteliales. (Russo & Johnson, 2015)

La porción de Tir que está expuesta al citosol causa nucleación de las proteínas del citoesqueleto, uniéndose inicialmente a la proteína adaptadora Nck, que recluta el extremo amino terminal de la proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) y el complejo de la proteína relacionada con la actina 2/3 (Arp2/3); el reclutamiento de Arp2/3 da como resultado la nucleación del filamento de actina y el inicio del complejo de pedestal característico (Figura 6).

Curiosamente, la proteína Tir de EHEC O157: H7 no es funcionalmente idéntica a la proteína Tir de EPEC O127: H6 porque los pedestales se forman independientemente de Nck, lo que indica que se translocan factores bacterianos adicionales para activar la señalización de actina. Otras proteínas del citoesqueleto, como vinculina, cortactina, talina y  $\alpha$ -actinina, también se reclutan en el complejo de pedestal. (Russo & Johnson, 2015)

La formación del pedestal es un proceso dinámico por el cual la fuerza de la polimerización de actina puede impulsar el pedestal a través de la superficie de las células epiteliales ptK230. Tir también tiene un motivo GAP (proteína activadora de GTPasa) que se ha implicado en la capacidad de Tir para regular a la baja la formación de filopodios. Otra proteína efectora secretada es EspF, que causa apoptosis e induce la redistribución de la proteína occludina asociada a la unión estrecha, lo que conduce a la pérdida de resistencia eléctrica transepitelial. (Russo & Johnson, 2015)

Como se señaló anteriormente, la proteína Map afecta la función mitocondrial y la formación de filopodia, y recientemente se han descrito efectores adicionales, por ejemplo, EspG y EspH. También se han descrito factores de virulencia EPEC adicionales que están codificados fuera del LEE. Una proteína muy grande de ~385 kDa llamada linfoestatina (LifA) inhibe la activación de los linfocitos. (Russo & Johnson, 2015)

Esta proteína también está presente en cepas de EHEC, donde se conoce como Efa1, y se le ha atribuido una propiedad adhesiva. Las cepas típicas de EPEC poseen un plásmido llamado EAF (factor de adherencia EPEC). Este plásmido codifica un pilus de tipo IV llamado pilus formador de haces (BFP), que media la adherencia interbacteriana y posiblemente la adherencia a las células epiteliales. (Russo & Johnson, 2015)

También contiene el *per locus* (regulador codificado por plásmidos), cuyos productos regulan el operón *bfp* y la mayoría de los genes en el LEE por el regulador codificado por LEE (Ler). El llamado EPEC atípico contiene el LEE, pero no contiene el plásmido EAF. En los países industrializados, los EPEC atípicos se aíslan con mayor frecuencia de los casos de diarrea que los EPEC típicos que contienen el plásmido EAF, aunque los EPEC típicos dominan en los países en desarrollo. (Russo & Johnson, 2015)

Los EPEC atípicos también han causado grandes brotes de enfermedades diarreicas que afectan tanto a niños como a adultos en países industrializados. El modelo de patogénesis de EPEC es considerablemente más complejo que la simple unión a las células epiteliales por

una sola adhesina y la secreción de una enterotoxina que induce diarrea. El modelo emergente, cuyos aspectos se revisan en otros lugares, indica que EPEC inicialmente se adhiere a las células epiteliales mediante una adhesina, cuya identidad aún no está claramente establecida. (Russo & Johnson, 2015)

Los posibles candidatos incluyen BFP, el filamento de EspA, flagelos, LifA/Efa1 e intimina (por receptores de células huésped). El sistema de secreción de tipo III se activa y varias proteínas efectoras, incluidas Tir, EspF, EspG, EspH y Map, se trasladan a la célula huésped. EPEC se une a través de la interacción de intimina con Tir insertado en la membrana y numerosas proteínas del citoesqueleto se acumulan debajo de las bacterias adheridas. (Russo & Johnson, 2015)

La proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C $\gamma$ , la quinasa de cadena ligera de miosina y la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP) se activan, lo que conduce a varios efectos posteriores, incluida una mayor permeabilidad debido a las uniones estrechas aflojadas. El factor nuclear (NF)- $\kappa$ B se activa, lo que conduce a la producción de IL-8 y a una respuesta inflamatoria que implica la transmigración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) a la superficie luminal y la activación del receptor de adenosina. (Russo & Johnson, 2015)

El receptor de galanina-1 está regulado al alza, lo que aumenta la respuesta de las células epiteliales al neuropéptido galanina, que es un mediador importante de la secreción intestinal. Algunas, pero no todas, las cepas típicas de EPEC producen una enterotoxina, EspC, que aumenta la corriente de cortocircuito en el uso de cámaras. La diarrea probablemente sea el resultado de múltiples mecanismos, incluida la secreción activa de iones, el aumento de la permeabilidad intestinal, inflamación y pérdida del área de superficie de absorción resultante de la eliminación de microvellosidades. (Russo & Johnson, 2015)

### ***E. coli enterohemorrágica (EHEC)***

Reconocido por primera vez como una causa de enfermedad humana en 1982, EHEC causa diarrea con sangre (colitis hemorrágica), diarrea sin sangre y síndrome urémico hemolítico (SUH). El principal reservorio de EHEC es el tracto intestinal bovino y los brotes iniciales se asociaron con el consumo de hamburguesas poco cocidas. Posteriormente, se ha asociado una amplia variedad de alimentos con enfermedades, como salchichas, leche no pasteurizada, lechuga, melón de canasta, jugo de manzana y brotes de rábano; estos últimos fueron responsables de un brote de 8000 casos en Japón. (Varma, et al., 2016)

Facilitado por la dosis infecciosa extremadamente baja requerida para la infección (estimada en <100 células), EHEC también ha causado numerosos brotes asociados con agua potable recreativa y municipal, transmisión de persona a persona y visitas a zoológicos y granjas. Un informe reciente indica una posible transmisión en el aire después de la exposición a un edificio contaminado. (Varma, et al., 2016)

Las cepas EHEC del serotipo O157: H7 son los patógenos EHEC más importantes en Norteamérica, el Reino Unido y Japón, pero varios otros serotipos, particularmente los de los serogrupos O26 y O111, también pueden causar enfermedades y son más prominentes que O157: H7 en muchos países. El factor clave de virulencia para EHEC es Stx, que también se conoce como verocitotoxina (VT). (Varma, et al., 2016)

Stx consta de cinco subunidades B idénticas que son responsables de unir la holotoxina a la globotriaosilceramida de glucolípidos (Gb3) en la superficie de la célula objetivo, y una subunidad A única que escinde el ARN ribosómico, lo que hace que cese la síntesis de proteínas. La familia Stx contiene dos subgrupos, Stx1 y Stx2, que comparten aproximadamente el 55% de homología de aminoácidos. (Varma, et al., 2016)

Stx se produce en el colon y viaja por el torrente sanguíneo al riñón, donde daña las células endoteliales renales y ocluye la microvasculatura a través de una combinación de

toxicidad directa e inducción de la producción local de citocinas y quimiocinas, lo que resulta en inflamación renal. Este daño puede conducir al SUH, que se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda potencialmente mortal. (Varma, et al., 2016)

Stx también induce apoptosis en las células epiteliales intestinales, un proceso que está regulado por la familia Bcl-2. Stx se purificó por primera vez de *Shigella dysenteriae*, y el SUH también puede ser el resultado de la infección con esta especie, aunque no con otras especies de *Shigella* o EIEC, que no producen Stx. También media el daño local en el colon, lo que resulta en diarrea con sangre, colitis hemorrágica, necrosis y perforación intestinal. (Varma, et al., 2016)

Además de Stx, la mayoría de las cepas EHEC también contienen la isla de patogenicidad LEE que codifica un sistema de secreción de tipo III y proteínas efectoras que son homólogas a las producidas por EPEC. Los modelos animales han demostrado la importancia de la adhesina de intimina en la colonización intestinal, y los pacientes con SUH desarrollan una fuerte respuesta de anticuerpos contra la intimina y otras proteínas codificadas por LEE. Se cree que EHEC O157: H7 evolucionó a partir de cepas EPEC O55 que contienen LEE que adquirieron bacteriófagos que codifican Stx. (Varma, et al., 2016)

Aunque más de 200 serotipos de *E. coli* pueden producir Stx, la mayoría de estos serotipos no contienen la isla de patogenicidad LEE y no están asociados con enfermedades humanas. Esto ha llevado al uso de *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) o *E. coli* productora de verotoxina (VTEC) como términos generales para cualquier cepa de *E. coli* que produce Stx, y el término EHEC se usa para denotar solo el subconjunto de cepas positivas para Stx que también contienen el LEE. (Varma, et al., 2016)

Sin embargo, hay cepas STEC LEE negativas que están asociadas con la enfermedad, por ejemplo, cepas O103: H21, lo que demuestra que todavía hay factores de virulencia adicionales por caracterizar. Se han descrito varios otros factores de adherencia potenciales

para las cepas O157: H7 y / o no O157: H7, aunque la importancia de estos factores en la enfermedad humana no está tan bien establecida como la intimina. (Varma, et al., 2016)

Una adhesina potencial es una proteína grande de 362 kDa (ToxB) codificada en el plásmido de 93 kb que está presente en O157: H7 y otras cepas de EHEC. Esta proteína comparte similitud de secuencia con la gran familia de toxina Clostridium y con la proteína EPEC LifA y la proteína Efa-1 que se ha implicado como una adhesina en cepas EHEC no O157: H7. (Varma, et al., 2016)

Este plásmido (pO157), también codifica una toxina RTX (repeticiones en la toxina) que es similar a la hemolisina UPEC, una serina proteasa (EspP), una catalasa y la proteína StcE. Ésta escinde el inhibidor de la C1 esterasa (C1-INH) de la vía del complemento y podría contribuir al daño tisular, el edema intestinal y las anomalías trombóticas que se observan en las infecciones por EHEC. (Varma, et al., 2016)

La secuencia del genoma de O157: H7 reveló numerosas islas cromosómicas que codifican factores de virulencia potenciales adicionales. Se incluyen entre estos factores potenciales los nuevos sistemas de fimbrias, absorción de hierro y utilización, y una ureasa que es similar a las producidas por Klebsiella y otros patógenos del tracto urinario. (Varma, et al., 2016)

### ***E. coli enterotoxigénica (ETEC)***

ETEC causa diarrea acuosa, que puede variar desde una enfermedad leve y autolimitada hasta una enfermedad grave por purga. El organismo es una causa importante de diarrea infantil en el mundo en desarrollo y es la principal causa de diarrea en viajeros a países en desarrollo. ETEC coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado y elabora enterotoxinas, que dan lugar a la secreción intestinal. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

La colonización está mediada por uno o más factores proteicos de colonización fibrilar o fibrilar (CF), designados por CFA (antígeno de factor de colonización), CS (antígeno de superficie de coli) o PCF (factor de colonización putativo) seguido de un número. Se han caracterizado más de 20 FQ antigénicamente diversas, pero los estudios epidemiológicos indican que aproximadamente el 75% de los ETEC humanos expresan CFA / I, CFA / II o CFA / IV. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

Los anticuerpos contra los CFA podrían mejorar la colonización y la enfermedad de ETEC. Las ETEC también son una causa importante de enfermedad diarreica en animales y estas cepas animales expresan factores de colonización intestinal fimbrial, como K88 y K99, que no se encuentran en las cepas ETEC humanas. Las enterotoxinas ETEC pertenecen a uno de dos grupos: las enterotoxinas termolábiles (LT) y las enterotoxinas termoestables (ST). (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

Las cepas ETEC pueden expresar solo un LT, solo un ST, o ambos LT y ST. Los LT son una clase de enterotoxinas que están estrechamente relacionadas en estructura y función con la enterotoxina del cólera (CT), que se expresa por *Vibrio cholerae*. El LT que se encuentra predominantemente en aislados humanos (LT-I; una proteína relacionada llamada LT-II se encuentra en algunos animales aislados ETEC) tiene ~ 80% de identidad de aminoácidos con CT y, como CT, consta de una sola subunidad A y cinco subunidades B idénticas. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

Las subunidades B median la unión de la holotoxina a los gangliósidos de la superficie celular GM1 y GD1b, y la subunidad A es responsable de la actividad enzimática de la toxina. LT tiene actividad ADP-ribosil transferasa y transfiere un resto ADP-ribosil desde NAD a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G estimuladora, una proteína reguladora de la membrana basolateral que regula la adenilato ciclasa. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

La activación permanente resultante de adenilato ciclasa conduce a mayores niveles de AMPc intracelular, activación de quinasas dependientes de AMPc y activación del canal principal de cloruro de las células epiteliales: el regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR). El resultado neto de la fosforilación de CFTR es el aumento de la secreción de Cl de las células secretoras de la cripta, lo que conduce a diarrea. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

LT también puede estimular la síntesis de prostaglandinas y estimular el sistema nervioso entérico; ambas actividades también pueden conducir a la estimulación de la secreción y la inhibición de la absorción. LT también es un potente adyuvante de la mucosa independiente de su actividad tóxica y se ha incorporado a numerosos candidatos a vacunas que contienen una variedad de antígenos, lo que resulta en un aumento de las respuestas de anticuerpos a estos antígenos cuando se administran por vía oral, nasal o incluso transdérmica. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

Los ST son pequeñas toxinas de un solo péptido que incluyen dos clases no relacionadas, STa y STb, que difieren tanto en la estructura como en el mecanismo de acción. Solo las toxinas de la clase STa se han asociado con la enfermedad humana. La toxina STa madura es un péptido de ~ 2 kDa, que contiene 18 o 19 residuos de aminoácidos, seis de los cuales son cisteínas que forman tres puentes disulfuro intramoleculares. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

El principal receptor de STa es una guanilato ciclasa que atraviesa la membrana; la unión de STa a la guanilato ciclasa estimula la actividad de la guanilato ciclasa, lo que lleva a un aumento de la cGMP intracelular, que, a su vez, activa las cinasas dependientes de cGMP y / o dependientes de cAMP y, en última instancia, aumenta la secreción. Curiosamente, la guanilato ciclasa intestinal es el receptor de un ligando endógeno llamado guanilina, que tiene una estructura similar a la de STa. Entonces, la familia ST parece representar un caso de mimetismo molecular. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

La toxina STb está asociada con la enfermedad animal y es un péptido de 48 aminoácidos que contiene dos enlaces disulfuro, STb puede elevar las concentraciones citosólicas de  $Ca^{2+}$ , estimular la liberación de prostaglandina E2 y estimular la liberación de serotonina, todos los cuales son mecanismos que podrían conducir a una mayor secreción de iones. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

ETEC es en gran medida un patógeno de los países en desarrollo, y es bien sabido que estos países suelen tener una baja tasa de cáncer de colon. Se ha informado que STa suprime la proliferación de células de cáncer de colon a través de una cascada de señalización mediada por guanilil ciclasa C. Por lo tanto, la alta prevalencia de ETEC en los países en desarrollo podría tener un efecto protector contra esta importante enfermedad, e indica que las enfermedades infecciosas pueden existir en un complejo equilibrio evolutivo con sus poblaciones humanas. (Steiner, Nataro, Poteet-Smith, Smith, & Guerrant, 2015)

### ***E. coli enteroagregativa (EAEC)***

EAEC se reconoce como una causa de diarrea a menudo persistente en niños y adultos, se ha identificado como la causa de varios brotes en todo el mundo. En la actualidad, los EAEC se definen como *E. coli* que no secretan LT o ST y que se adhieren a las células HEp-2 en un patrón conocido como autoagregativo, en el que las bacterias se adhieren entre sí en una configuración de "ladrillo apilado". (Tapping, Akashi, Miyake, Godowski, & Tobias, 2016)

Es probable que esta definición abarque clones tanto patógenos como no patógenos, y sigue siendo controvertido si todos los EAEC tienen factores comunes que contribuyan a su fenotipo de adherencia compartida. Sin embargo, al menos un subconjunto de EAEC son patógenos humanos probados. La estrategia básica de la infección por EAEC parece comprender la colonización de la mucosa intestinal, probablemente predominantemente la del colon, seguida de la secreción de enterotoxinas y citotoxinas. (Tapping, Akashi, Miyake, Godowski, & Tobias, 2016)

Los estudios sobre explantes intestinales humanos indican que EAEC induce un daño leve pero significativo en la mucosa, estos efectos son más severos en las secciones de colon. Se observan cambios inflamatorios leves en modelos animales y la evidencia indica que al menos algunas cepas de EAEC podrían ser capaces de invasión limitada de la superficie de la mucosa. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

El hallazgo histopatológico más dramático en modelos animales infectados es la presencia de una gruesa capa de bacterias autoagregatorias que se adhieren libremente a la superficie de la mucosa. Las cepas prototipo EAEC se adhieren a las células HEp-2 y a la mucosa intestinal en virtud de las estructuras fimbriales conocidas como fimbrias de adherencia agregativa (AAF), que están relacionadas con la familia de adhesinas Dr. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Existen al menos cuatro variantes alélicas de AAF, pero lo más importante es que cada una está presente solo en una minoría de cepas. Cabe señalar, sin embargo, que no todas las cepas EAEC se adhieren en virtud de los AAF. Una proteína recientemente descrita llamada dispersina forma una capa débilmente asociada en la superficie de las cepas EAEC y parece contrarrestar los fuertes efectos de agregación de la adhesina AAF, quizás facilitando la propagación a través de la superficie mucosa o la penetración de la capa mucosa. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Una estructura superficial adicional que está potencialmente involucrada en causar inflamación es una proteína flagelina EAEC novedosa que induce la liberación de IL-8. La liberación de esta citocina puede estimular la transmigración de neutrófilos a través del epitelio, lo que a su vez puede provocar la interrupción de los tejidos y la secreción de líquidos. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Se han descrito varias toxinas para EAEC. Dos de estas toxinas están codificadas por el mismo locus cromosómico en las cadenas opuestas. El gen más grande codifica una

proteasa autotransportadora con actividad de mucinasa llamada Pic; la cadena opuesta codifica la enterotoxina oligomérica que se conoce como *Shigella* enterotoxina 1 (ShET1), debido a su presencia en la mayoría de las cepas de *Shigella flexneri* 2a. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Aún no se conoce el modo de acción de ShET1, pero podría contribuir a la diarrea secretora que acompaña a la infección por EAEC y *Shigella*. Una segunda presente en muchas cepas de EAEC es la *E. coli* ST enteroagregativa (EAST1), un homólogo de 38 aminoácidos de la toxina STEC de ETEC. EAST1 podría contribuir a la diarrea acuosa en cepas positivas para EAST1; sin embargo, el gen EAST1 (*astA*) también se puede encontrar en muchos aislamientos de *E. coli* comensales y, por lo tanto, el papel de EAST1 en la diarrea sigue siendo desconocido. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Muchas cepas de EAEC secretan una toxina autotransportadora llamada Pet, que está codificada en el plásmido de virulencia grande en las proximidades del gen que codifica el AAF. Pet tiene actividad enterotóxica y también puede conducir a cambios en el citoesqueleto y redondeo de las células epiteliales mediante la escisión de la espectrina de la proteína del citoesqueleto. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Aunque ningún factor de virulencia único se ha asociado irrefutablemente con la virulencia de EAEC, los estudios epidemiológicos implican un "paquete" de factores de virulencia transmitidos por plásmidos y cromosomas, similar a los factores de virulencia de otros patógenos entéricos. Varios factores de virulencia están regulados por un solo activador transcripcional llamado AggR, que es miembro de la familia AraC de activadores transcripcionales. Una observación consistente de los estudios que involucran epidemiología EAEC es la asociación del regulador AggR con la enfermedad diarreica. (Tapping, Akashi, Miyake , Godowski, & Tobias, 2016)

Recientemente se ha demostrado que la presencia de genes asociados con el regulón AggR es predictivo de concentraciones significativamente mayores de IL-8 e IL-1 fecales en

pacientes con diarrea causada por EAEC. Se sugiere que el término “EAEC típico” debería reservarse para las cepas que portan AggR y al menos un subconjunto de genes regulados por AggR (para los cuales la sonda EAEC tradicional es un marcador adecuado), y que el término 'EAEC atípico' se use para cepas que carecen del regulador AggR. (Tapping, Akashi, Miyake, Godowski, & Tobias, 2016)

### ***E. coli enteroinvasiva (EIEC)***

Las EIEC están estrechamente relacionadas bioquímica, genética y patógena con *Shigella spp.* Numerosos estudios han demostrado que *Shigella* y *E. coli* son taxonómicamente indistinguibles a nivel de especie, pero, debido a la importancia clínica de *Shigella*, aún se mantiene una distinción de nomenclatura. Las cuatro especies de *Shigella* que son responsables de la enfermedad humana, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *Shigella sonnei* y *Shigella boydii*, causan diversos grados de disentería, que se caracteriza por fiebre, calambres abdominales y diarrea que contiene sangre y mucosa. (Sansoneetti, 2012)

La EIEC puede causar una colitis inflamatoria invasiva y ocasionalmente disentería, pero en la mayoría de los casos, la EIEC provoca diarrea acuosa que no se puede distinguir debido a la infección por otros patógenos de *E. coli*. EIEC se distingue de *Shigella* por algunas pruebas bioquímicas menores, pero estos patotipos comparten factores de virulencia esenciales. (Sansoneetti, 2012)

Se cree que la infección por EIEC representa una colitis inflamatoria, aunque muchos pacientes parecen manifestar un síndrome secretor del intestino delgado. La fase temprana de la patogenia de EIEC / *Shigella* comprende la penetración de las células epiteliales, seguida de la lisis de la vacuola endocítica, la multiplicación intracelular, el movimiento direccional a través del citoplasma y la extensión a las células epiteliales. (Sansoneetti, 2012)

El movimiento dentro del citoplasma está mediado por la nucleación de actina celular en una "cola" que se extiende desde un polo de la bacteria. Además de la invasión y

diseminación dentro de las células epiteliales, *Shigella* (y presumiblemente EIEC) induce apoptosis en macrófagos infectados. Los genes que se requieren están presentes en un gran plásmido de virulencia que se encuentra en EIEC y en todas las especies de *Shigella*. (Sansoneetti, 2012)

La secuencia del plásmido de virulencia de 213 kb de *S. flexneri* (pWR100) indica que este plásmido es un mosaico que incluye elementos genéticos que inicialmente fueron transportados por cuatro plásmidos. Un tercio del plásmido está compuesto por elementos de secuencia de inserción (IS), que sin duda son importantes en la evolución del plásmido de virulencia. (Sansoneetti, 2012)

Este plásmido codifica un sistema de secreción de tipo III y una proteína de membrana externa de 120 kDa llamada IcsA, que nuclea la actina mediante la unión de N-WASP. El crecimiento de los microfilamentos de actina en un solo polo bacteriano induce el movimiento del organismo a través del citoplasma de las células epiteliales. Este movimiento culmina en la formación de protuberancias celulares que son absorbidas por las células vecinas, después de lo cual se repite el proceso. Aunque los EIEC son invasivos, la diseminación del organismo más allá de la submucosa es rara. (Sansoneetti, 2012)

Gran parte de la patogenia de EIEC / *Shigella* parece ser el resultado de los múltiples efectos de su sistema de secreción de tipo III transmitido por plásmidos. Este sistema de secreción tipo III secreta múltiples proteínas, como IpaA, IpaB, IpaC e IpgD, que median eventos de señalización epitelial, reordenamientos del citoesqueleto, captación celular, lisis de la vacuola endocítica y otras acciones. (Sansoneetti, 2012)

El aparato del sistema de secreción tipo III, que está codificado por genes *mxi* y *spa*, permite la inserción de un poro que contiene proteínas IpaB e IpaC en las membranas de las células huésped. Además de la formación de poros, IpaB se une a la proteína de señalización CD44, lo que desencadena los reordenamientos del citoesqueleto y la entrada de células, y la unión a la caspasa 1 de macrófagos, lo que resulta en apoptosis y liberación de IL-1 de los

macrófagos. IpaC induce la polimerización de actina, que conduce a la formación de extensiones celulares al activar las GTPasas Cdc42 y Rac. (Sansoneetti, 2012)

La actividad de polimerización de actina reside en el terminal carboxilo de IpaC, mientras que el terminal amino de esta proteína está involucrado en extensiones lamelipodiales. Por el contrario, IpaA se une a la vinculina e induce la despolimerización de actina, lo que ayuda a organizar las extensiones inducidas por IpaC en una estructura que permite la entrada bacteriana. (Sansoneetti, 2012)

La proteína efectora translocada IpgD es una potente inositol 4-fosfatasa que ayuda a reorganizar la morfología de la célula huésped al desacoplar la membrana plasmática celular del citoesqueleto de actina, se forman ampollas en la membrana. Aunque el sistema de secreción tipo III ampliamente caracterizado es esencial para la invasividad de las especies EIEC y *Shigella*. (Sansoneetti, 2012)

### ***E. coli difusamente adherente (DAEC)***

Los DAEC se definen por la presencia de un patrón de adhesión característico y difuso a las monocapas de células HEp-2. DAEC ha sido implicado como causa de diarrea en varios estudios, particularmente en niños > 12 meses de edad. Aproximadamente el 75% de las cepas DAEC producen una adhesina fimbrial llamada F1845 o una adhesina relacionada; F1845 pertenece a la familia de adhesinas Dr, que utilizan DAF, una proteína anclada a la glucosilfosfatidilinositol de la superficie celular, que normalmente protege a las células del daño por el sistema del complemento, como receptor. (Darfeuille-Michaud, 2015)

Las cepas DAEC inducen un efecto citopático que se caracteriza por el desarrollo de largas extensiones celulares, que se envuelven alrededor de las bacterias adherentes (Figura 6). Este efecto característico requiere la unión y agrupación del receptor DAF por el *Dr. fimbriae*. Todos los miembros de la familia Dr (incluidos UPEC y la cepa DAEC C1845) provocan este efecto. (Darfeuille-Michaud, 2015)

La unión de las adhesinas Dr se acompaña de la activación de cascadas de transducción de señales, incluida la activación de PI-3 quinasa. Se ha informado que la infección de una línea celular intestinal por cepas de DAEC perjudica las actividades y reduce la abundancia de sacarasa isomaltasa y dipeptidilpeptidasa IV asociadas al borde en cepillo. (Darfeuille-Michaud, 2015)

Este efecto es independiente de la vía asociada a DAF descrita anteriormente y, por lo tanto, proporciona un mecanismo factible para la enfermedad entérica inducida por DAEC y también indica la presencia de factores de virulencia en DAEC distintos de las adhesinas, se ha propuesto que DAEC podría inducir la expresión de MICA por las células epiteliales intestinales, lo que indica que la infección por DAEC podría ser proinflamatoria; Este efecto podría ser potencialmente importante en la inducción de enfermedades inflamatorias del intestino. (Darfeuille-Michaud, 2015)

### ***E. coli uropatógena (UPEC)***

El tracto urinario se encuentra entre los sitios más comunes de infección bacteriana y *E. coli* es el agente infeccioso más común en este sitio. El subconjunto de *E. coli* que causa cistitis no complicada y pielonefritis aguda es distinto de las cepas comensales de *E. coli* que comprenden la mayoría de las *E. coli* que pueblan el colon inferior de los humanos. (Welch, et al., 2012)

*E. coli* de un pequeño número de serogrupos O (seis grupos O causan el 75% de las infecciones urinarias) tienen fenotipos que se asocian epidemiológicamente con cistitis y pielonefritis aguda en el tracto urinario normal, que incluyen la expresión de *P. fimbriae*, hemolisina, aerobactina, resistencia al suero y encapsulación. Se han identificado grupos clonales y cepas epidémicas asociadas con infecciones urinarias. (Welch, et al., 2012)

Aunque muchos aislamientos de ITU parecen ser clonales, no existe un único perfil fenotípico que cause las ITU. Las adhesinas específicas, como P (Pap), tipo 1 y otras fimbrias (como F1C, S, M y Dr), parecen ayudar en la colonización. Se producen varias toxinas, incluida la hemolisina, el factor necrotizante citotóxico y una proteasa autotransportada conocida como Sat. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

Estos factores de virulencia se encuentran en diferentes porcentajes entre varios subgrupos de UPEC. Las cepas uropatógenas poseen islas de patogenicidad grandes y pequeñas que contienen bloques de genes que no se encuentran en el cromosoma de las cepas fecales. La disponibilidad de la secuencia del genoma de *E. coli* CFT073 y los esfuerzos de otros investigadores para identificar genes de virulencia mediante mutagénesis etiquetada por firma y otros métodos han permitido el desarrollo de un modelo de patogénesis para UPEC. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

Es probable que la infección comience con la colonización del intestino con una cepa uropatógena además de la flora comensal. Esta cepa, en virtud de factores que están codificados en las islas de patogenicidad, es capaz de infectar a un huésped inmunocompetente, ya que coloniza el área periuretral y asciende la uretra hasta la vejiga. Entre 4 y 24 horas después de la infección, el nuevo entorno en la vejiga selecciona la expresión de fimbrias tipo 1, que tiene un papel importante temprano en el desarrollo de una infección urinaria. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

La *E. coli* fimbriada tipo 1 se adhiere a los restos de manosa de los receptores de uroplakin que recubren las células epiteliales de transición. Esto desencadena apoptosis y exfoliación; para al menos una cepa, la invasión del epitelio de la vejiga se acompaña con la formación de protuberancias en forma de vaina en la superficie de la vejiga que contienen bacterias encerradas en una matriz rica en polisacáridos rodeada por una capa de uroplakin. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

Se argumenta que las células epiteliales invadidas que contienen una bio-película bacteriana fuertemente compactada podrían actuar como reservorio de la infección recurrente y, de hecho, en algunos casos de infección recurrente, se encuentra el mismo serotipo. Sin embargo, varios estudios han identificado diferentes serotipos como responsables de la infección recurrente, una observación que no es consistente con esta hipótesis. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

La adquisición de hierro y la capacidad de crecer en la orina también son cruciales para la supervivencia. En las cepas que causan cistitis, las fimbrias tipo 1 se expresan continuamente y la infección se limita a la vejiga. En las cepas de pielonefritis, el elemento invertible que controla la expresión de las fimbrias tipo 1 cambia a la posición de "apagado" y las fimbrias tipo 1 están menos bien expresadas. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

Se podría argumentar que esto libera la cepa de *E. coli* de los receptores de las células epiteliales de la vejiga y permite que el organismo ascienda a través de los uréteres hasta los riñones, donde el organismo puede unirse por fimbrias P a los receptores digalactósidos que se expresan en el epitelio del riñón. En esta etapa, la hemolisina podría dañar el epitelio renal y, junto con otros productos bacterianos, incluido LPS, una respuesta inflamatoria aguda recluta PMN en el sitio. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

También se ha demostrado que la hemolisina induce oscilaciones de  $Ca^{2+}$  en las células epiteliales renales, lo que resulta en una mayor producción de IL-6 e IL-8. La secreción de Sat, una citotoxina en vacío, daña los glomérulos y es citopática para el epitelio circundante. En algunos casos, la barrera que proporcionan los túbulos proximales con un grosor de una célula puede romperse y las bacterias pueden penetrar en la célula endotelial para ingresar al torrente sanguíneo, lo que conduce a bacteriemia. (Kuehn , Heuser, Normark, & Hultgren, 2016)

### ***E. coli asociada a meningitis / sepsis (MNEC)***

Este patotipo de *E. coli* es la causa más común de meningitis neonatal gram negativa, con una tasa de letalidad de 15 a 40% y defectos neurológicos graves en muchos de los sobrevivientes. La incidencia de lactantes con sepsis de inicio temprano debido a la infección por *E. coli* parece estar aumentando, mientras que la infección por organismos Gram-positivos disminuye. (Welch, et al., 2012)

Al igual que con los patotipos de *E. coli* que tienen una base genética bien definida para la virulencia, las cepas que causan meningitis están representadas por solo un número limitado de serogrupos O, y el 80% de las cepas son del tipo de cápsula K1. Una diferencia interesante entre MNEC y *E. coli* que causan infecciones del tracto intestinal o urinario es que, aunque estas últimas cepas pueden transmitirse fácilmente por orina o heces, la infección del sistema nervioso central no ofrece una ventaja obvia para la selección y transmisión de virulentos. Cepas MNEC. (Welch, et al., 2012)

Las *E. coli* que causan meningitis se propagan por hematogenia. Los niveles de bacteriemia se correlacionan con el desarrollo de meningitis; por ejemplo, las bacteriemias de  $>10^3$  unidades formadoras de colonias por ml de sangre son significativamente más propensas a desarrollar meningitis que en individuos con unidades formadoras de colonias más bajas por ml en su sangre. (Welch, et al., 2012)

Estas bacterias se traslocan de la sangre al sistema nervioso central sin daño aparente a la barrera hematoencefálica, lo que indica un proceso de transcitosis. Las micrografías electrónicas implican la entrada mediante un mecanismo de cierre en un proceso que no afecta la resistencia eléctrica transendotelial. Esto indica que la membrana de la célula huésped no se rompe significativamente durante la entrada de la bacteria. (Welch, et al., 2012)

Se han desarrollado dos modelos para estudiar MNEC: una monocapa de células endoteliales microvasculares cerebrales y un modelo animal intacto con ratas de 5 días de edad. En cuanto a otros patotipos de *E. coli*, los genomas de estas cepas extraintestinales K1 tienen genes adicionales que no se encuentran en las cepas comensales de *E. coli* K-12. En las comparaciones genómicas, se encontró que el genoma de *E. coli* RS218, una cepa asociada a meningitis, tenía al menos 500 kb de genes adicionales insertados en al menos 12 loci en comparación con *E. coli* K-12. (Welch, et al., 2012)

Además, la cepa RS218 alberga un plásmido de 100 kb, en el que se ha localizado al menos un factor de virulencia. Se han obtenido algunas ideas sobre el mecanismo de patogénesis de estas cepas. Las cepas K1 usan fimbrias S para unirse a las superficies lumbinales del endotelio microvascular cerebral en ratas neonatales. La invasión requiere que la proteína OmpA de la membrana externa se una al epítipo GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc de la glicoproteína del receptor de células endoteliales microvasculares del cerebro. (Welch, et al., 2012)

También se requieren otras proteínas de membrana (por ejemplo, IbeA, IbeB, IbeC y AslA) para la invasión. La invasión se correlaciona con el crecimiento microaerobio y la suplementación con hierro. Se requiere CNF1 para la invasión, al igual que la cápsula K1, que provoca resistencia al suero y tiene propiedades antifagocíticas. En un modelo experimental, las cepas que expresan las proteínas de la cápsula K1 y las que no pudieron cruzar la barrera hematoencefálica, pero solo sobrevivieron las cepas que expresan K1. (Welch, et al., 2012)

Como consecuencia de la invasión, se produce un reordenamiento del citoesqueleto de actina y se induce la fosforilación de tirosina de la quinasa de adhesión focal (FAK) y la paxilina. Además, se compiló una lista sustancial de genes *in vivo* inducidos, incluidos los que codifican sistemas de adquisición de hierro, utilizando tecnología de expresión *in vivo* (IVET) junto con un modelo murino de infección septicémica. (Welch, et al., 2012)

### ***Otros posibles patotipos de E. coli***

Se han descrito varios otros posibles patotipos de *E. coli*, pero ninguno de ellos está tan bien establecido como los descritos anteriormente. Entre los más interesantes están las cepas de *E. coli* que están asociadas con la enfermedad de Crohn, que se conoce como *E. coli* invasiva adherente (AIEC). Aún no se han descrito secuencias genéticas únicas para las cepas AIEC, pero tales cepas pueden invadir y replicarse dentro de los macrófagos sin inducir la muerte de la célula huésped y pueden inducir la liberación de altas cantidades de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ . (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

Esta es una característica que podría conducir a la inflamación intestinal que es característica de la enfermedad de Crohn. Un proceso inflamatorio, junto con la necrosis del epitelio intestinal, son características de la enterocolitis necrotizante (NEC), una causa importante de mortalidad y morbilidad a largo plazo en los recién nacidos prematuros. Se ha hipotetizado que la capacidad de algunas cepas de *E. coli* para transitar a través de monocapas de células epiteliales contribuye al NEC. (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

La *E. coli* necrotóxica (NTEC) produce CNF1 o CNF2 y se ha asociado con enfermedades tanto en humanos como en animales. Las cepas que se conocen como *E. coli* de desprendimiento de células (CDEC) se han aislado de niños con diarrea y la capacidad característica de estas cepas de separar células epiteliales cultivadas de vidrio o plástico se ha asociado con la producción de hemolisina. (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

Las relaciones entre las cepas asociadas a NEC, NTEC y CDEC, aún no se han establecido claramente. Los genes que codifican CDT están presentes con poca frecuencia en cepas de *E. coli* y todavía no se ha encontrado una asociación significativa con la enfermedad para esta toxina. La CDT generalmente se encuentra en cepas que poseen otros

factores de virulencia, como CNF, Stx y LEE. (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

Sin embargo, la información reciente indica que CDT puede ser codificado por cuatro variantes genéticas distintas en *E. coli* y, por lo tanto, los estudios epidemiológicos anteriores que usan solo uno o dos genes CDT como sondas deben ser reevaluados. En al menos una cepa, los genes CDT están contenidos en un bacteriófago, lo que podría explicar la presencia de esta toxina en varios patotipos de *E. coli* diferentes. (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

Un subconjunto mal caracterizado de infecciones por *E. coli* fuera del tracto gastrointestinal o urinario es un grupo implicado en infecciones intraabdominales (IAI), que incluyen abscesos, heridas, apendicitis y peritonitis. La microflora inicial en el sitio de un IAI es polimicrobiana, pero *E. coli* y el *Bacteroides fragilis* estrictamente anaeróbico a menudo se aíslan de estos abscesos. (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

Un estudio reciente indica que una nueva proteína de unión al grupo hemo, conocida como proteasa de unión a la hemoglobina (Hbp), está significativamente asociada con cepas de *E. coli* aisladas de IAI. Se demostró que la Hbp purificada es capaz de suministrar hemo a *B. fragilis*, indica una sinergia en la formación de abscesos por la cual *E. coli* proporciona hierro del hemo a *B. fragilis* para superar las restricciones de hierro impuestas por el huésped. (Otto, VanDooren, Dozois, Luirink, & Oudega, 2015)

### **Tratamientos alternativos**

La resistencia a los antibióticos es considerada una importante preocupación de salud pública por varias organizaciones internacionales y por agencias locales. De hecho, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades reclaman 23,000 muertes cada año en los Estados Unidos relacionadas con la resistencia a los antibióticos y algunos estudios

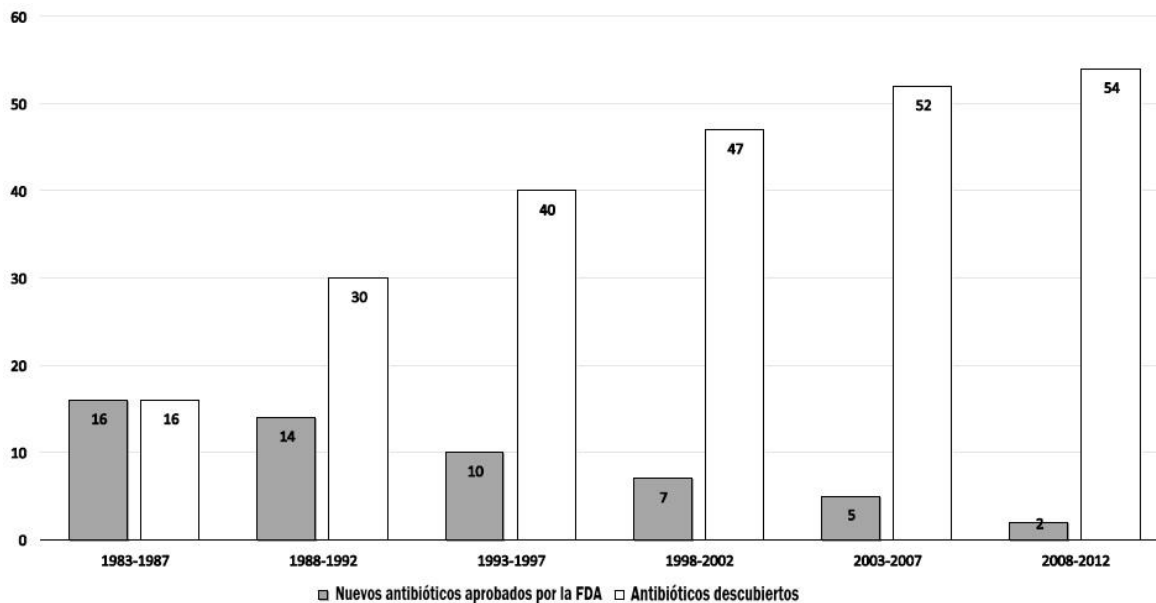
predicen millones de muertes en las próximas décadas. Las Naciones Unidas crearon un grupo para coordinar la lucha contra la resistencia a los antibióticos. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Uno de los enfoques utilizados durante la última década para tratar las bacterias resistentes a múltiples medicamentos y extremadamente resistentes a los medicamentos (XDR) fue romper el círculo vicioso de los betalactámicos, ampliando el panel de agentes antimicrobianos comúnmente probados. Se ha demostrado que los antibióticos "viejos" (es decir, las moléculas olvidadas) tenían una eficacia notable contra tales aislamientos. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Por ejemplo, la minociclina, la sulfadiazina y la clofazimina son activas contra las cepas de tuberculosis XDR, al igual que la fosfomicina, la colistina y la minociclina contra los aislados gramnegativos resistentes a múltiples fármacos. Según la Organización Mundial de la Salud, las políticas de control de la resistencia a los antimicrobianos incluyen el uso racional de antibióticos, en particular en las granjas, el aumento de la vigilancia y la investigación y desarrollo de nuevas herramientas y moléculas. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

De hecho, a pesar del creciente número de moléculas disponibles, de acuerdo a la Figura 7, se puede observar que la última clase nueva de antibióticos descubiertos es la daptomicina (1986), que solo fue aprobada en 2003 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Este hecho confirma que los agentes antimicrobianos encontrados en el mercado en los últimos 30 años son asociaciones o mejoras de las moléculas existentes. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

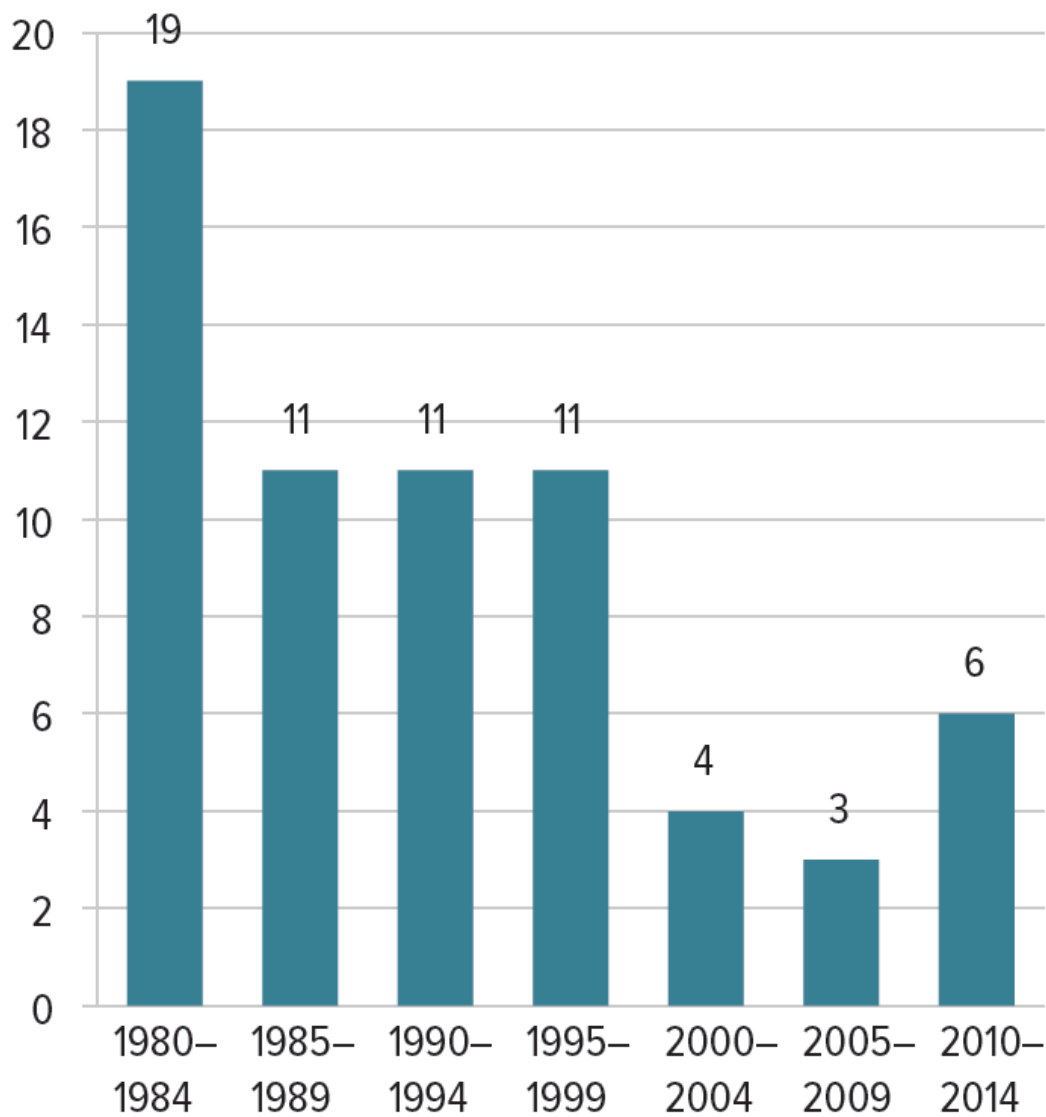
**Figura 7 Comparación de antibióticos aprobados por la FDA con los antibióticos descubiertos en diferentes momentos en el tiempo**



Se dan ejemplos de nuevos antibióticos comercializados recientemente que pertenecen a una clase ya conocida, como las oxazolidinonas (tedizolida), los lipoglucopeptidos (dalbavancina) o las cefalosporinas (ceftarolina, ceftobiprol). La combinación de moléculas mejoradas de una clase ya conocida es otro ejemplo de antibióticos nuevos comercializados recientemente, como por ejemplo ceftolozano más tazobactam o ceftazidima más avibactam. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

La investigación y el desarrollo de una clase totalmente nueva de antibióticos aparecen como un problema importante. En este documento, proponemos recordar la historia del descubrimiento de antibióticos, su naturaleza estructural y los métodos que se utilizaron para su descubrimiento. Finalmente, revisamos los nuevos enfoques potenciales para el descubrimiento de nuevas clases de antibióticos. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

**Figura 8**      **Número de aprobaciones de solicitudes de nuevos medicamentos antibacterianos versus intervalos de un año**



En la Figura 8 podemos observar que la cantidad de nuevos antibióticos desarrollados y aprobados ha disminuido constantemente en las últimas tres décadas (aunque cuatro nuevos medicamentos fueron aprobados en 2014), dejando menos opciones para tratar las bacterias resistentes.

## Opciones actuales en el mercado

La mayoría de los antibióticos utilizados actualmente en medicina humana son secreciones naturales de bacterias u hongos ambientales. De hecho, la mayoría de los antibióticos utilizados actualmente se derivan de *Streptomyces* aislados de muestras de suelo. En su entorno natural, los microorganismos deben luchar entre sí mediante la producción de sustancias antimicrobianas, y deben desarrollar mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

En segundo lugar, las especies que producen sustancias antibacterianas de forma natural también tienen genes de resistencia a estos antibacterianos para evitar la auto-toxicidad, dentro de un operón antibiótico biosintético. Se ha demostrado en estudios previos la presencia de genes de resistencia antibacteriana en un entorno en el que no había antibiótico innato. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Primero se propuso la existencia de un "reservorio de determinantes de resistencia que pueden movilizarse en la comunidad microbiana". Gerard D. Wright propuso el término "resistoma" para diseñar la colección de todos los genes de resistencia a antibióticos y sus precursores en bacterias. Curiosamente, también se encontraron especies bacterianas resistentes a múltiples fármacos, así como genes de resistencia a los antibióticos utilizados actualmente en muestras arqueológicas ambientales. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

Los genes OXA que codifican las betalactamasas se han fechado en varios millones de años. Investigadores han encontrado genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas y glucopéptidos de muestras de permafrost de 30,000 años de antigüedad. También se han encontrado varios genes de resistencia en el genoma de un *Staphylococcus hominis* aislado del permafrost. (Durand, Raoult, & Dubourg, 2018)

## **Plantas medicinales**

Diversos materiales como enzimas, prebióticos, probióticos, minerales, péptidos antimicrobianos, acidificantes, plantas y extractos de plantas han sido probados como posibles alternativas a los antibióticos. Debido a sus efectos sobre la microbiota intestinal y la función inmune, se han realizado investigaciones sobre la aplicación de estos suplementos alimenticios. (Wang, et al., 2016)

Los humanos siempre han sufrido infecciones por bacterias, hongos, virus y parásitos, pero también por inflamación, resfriado, problemas digestivos, dolor y muchos otros trastornos y enfermedades de la salud. Las medicinas modernas, que se basan en drogas sintéticas y antibióticos, solo han estado disponibles durante los últimos 150 años. (Wink, 2015)

Anteriormente, los humanos tenían que depender de drogas de la naturaleza, principalmente de plantas, pero también de hongos y animales. El tratamiento de infecciones y trastornos de la salud con medicamentos a base de hierbas involucra productos naturales activos, en su mayoría de bajo peso molecular y gran diversidad estructural, los llamados metabolitos secundarios, que son típicos de todas las plantas. (Wink, 2015)

## **Componentes de plantas medicinales**

### **Alcaloides (incluyendo aminos)**

Los alcaloides se encuentran entre los metabolitos secundarios más activos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal (especialmente en las angiospermas). Sus estructuras contienen uno o varios átomos de nitrógeno en una estructura de anillo (alcaloides verdaderos) o en una cadena lateral (pseudoalcaloides). Dependiendo de las estructuras del anillo, los alcaloides se subdividen en varios subgrupos. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

Los alcaloides son infames como toxinas animales y ciertamente sirven principalmente como químicos de defensa contra los depredadores (herbívoros, carnívoros) y, en menor grado, contra bacterias, hongos y virus. Los objetivos moleculares de alcaloides y aminos a menudo son neuroreceptores, o modulan otros pasos en la transducción de señales neuronales, incluidos canales iónicos o enzimas, que absorben o metabolizan neurotransmisores o segundos mensajeros. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

Otros alcaloides son mutagénicos porque intercalan o alquilan ADN. Varios alcaloides que interfieren con el ADN, los telómeros, la telomerasa, la topoisomerasa, el citoesqueleto o la biosíntesis de proteínas inducen la apoptosis. Algunos de ellos se usan en la terapia contra el cáncer como quimioterapéuticos, como alcaloides de la vinca, paclitaxel o camptotecina. (Alva, 2013)

Varios alcaloides lipofílicos y otros metabolitos secundarios son sustratos de transportadores ABC, como p-gp, que a menudo se sobreexpresan en células cancerosas, parásitos y microbios. Una estrategia para superar el cáncer multirresistente o las células microbianas podría ser la combinación de un fármaco quimioterapéutico con un inhibidor de los transportadores ABC. In vitro, esta estrategia es poderosa pero menos in vivo. (Wink, 2015)

### *Alcaloides de Amaryllidaceae*

Los alcaloides típicos en este grupo son ambelina, galantamina, hemanthamina, licorina y narciclasina, que son producidos por varios géneros de *Amaryllidaceae*. La licorina y la narciclasina inhiben la biosíntesis de proteínas ribosómicas al unirse a la subunidad 60S. La galantamina, se ha introducido como un agente terapéutico para tratar la enfermedad de Alzheimer porque inhibe la colinesterasa. Además, muestra propiedades analgésicas. (Wink, 2015)

### ***Colchicina***

La colchicina y los alcaloides relacionados son típicos de plantas en los géneros *Colchicum*, *Gloriosa* y algunas otras *Liliaceae*. El objetivo molecular de la colchicina es la tubulina; inhibe la polimerización de la tubulina y la despolimerización de los microtúbulos. La colchicina inhibe la síntesis de colágeno y activa la colagenasa. La colchicina se ha utilizado contra las células cancerosas de división rápida, pero su toxicidad impide una aplicación general. En la medicina moderna, la colchicina se prescribe en casos de gota aguda, ya que evita que los macrófagos migren a las articulaciones inflamadas. (Wink, 2015)

### ***Alcaloides de diterpeno***

Aconitina de *Aconitum spec.* y protoveratrina B de *Veratrum spec.* son potentes activadores de los canales de  $\text{Na}^+$  que son esenciales para la señalización neuronal. Si estos canales iónicos se activan por completo, el potencial de acción de los nervios a los músculos ya no se transmite, lo que conduce a un paro completo de los músculos cardíacos y esqueléticos. (Wink, 2015)

La aconitina y la protoveratrina B primero se activan y luego paralizan las terminaciones nerviosas sensibles y las placas neuromusculares. La aconitina también ejerce propiedades analgésicas y se ha utilizado para tratar el dolor neuronal, como el causado por la irritación del nervio trigémino. Los extractos de *Aconitum* se han utilizado ampliamente como veneno de flecha, veneno mortal y en ungüentos de “brujas” durante miles de años en Europa y Asia. (Wink, 2015)

Otro diterpeno es el paclitaxel (taxol®) que puede aislarse de varias especies de tejo. En el Eurasia *T. baccata* se producen taxanos en las hojas que se pueden convertir en paclitaxel. El paclitaxel estabiliza los microtúbulos y, por lo tanto, bloquea la división celular en la fase G2 tardía; Debido a estas propiedades, el paclitaxel se ha utilizado durante casi 20 años con gran éxito en la quimioterapia de varios tumores. (Wink, 2015)

***Alcaloides de isoquinolina (incluidos los alcaloides de protoberberina, aporfina y morfina)***

Los alcaloides de isoquinolina son comunes en los géneros de *Annonaceae*, *Berberidaceae*, *Magnoliaceae*, *Monimiaceae*, *Menispermaceae*, *Lauraceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae* y otros. Muchos alcaloides de protoberberina y benzofenantridina interfieren con los neuroreceptores y el ADN (varios son fuertes intercaladores de ADN). Los alcaloides intercalados (como berberina, sanguinarina) muestran pronunciadas propiedades antibacterianas, antivirales y citotóxicas. (Wink, 2015)

Los alcaloides de morfina son típicos de los miembros de *Papaver somniferum* y *P. bracteatum*: la morfina causa analgesia central, euforia y sedación. La morfina es un agonista de los receptores de endorfina en el cerebro y promueve potentes efectos inductores del sueño, analgésicos y alucinógenos. Se utiliza en medicamentos modernos estandarizados destinados al uso oral y parenteral, principalmente para tratar el dolor intenso. (Wink, 2015)

***Alcaloides de piperidina***

La piperina es el principio picante de *Piper nigrum* y otras especies de *Piper*. Las frutas de *piper* se usan ampliamente como especias picantes y, a veces, como insecticidas. La piperina inhibe el transportador ABC. Coniine es una toxina famosa de *Conium maculatum*. Causa parálisis ascendente, que comienza en la punta de los brazos y las piernas y termina con insuficiencia respiratoria y muerte. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

La arecolina y la arecaidina exhiben actividades parasimpáticas y actúan como un estimulante central ampliamente utilizado en el sudeste asiático. La lobelina ocurre en las especificaciones de *Lobelia*. y se ha utilizado en el tratamiento del asma y como fármaco

antitabaco; Inhibe el transportador ABC. La pelletierina de *Punica granatum* se ha utilizado contra las tenias intestinales. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

### ***Alcaloides esteroideos***

Los alcaloides esteroideos que a menudo consisten en un resto de esteroides lipofílicos y una cadena de oligosacáridos hidrofílicos (como en las saponinas) son producidos por cuatro familias de plantas no relacionadas: *Apocynaceae*, *Buxaceae*, *Liliaceae* y *Solanaceae*. Están especialmente ampliamente distribuidos dentro del género muy grande *Solanum* que incluye papa, tomate y otras plantas alimenticias que producen el tipo espirosolano, con soladulcidina y tomatidina y el tipo solanidano con solanina y chaconina. (Wink, 2015)

Los alcaloides de la solanácea se comportan como. Esta propiedad también explica la fuerte irritación de la piel observada en la mucosa y las propiedades antifúngicas y actividades citotóxicas conocidas de las saponinas. Además, los alcaloides inhiben la acetilcolina esterasa que descompone la acetilcolina en la sinapsis. Por lo tanto, los alcaloides de *Solanum* causan algunos efectos neuronales. (Wink, 2015)

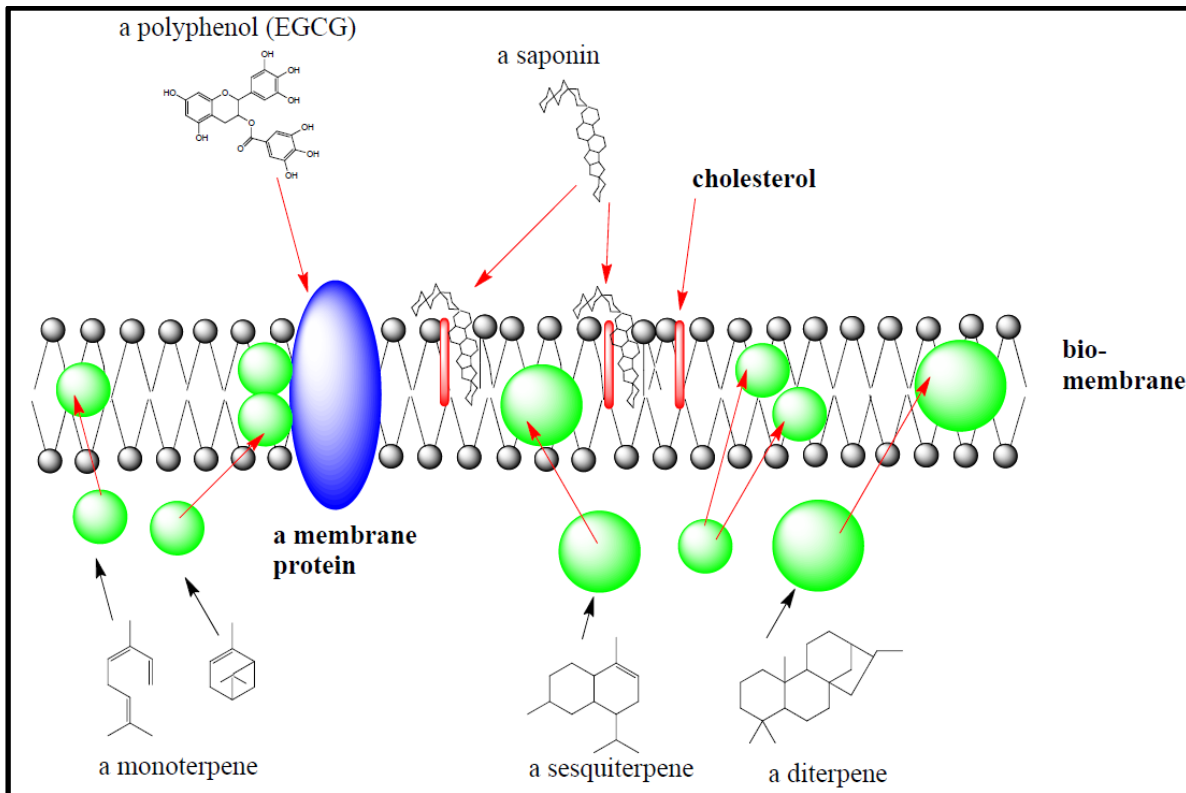
Varias especies de *Solanum*, como *Solanum dulcamara*, son parte de la medicina tradicional utilizada como medicamentos antiinflamatorios. Los alcaloides de la solanácea se han utilizado en la agricultura como insecticida. Las plantas del género *Buxus* contienen una serie de alcaloides esteroideos libres, como la ciclobuxina D, la buxamina E, que son bastante tóxicos y muy purgantes. (Wink, 2015)

### **Terpenos**

Los terpenos se construyen a partir de unidades C<sub>5</sub> como bloque de construcción y se pueden subdividir en monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) y politerpenos. Los esteroides (C<sub>27</sub>) se derivan de

triterpenos. La mayoría de los terpenoides son lipofílicos. Interactúan fácilmente con biomembranas y proteínas de membrana (Figura 9). (Wink, 2015)

**Figura 9 Interacción de metabolitos secundarios con biomembranas**



(Wink, 2015)

Los terpenos pueden aumentar la fluidez y la permeabilidad de las membranas, lo que puede conducir a un flujo no controlado de iones y metabolitos e incluso a la fuga celular, lo que resulta en la muerte celular necrótica o apoptótica. Además, pueden modular la actividad de proteínas de membrana y receptores o canales iónicos. Por lo tanto, algunas hierbas con monoterpenos se han utilizado como relajantes en caso de espasmos y calambres. (Wink, 2015)

Esta actividad de la membrana es bastante inespecífica. En general, los terpenos muestran actividades citotóxicas contra una amplia gama de organismos, desde bacterias y hongos hasta insectos y vertebrados, y se han utilizado ampliamente en la medicina herbal

contra las infecciones. Muchos terpenos son incluso efectivos contra virus encerrados en membranas. Los terpenoides están ampliamente presentes en extractos de plantas medicinales. (Wink, 2015)

### ***Monoterpenos***

Los monoterpenos con olor aromático están ampliamente presentes en *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Burseraceae*, *Dipterocarpaceae*, *Lamiaceae*, *Myricaceae*, *Myristicaceae*, *Poaceae*, *Rutaceae*, *Verbenaceae* y resina de coníferas. En las plantas con flores a menudo sirven para atraer artrópodos polinizadores. Se aíslan de las plantas en forma de aceites esenciales por destilación o extracción con solventes. (Wink, 2015)

Los aceites esenciales con monoterpenos se usan en aromaterapia y en fitomedicina para tratar el reumatismo, infecciones (bacterianas, fúngicas), resfriado, malestar, flatulencia, espasmos intestinales, como estomacales y para mejorar el sabor. Los aceites esenciales son ingredientes de muchos perfumes y de algunos repelentes de insectos naturales. Aplicados a la piel, los monoterpenos y los hidrocarburos alifáticos pueden causar hiperemia; dosis más altas causan efectos narcóticos. (Wink, 2015)

### ***Glucósidos Iridoides***

Una subclase son los glucósidos iridoides con más de 200 estructuras distribuidas entre *Apocynaceae*, *Gentianaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae*, *Menyanthaceae*, *Plantaginaceae*, *Rubiaceae*, *Scrophulariaceae*, *Valerianaceae* y *Verbenaceae*. Algunos, como los gentiopicrosidos, presentes en *Gentianaceae* y *Menyanthaceae*, tienen sabor amargo; se utilizan para mejorar la digestión y aumentar el apetito en pacientes. (Wink, 2015)

Los glucósidos iridoides, como la aucubina y el harpagosido, son hidrolizados por una  $\beta$ -glucosidasa en una aglicona inestable. Su anillo de lactol puede abrirse produciendo un dialdehído funcional. Catalpol tiene un anillo de epóxido reactivo. Los dialdehídos

poligodiales y warburganal tienen un sabor a pimienta y han sido reconocidos como el principio activo en *Drymis*, *Polygonum hydropiper* y *Warburgia salutaris*. (Wink, 2015)

El dialdehído puede unirse a las proteínas y formar las bases de Schiff con grupos amino libres que parecen ser la base de sus propiedades farmacológicas, que a menudo incluyen actividades antiinflamatorias. Se han utilizado varias plantas medicinales, ricas en glucósidos iridoides, para tratar infecciones, reumatismo e inflamaciones. Los secoiridoides en Valeriana contribuyen a las propiedades sedantes de la droga medicinal. (Wink, 2015)

### ***Sesquiterpenos y Lactonas Sesquiterpénicas***

Las lactonas de sesquiterpeno (como cianarapicrina, helenalina, lactupicrina, partenolida), que son comunes en Asteraceae y algunas otras familias, pueden unirse a grupos SH de proteínas a través de 1 o 2 grupos de metileno exocíclico y la configuración enón en el anillo de furano y, por lo tanto, son farmacológicamente activos, a menudo como agentes antiinflamatorios. (Wink, 2015)

Las lactonas de sesquiterpeno también se unen al glutatión (a través de grupos SH) y pueden agotar su contenido en el hígado y alterar la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células. Como consecuencia, las lactonas de sesquiterpenos exhiben una amplia gama de actividades biológicas, que incluyen propiedades citotóxicas, antibióticas, antihelmínticas, antiinflamatorias, fitotóxicas, insecticidas y antifúngicas. (Wink, 2015)

### ***Saponinas***

Las saponinas son los glucósidos de triterpenos o esteroides e incluyen el grupo de glucósidos cardíacos y alcaloides esteroideos. Las saponinas esteroideas son típicas de varias familias de monocotiledóneas, y son menos frecuentes en dicotiledóneas. Las saponinas

triterpénicas son abundantes en varias familias de dicotiledóneas. Están ausentes en las gimnospermas. (Alva, 2013)

En algunos casos, los esteroides, triterpenos y saponinas se parecen estructuralmente a las hormonas antiinflamatorias endógenas, por ejemplo, los glucocorticoides. Los efectos antiinflamatorios conocidos de muchas plantas medicinales podrían deberse a un efecto corticomimético. Se ha informado una actividad antiinflamatoria pronunciada del ácido glicirricizico de *Glycyrrhiza glabra*, una saponina triterpénica con sabor dulce. (Wink, 2015)

Algunas saponinas se almacenan como compuestos bidesmosídicos (que contienen dos cadenas de azúcar) en la vacuola, que se escinden a los compuestos monodesmosídicos activos mediante una  $\beta$ -glucosidasa o una esterasa en la descompartición inducida por la lesión. Las saponinas monodesmosídicas son compuestos anfífilos, que pueden formar complejos de colesterol en biomembranas con su resto terpenoide lipofílico y unirse a las glucoproteínas y glucolípidos superficiales con su cadena lateral de azúcar. Esto conduce a una tensión severa de la biomembrana y fugas. (Nyinoh, Atu, & Oluma, 2018)

Esta actividad de la membrana es bastante inespecífica y afecta a un amplio conjunto de organismos desde microbios hasta animales. Por lo tanto, las saponinas se han utilizado en la medicina tradicional como agentes antiinfecciosos. Debido a que las saponinas irritan el nervio vago en el estómago, induce la secreción de agua en los bronquios, los medicamentos que contienen saponina se emplean ampliamente como agentes secretolíticos en la fitomedicina. (Nyinoh, Atu, & Oluma, 2018)

### ***Tetraterpenos***

Los carotenoides representan los miembros más importantes de los tetraterpenos. Son compuestos altamente lipofílicos y siempre están asociados con biomembranas. En los cloroplastos, sirven como pigmentos accesorios importantes para la fotosíntesis. También

protegen las plantas contra la luz ultravioleta. Los carotenoides en los alimentos y las drogas medicinales se emplean como poderosos antioxidantes. (Nyinoh, Atu, & Oluma, 2018)

Los carotenoides son los precursores de la vitamina A en animales, que se utiliza para producir retinal y ácido retinoico (los retinoides se unen a los receptores nucleares y son mediadores locales del desarrollo de vertebrados). Algunos carotenoides son inhibidores de los transportadores ABC, que a menudo se sobreexpresan en células cancerosas resistentes a múltiples fármacos. Si los carotenoides se aplican en combinación con un fármaco citotóxico, se puede lograr una reversión de la resistencia al fármaco. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

### **Fenoles**

Los polifenoles (con varios anillos fenólicos y grupos OH fenólicos) aparentemente son responsables de un amplio conjunto de propiedades farmacológicas, que incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, sedantes, cicatrizantes, antimicrobianas y antivirales. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

### ***Cumarinas y Furanocumarinas***

Los fenilpropanoides sirven como bloques de construcción para cumarinas y furanocumarinas, de las cuales se han determinado más de 700 estructuras. Las cumarinas pueden alcanzar concentraciones de hasta el 2% en las plantas y son comunes en ciertos géneros de las Apiaceae, Fabaceae, Poaceae, Rubiaceae. En fitomedicina se usan debido a sus propiedades antiinflamatorias, antiedemáticas y antimicrobianas (Melilotus). (Wink, 2015)

Las cumarinas son aromáticas y, por lo tanto, se aplican en cosméticos y bebidas. Las furanocumarinas (FC) generalmente tienen un tercer anillo de furano que se deriva del isopreno activo. Se distinguen los FC lineales de psoraleno o anglicina angular. Las furanocumarinas están presentes en partes aéreas como hojas y frutos, pero también en raíces

y rizomas. Son abundantes en Apiaceae (contenidos de hasta 4%), pero también están presentes en ciertos géneros de Fabaceae (por ejemplo, *Psoralea bituminosa*) y Rutaceae. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

Las furanocumarinas lipofílicas y planas pueden intercalar ADN y, tras la iluminación con luz UV, pueden formar enlaces cruzados con bases de ADN, pero también con proteínas. Por lo tanto, son mutagénicos y posiblemente cancerígenos. En medicina, las furanocumarinas (como 8-MOP) se emplean para el tratamiento del psoriasis y el vitiligo porque el FC puede matar los queratocitos proliferantes en la piel tras la exposición a los rayos UV, este tratamiento brinda cierto alivio para los pacientes con psoriasis. (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2018)

### ***Lignanós y Lignina***

Los fenilpropanoides pueden formar estructuras diméricas complejas, llamadas lignanos. La podofilotoxina, que ocurre en los miembros de los géneros *Anthriscus*, *Linum* y *Podophyllum*, es un potente inhibidor de la formación de microtúbulos y, por lo tanto, evita la división celular. El pinosinol y los compuestos relacionados son inhibidores de la fosfodiesterasa cAMP, citotóxica, insecticida e inmunomoduladora. (Wink, 2015)

### ***Flavonoides y Antocianinas***

Los fenilpropanoides pueden condensarse con un resto policétido en flavonoides, estilbenos, chalcones, catequinas y antocianinas. Estos compuestos se caracterizan por dos anillos aromáticos que transportan varios grupos hidroxilo o metoxilo fenólicos. Además, a menudo se presentan como glucósidos y se almacenan en vacuolas. Los flavonoides son ingredientes activos de muchas hierbas medicinales. (Wink, 2015)

Los estilbenos, como el resveratrol, tienen actividades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas, y están presentes en varios medicamentos y nutraceuticos. La

isoliquiritigenina y la glicolina II inhiben la monoaminoxidasa mitocondrial y desacoplan la fosforilación oxidativa mitocondrial. La rotenona inhibe la cadena respiratoria mitocondrial y, por lo tanto, es altamente tóxica y, por lo tanto, se usa como insecticida. (Wink, 2015)

### *Catequinas y Taninos*

Las catequinas forman una clase especial de flavonoides, que a menudo se dimerizan o incluso se polimerizan en procianidinas y procianidinas oligoméricas. Los conjugados (que no pueden hidrolizarse; "taninos no hidrolizables") se caracterizan por una gran cantidad de grupos hidroxilo. Los grupos hidroxilo fenólicos pueden interactuar con proteínas para formar enlaces iónicos e hidrógeno y posiblemente incluso enlaces covalentes. (Nyinoh, Atu, & Oluma, 2018)

Si hay más de 10 grupos hidroxilo, estos compuestos actúan como "taninos". Las interacciones tanino-proteína son una base para la utilización de plantas con catequinas en fitoterapia. Otro grupo importante de taninos es hidrolizable. Representan ésteres entre el ácido gálico y los azúcares; además, pueden estar presentes varios restos de ácido gálico que también están unidos por enlaces éster. (Nyinoh, Atu, & Oluma, 2018)

Estos gallotaninos están ampliamente distribuidos en plantas, a menudo en corteza, hojas y frutos. Las gallotaninas, que pueden condensarse adicionalmente con catequinas, contienen una gran cantidad de grupos hidroxilo fenólicos para que puedan formar complejos de proteína-tanino estables y, por lo tanto, interactuar con una amplia variedad de proteínas objetivo en microbios y animales. (Wink, 2015)

Los taninos son antioxidantes fuertes, con actividades antiinflamatorias, antidiarreicas, citotóxicas, antiparasitarias, antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Varias plantas medicinales (Agrimonia, Alchemilla, Fragaria, Krameria, Potentilla, Quercus, Ribes,

Sanguisorba) se usan interna y externamente para tratar la inflamación y la infección. Son drogas comunes de la medicina tradicional y la fitoterapia moderna. (Wink, 2015)

## **Quinonas**

### *Quinonas y Naftoquinonas*

Las quinonas incluyen hidro-, nafto- quinonas y antraquinonas. Las hidroquinonas son típicas de *Ericaceae*, las naftoquinonas para *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Droseraceae*, *Iridaceae* y *Juglandaceae*. Las quinonas y las naftoquinonas son reactivos redox que pueden unirse a enzimas o interactuar con proteínas que contienen  $Fe^{2+} / Fe^{3+}$ , como los citocromos y la hemoglobina. Las quinonas alquiladas pueden formar nuevos antígenos cuando se unen a proteínas y causan dermatitis. (Granados-Chinchilla, 2017)

Los medicamentos que contienen la arbutina antimicrobiana se usan en la medicina tradicional para tratar infecciones bacterianas del tracto urinario. Un té de *Tabebuia impetiginosa* ("té Lapacho o Inka"), utilizado por los indios sudamericanos, se ha introducido en Europa como un té de salud general e incluso para el tratamiento del cáncer. Los extractos de *Drosera* se han utilizado en medicina como agentes antitumorales. (Wink, 2015)

## **CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO**

### **Enfoque**

De acuerdo con Hernández, Fernández y Baptista (2014) el enfoque indica la manera en que se aborda el fenómeno, delimita la ruta a seguir para ser capaz de responder la pregunta, objetivos y definir la profundidad del estudio, en este caso el enfoque está dirigido a medir y probar teorías, pretende confirmar y predecir fenómenos, por lo tanto, se clasifica como cuantitativo.

Es cuantitativo porque en la investigación se presenta una pregunta y una hipótesis, según Hernández, Fernández y Baptista (2014). Éstas se van a contestar y confirmar o refutar gracias a una serie de procedimientos experimentales. Esta pregunta e hipótesis se generan debido a que se detecta una problemática actual en el uso de antibióticos, que requiere un acercamiento diferente y alternativo al que se le da hoy en día. Por esto se estudia la capacidad bactericida de seis plantas usadas en la cocina costarricense.

### **Diseño de Investigación**

Esta investigación tiene un diseño exploratorio y explicativo, según Hernández, Fernández y Baptista (2014). Los estudios exploratorios se realizan cuando el objetivo es examinar un tema o problema de investigación poco estudiado, del cual se tienen muchas dudas o no se ha abordado antes, mientras que los explicativos van más allá de la descripción de conceptos o fenómenos o del establecimiento de relaciones entre conceptos; es decir, están dirigidos a responder por las causas de los eventos y fenómenos físicos o sociales.

Se cataloga así porque se obtuvieron extractos de seis plantas para analizar su actividad bactericida, por lo tanto, es un estudio exploratorio. La actividad bactericida de los extractos se evaluó mediante ensayos de difusión de disco, en los que se midió el tamaño del

diámetro de muerte bacteriana con una cepa de *E. coli*. y se identificaron los componentes activos. También se identificaron los metabolitos secundarios más importantes en las plantas seleccionadas, por esto es explicativo, ya que se pretende dar razones y análisis de porqué se obtuvieron los resultados alcanzados. (Hernández, Fernández, & Baptista, 2014)

### Cuadro de operacionalización de variables

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Indicador	Instrumento
Clasificar las plantas seleccionadas para determinar su potencia y capacidad bactericida contra <i>Escherichia coli</i> .	Capacidad bactericida	Bactericida: es la acción de destruir bacterias, es aplicable a una sustancia o producto. (RAE, 2019)	Diámetro en milímetros del halo de inhibición bacteriana	Procedimiento para la obtención de las muestras, obtención de los extractos y medición de la actividad bacteriana.

<p>Identificar los posibles componentes activos (metabolitos secundarios) de las plantas que presentan actividad bactericida</p>	<p>Metabolitos secundarios</p>	<p>Metabolitos secundarios: son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, pero no tienen un papel directo en el desarrollo de la planta en sí. (Alva, 2013)</p>	<p>Caracterización fitoquímica por cambio de color o presencia de precipitados</p>	<p>Procedimiento para la identificación de los componentes activos</p>
<p>Comparar la eficacia bactericida de la planta más potente contra la amoxicilina solución oral con el fin de demostrar tratamientos alternativos contra la bacteria <i>Escherichia coli</i></p>	<p>Tratamientos alternativos de antibióticos</p>	<p>Antibiótico: es una sustancia química capaz de parar el desarrollo de ciertos patógenos (bacteriostático) o de causarles muerte (bactericida). (RAE, 2019)</p>	<p>Diámetro en milímetros del halo de inhibición bacteriana</p>	<p>Procedimiento para la medición de actividad bactericida.</p>

## Procedimientos

El equipo utilizado (Figuras de la 10 a la 13) para las extracciones consistió de un dispositivo de desecación de elaboración propia, equipos soxhlet, rotavapor, jeringas, filtros de disco estériles, viales estériles y tubos de ensayo para las pruebas de identificación.

**Figura 10**      **Dispositivo de desecación**



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 11**      **Equipo de extracción soxhlet**



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 12**      **Rotavapor**



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 13      Discos y frascos estériles**

(Elaboración propia, 2019)

### Recolección de las muestras

Las muestras fueron adquiridas en polvo (canela y jengibre), hojas secas (orégano, estragón y culantro) y de forma fresca (tacaco) en el mercado central de San José, Costa Rica.

Las plantas seleccionadas fueron:

1. *Sechium tacaco*: Tacaco
2. *Cinnamomum verum*: Canela
3. *Coriandrum sativum*: Culantro
4. *Zingiber officinale*: Jengibre
5. *Origanum vulgare*: Orégano

## 6. *Artemisia dracunculus*: Estragón

### Obtención de los extractos

El procedimiento para la obtención de los extractos de las plantas utilizadas fue el siguiente:

**Tacaco:** dado que no se pudo conseguirse tacaco en polvo o seco, se debe utilizar fresco)

1. Se sometieron a cocción en agua hirviendo dos tacacos hasta que fue posible perforarlos con un punzón de metal.
2. La cáscara se removió y desechó, luego se procedió a partir el tacaco para desechar la semilla y picar el resto del material comestible.
3. Se desecó la muestra utilizando cloruro de calcio en un dispositivo adecuado de forma que el material no estuviese en contacto directo con el desecante y se encontrara en un recipiente sellado durante 5 días (Figura 10).
4. Se pesaron 30g del material vegetal y se envolvieron en un saco confeccionado con filtros de café.
5. Se colocó la muestra en un extractor soxhlet (Figura 11).
6. Dentro del balón, se vertió etanol (400 mL) y se forró el balón con papel aluminio para asegurar el calentamiento uniforme.
7. Se mantuvo a temperatura ( $> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación ( $> 200\text{ rpm}$ ) constantes durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas) y el extracto se mantuvo en un baño de agua a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
8. Se utilizó un rotavapor a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $70\text{ rpm}$  para eliminar los excesos de humedad presentes (Figura 12).

9. Se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa (Figura 13), acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **Orégano:**

1. Se pesaron 10g del material seco y se envolvió en un saco de filtros de café.
2. Se colocó la muestra en un extractor soxhlet (Figura 11).
3. Dentro del balón, se vertió etanol (400mL) y se forró el balón con papel aluminio para asegurar el calentamiento uniforme.
4. Mantener a temperatura ( $< 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación constante ( $< 500\text{ rpm}$ ) durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas) y el extracto se mantuvo en un baño de agua a  $70^{\circ}\text{C}$ .
5. Se utilizó un rotavapor a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $70\text{ rpm}$  para eliminar los excesos de humedad presentes (Figura 12).
6. Se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa (Figura 13), acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **Estragón:**

1. Se pesaron 10g del material seco y se envolvió en un saco de filtros de café.
2. Se colocó la muestra en un extractor soxhlet (Figura 11).
3. Dentro del balón, se vertió etanol (400mL) y se forró el balón con papel aluminio para asegurar el calentamiento uniforme.
4. Mantener a temperatura ( $< 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación constante ( $< 500\text{ rpm}$ ) durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas) y el extracto se mantuvo en un baño de agua a  $70^{\circ}\text{C}$ .
5. Se utilizó un rotavapor a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $70\text{ rpm}$  para eliminar los excesos de humedad presentes (Figura 12).

6. Se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa (Figura 13), acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

**Canela:**

1. Se pesaron 10g del material en polvo y se envolvió en un saco de filtros de café.
2. Se colocó la muestra en un extractor soxhlet (Figura 11).
3. Dentro del balón, se vertió etanol (400mL) y se forró el balón con papel aluminio para asegurar el calentamiento uniforme.
4. Mantener a temperatura ( $< 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación constante ( $< 500\text{ rpm}$ ) durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas) y el extracto se mantuvo en un baño de agua a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Se utilizó un rotavapor a  $100^{\circ}\text{C}$  y  $70\text{ rpm}$  para eliminar los excesos de humedad presentes (Figura 12).
6. Se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa (Figura 13), acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

**Jengibre:**

1. Se pesaron 10 g del material en polvo y se envolvió en un saco de filtros de café.
2. Se colocó la muestra en un extractor soxhlet (Figura 11).
3. Dentro del balón, se vertió etanol (400mL) y se forró el balón con papel aluminio para asegurar el calentamiento uniforme.

4. Mantener a temperatura ( $< 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación constante ( $< 500\text{ rpm}$ ) durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas) y el extracto se mantuvo en un baño de agua a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Se utilizó un rotavapor a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $70\text{ rpm}$  para eliminar los excesos de humedad presentes (Figura 12).
6. Se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa (Figura 13), acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **Culantro:**

1. Se pesaron 10g del material seco y se envolvió en un saco de filtros de café.
2. Se colocó la muestra en un extractor soxhlet (Figura 11).
3. Dentro del balón, se vertió etanol (400 ml) y se forró el balón con papel aluminio para asegurar el calentamiento uniforme.
4. Mantener a temperatura ( $< 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación constante ( $< 500\text{ rpm}$ ) durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas) y el extracto se mantuvo en un baño de agua a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
5. Se utilizó un rotavapor a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $70\text{ rpm}$  para eliminar los excesos de humedad presentes (Figura 12).
6. Se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa (Figura 13), acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

### **Identificación de los metabolitos secundarios**

El procedimiento para la identificación de los metabolitos secundarios de las muestras es el siguiente:

1. Salkowski (esteroides y terpenos) realizar en capilla:

- Se tomaron 5 mL de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se agregaron 2 mL de cloroformo y 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, y se procedió a agitar.
- Los resultados fueron registrados.

2. Dragendorff (alcaloides):

- Se tomaron 2 mL de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se agregaron 5 gotas de reactivo de Dragendorff y se agitó para observar la reacción.
- Los resultados fueron registrados.

3. Cloruro férrico (compuestos fenólicos y taninos):

- Se tomaron 2 mL de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se agregaron 5 gotas de reactivo de Cloruro férrico seguido de agitación.
- Los resultados fueron registrados.

4. Shinoda (flavonoides):

- Se tomaron 2 mL de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se agregaron 5 gotas de reactivo de Shinoda.
- Los resultados fueron registrados.

5. Ensayo de espuma (saponinas):

- Se tomaron 5 mL de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo.
- Cada tubo se agitó vigorosamente.
- Los resultados fueron registrados.

6. Ensayo de Schiff (aldehídos):

- Se tomaron 2 mL de cada extracto y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se agregó 1 mL de reactivo de Schiff, y se agitó.
- Los resultados fueron registrados.

**Preparación de *Escherichia coli* (cepa AOAC-113)**

**Figura 14** Colocación de la cepa de *E. coli* en una placa de agar nutritivo



(Elaboración propia, 2019)

El procedimiento para la preparación de la cepa de *Escherichia coli* utilizado fue el siguiente:

1. Se tomaron 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 24 horas disponible en los laboratorios MicroLabs en Moravia, se sembraron en 15 ml de un medio líquido (Trypticase soja) y se procedió a incubar en la estufa a 35°C durante 6 horas hasta que se consiguió una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland, luego se colocó la cepa en un tubo con un medio nutritivo líquido y se dejó reposar por 24 horas.
2. Luego se procedió a preparar las placas con agar nutritivo, una vez solidificadas se realizaron pequeños orificios con una punta estéril de micropipeta. Cada orificio o pocillo fue identificado con un número correspondiente a cada muestra vegetal (1-tacaco, 2-orégano, 3-estragón, 4-canela, 5-jengibre y 6-culantro)
3. Para realizar la colocación de la cepa en las placas de agar se utilizó una torunda estéril, la cual se sumergió en el tubo contenedor de *E. coli* y se aplicó, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consiguió deslizando la torunda por la superficie del agar cuatro veces (Figura 14), girando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para obtener una siembra uniforme. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los extractos.

### **Medición de la actividad bactericida de las plantas solas**

El procedimiento para la medición de la actividad bactericida de los extractos de las plantas usadas es el siguiente:

1. En cada pocillo se depositaron 10µL utilizando una micropipeta y puntas estériles.
2. Se realizó un control negativo con etanol y un control positivo con amoxicilina 125mg/5mL polvo para suspensión de la marca MK<sup>®</sup>. Para esto, se preparó el antibiótico utilizando agua hervida y enfriada, se agregó poco a poco agitando fuertemente hasta que se prepararon los 60 mL de la suspensión.

3. Las placas preparadas se mantuvieron en incubación una cámara de incubación a 33°C por 24 horas.
4. Pasado el tiempo de incubación se procedió a medir en milímetros el halo de inhibición de crecimiento microbiano observado y se anotaron los valores para ser sometidos a comparación.
5. Repetir de los puntos 1 al 4 pero mezclando cada extracto con el antibiótico.

**Medición de la actividad bactericida de las plantas en combinación con amoxicilina 125mg/5mL polvo para suspensión previamente preparada**

El procedimiento para la medición de la actividad bactericida de los extractos de las plantas en combinación con el antibiótico usadas es el siguiente:

1. En seis recipientes estériles se colocó 1 mL de cada extracto y se combinaron con 10 µL de antibiótico.
2. En cada pocillo se depositaron 10µL de cada mezcla utilizando una micropipeta y puntas estériles.
3. Las placas preparadas se mantuvieron en incubación una cámara de incubación a 33°C por 24 horas.
4. Pasado el tiempo de incubación se procedió a medir en milímetros el halo de inhibición de crecimiento microbiano observado y se anotaron los valores para ser sometidos a comparación.

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el siguiente apartado se exponen los resultados obtenidos acerca del tema de investigación, tomando en consideración para su desarrollo los tres objetivos específicos descritos anteriormente. Con este fin se realizaron procedimientos de extracción de aceites esenciales de 6 plantas de uso en la cocina costarricense, se les realizaron pruebas de identificación a cada extracto y pruebas de efecto bactericida ante *E. coli*.

**Figura 15** Material vegetal utilizado



(Elaboración propia, 2019)

Todas las plantas usadas (Figura 15) fueron seleccionadas por su conocida actividad bactericida con el fin de comparar sus potencias frente a la bacteria *E. coli*, a excepción del tacaco, ésta es una planta endémica de Costa Rica, la cual, hasta el año 2017 sólo podía encontrarse en éste país, actualmente se exportó a México y se está sembrando por sus frutos, sin embargo, no es muy popular y muchos lo consideran mala hierba. (Conrad, 2017)

El tacaco, a pesar de que es conocido por todos los costarricenses, no ha sido muy estudiado, los únicos artículos que se pueden encontrar son bastante antiguos y sólo hacen referencia a su morfología, enfocándose en cómo realizar la siembra, en qué altitud y clima, qué cuidados son necesario y los tipos de frutos que existen, pero no hay estudios acerca de sus componentes o sus propiedades. (Morales, 1994)

La razón de su elección se debió a que es una planta muy fuerte, no es atacada por enfermedades o insectos, crece de forma salvaje y sin ayuda humana.

Las plantas seleccionadas fueron *Sechium tacaco* (Tacaco), *Cinnamomum verum* (Canela), *Coriandrum sativum* (Culantro), *Zingiber officinale* (Jengibre), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Artemisia dracunculus* (Estragón).

### **Obtención de los extractos de cada planta**

Para la extracción de los aceites esenciales casi todos tuvieron el mismo procedimiento, con excepción del tacaco, como no se contó con el material seco, se tuvo que usar tacacos frescos, los cuales se hirvieron hasta que suavizaron. La cáscara fue desechada y se picaron descartando la semilla. Acto seguido se procedió a desecar el material vegetal con cloruro de calcio por 5 días.

El dispositivo de desecación (Figura 16) fue elaborado utilizando dos deshumidificadores de la marca “Easy Dry”, en el fondo se colocaron cuatro rollos de cartón asegurados con cinta adhesiva para evitar que una de las bandejas entre en contacto con el fondo que es donde se recolectó el agua de la humedad contenida en el tacaco; en ésta bandeja se colocó el cloruro de calcio, de manera que se mantuviera aparte de la muestra, y en la segunda bandeja se colocó la materia vegetal, por último se cerró con una de las tapas de los deshumidificadores y se colocó en una bolsa serrada para evitar que hubiese humedad externa.

**Figura 16**      **Dispositivo de desecación**



(Elaboración propia, 2019)

Se realizó éste procedimiento extra para el tacaco debido a que las muestras obtenidas a partir de material seco son más fáciles de utilizar, ya que el contenido de agua que poseen es mínimo. El material vegetal seco proporciona la unión libre de solventes con los fitoquímicos de acuerdo con su polaridad. La muestra húmeda produce más viscosidad y carece de separación de los metabolitos secundarios correspondientes a la polaridad del solvente utilizado. (Azwanida, 2015)

Una vez que se tuvieron todos los materiales listos para utilizar se procedió a pesar cada muestra, se pesaron 10g cada uno de las plantas seleccionadas que ya se tenían secos los cuales fueron orégano, estragón, canela, jengibre y culantro y 30 g de tacaco, para este extracto se usó el triple del peso de las demás plantas, ya que este se utilizó en su forma

fresca, y a pesar de que se sometió a un proceso de desecado, no fue posible asegurar que la muestra vegetal utilizada estuviera completamente seca.

Cuando se tuvieron las muestras pesadas se fabricaron sacos con filtros de café para evitar que los polvos o las hojas bloquearan el sifón del equipo de extracción. Se usó un equipo soxhlet (Figuras 17-21) para realizar cada extracto, utilizando etanol como disolvente orgánico y cubriendo los balones con papel aluminio para asegurarse de que el calor en el matraz fuese uniforme.

**Figura 17** Extracción de las muestras de tacaco y culantro en soxhlet



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 18** Extracción de la muestra de canela en soxhlet



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 19** Extracción de la muestra de jengibre en soxhlet



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 20** Extracción de la muestra de orégano en soxhlet



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 21** Extracción de la muestra de estragón en soxhlet



(Elaboración propia, 2019)

Hay muchos disolventes orgánicos que pudieron ser utilizados, pero se eligió el etanol, ya que éste según la literatura es el favorito lógico. Es efectivo, eficiente y seguro, eso es según la FDA. Comúnmente utilizado como aditivo en todo, desde vino hasta crema batida, el etanol es confiable, produciendo constantemente extracciones potentes con un mínimo de incidentes. (purity, 2016)

La extracción de soxhlet (Figuras 17-21) se realizó a temperatura constante ( $> 300\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y agitación ( $> 200\text{rpm}$ ) constantes durante al menos 5 ciclos (aproximadamente 3 horas). A pesar de que la temperatura de ebullición del etanol es de aproximadamente  $78^{\circ}\text{C}$ , al ser un sistema “cerrado” se pueden usar temperaturas mayores asegurando que la temperatura sea homogénea en el balón utilizado.

La extracción de Soxhlet se requiere cuando el compuesto deseado tiene una solubilidad limitada en un disolvente, y la impureza es insoluble en ese disolvente. Si el compuesto deseado tiene una alta solubilidad en un disolvente, entonces se puede usar una filtración simple para separar el compuesto de la sustancia insoluble. La ventaja de este sistema es que, en lugar de pasar muchas porciones de disolvente caliente a través de la muestra, solo se recicla un lote de disolvente y el disolvente se mantiene en éste sistema cerrado gracias a la unidad de condensación. (Redfern, Kinninmonth, Burdass, & Verran, 2014)

**Figura 22** Muestras extraídas con soxhlet en un baño de agua tibia



(Elaboración propia, 2019)

Cuando ya se obtuvieron los extractos (figura 22) se mantuvieron en un baño de agua tibia que no superara los 70°C para acelerar un poco el proceso de concentración ya que sólo se tuvo disponible un rotavapor (figura 23), el cual se usó para eliminar el exceso de humedad de los seis extractos, se configuró a 100 °C y 70 rpm, cómo se expuso anteriormente, se puede utilizar a temperaturas mayores debido a que es un sistema cerrado, además se deben usar altas rpm para que el extracto no hierva y se quemé, por lo tanto, si produce burbujas, es posible que el extracto pierda su eficacia. (Nichols, 2019)

Al tener el volumen deseado, se trasvasó el extracto del balón a un contenedor estéril usando un filtro de disco estéril y una jeringa, con ésta jeringa se midió el volumen final obtenido, gracias a la inspección visual se logró obtener la misma cantidad de líquido de todas las muestras, acto seguido se procedió a rotular. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta el momento de su uso.

**Tabla 1. Cantidad de material vegetal pesado y cantidad final de aceite esencial obtenido**

Material vegetal	Peso (g)	Volumen (ml)	Concentración (g/ml)
Tacaco	30	10	3
Orégano	10	10	1
Estragón	10	10	1
Canela	10	10	1
Jengibre	10	10	1
Culantro	10	10	1

(Elaboración propia, 2019)

La concentración se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{P}{V}$$

Donde,

P = peso de la muestra en gramos

V = volumen final en mL

Para realizar una comparación de la actividad bactericida de los extractos se partió del mismo peso y volumen final para obtener las mismas concentraciones (Tabla 1) de los aceites esenciales con excepción del tacaco. Cómo ya se ha explicado anteriormente, al partir de la muestra fresca y luego desecada no se puede asegurar que cantidad de humedad aún quedó en el material vegetal.

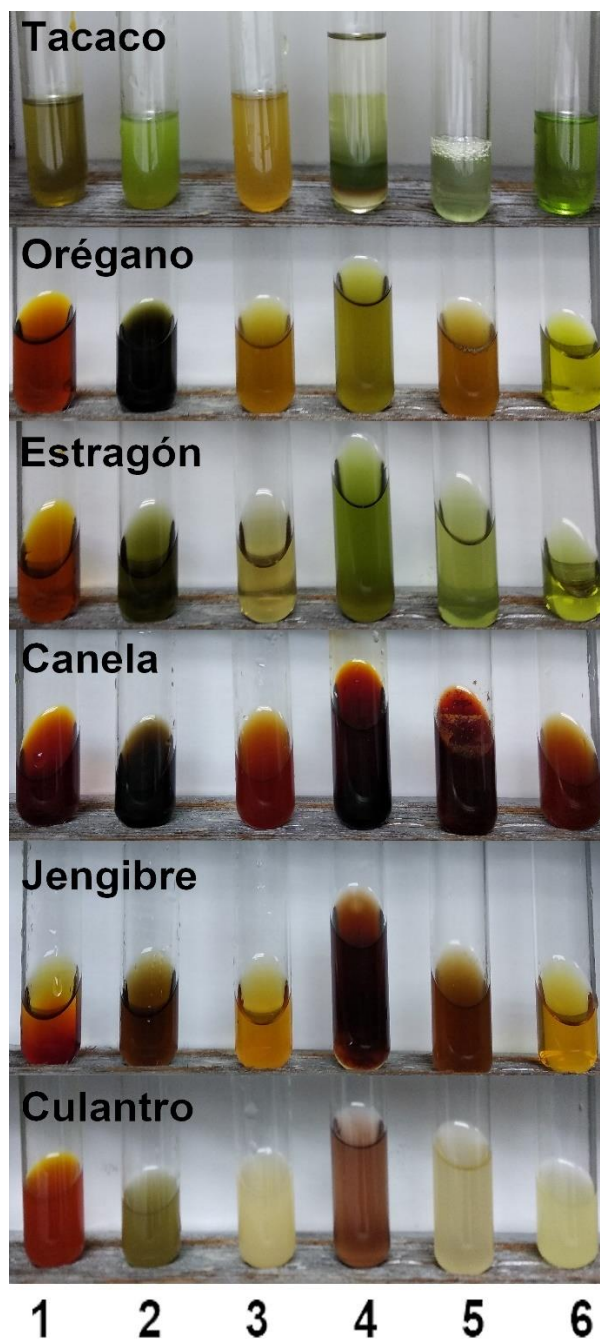
### **Pruebas fitoquímicas de identificación para las diferentes plantas**

**Figura 23** Prueba de saponinas para el extracto de tacaco



(Elaboración propia, 2019)

**Figura 24 Pruebas fitoquímicas de los aceites esenciales**



1	Dragendorff
2	Cloruro férrico
3	Schiff
4	Salkowski
5	Shinoda
6	Extracto sólo

(Elaboración propia, 2019)

**Tabla 2. Estudio fitoquímico de los extractos obtenidos**

Prueba	Extracto					
	Tacaco	Orégano	Estragón	Canela	Jengibre	Culantro
Dragendorff	-	+	+	+	+	+
Cloruro férrico	+	++	+	+	+	+
Schiff	+	+	+	++	-	-
Salkowski	+	+	++	+	++	++
Shinoda	-	+	-	+	+	-
Espuma	+	-	-	-	-	-

(Elaboración propia, 2019)

En la tabla 2 se presentan con un símbolo “-” cuando el resultado obtenido fue negativo para las pruebas, un signo “+” para los que las pruebas fitoquímicas fueron positivas, y “++” a las pruebas que corresponden al componente principal de cada planta según la literatura consultada.

Todos los extractos fueron sometidos a 6 pruebas de identificación, las cuales fueron Dragendorff, para detectar la presencia de alcaloides; Cloruro férrico, para taninos hidrolizados/condensados y fenoles; Schiff, para aldehídos; Salkowski, que indica si hay esteroides o terpenoides; Shinoda, que es una prueba para identificar flavonoides y por último la prueba de espuma que indica la presencia de saponinas.

Se consideran resultados positivos para alcaloides si se produce una coloración rojo-café para Dragendorff, en cuanto a la prueba de cloruro férrico, son taninos hidrolizados si se ve un color azul, taninos condensados si es verde y fenoles si es morado. El reactivo de Schiff produce una coloración rosada para la identificación de aldehídos. Salkowski presenta una coloración rojo-café para esteroides, y amarilla para terpenoides.

En cuanto a los flavonoides los colores observables pueden ser naranja, rojo, rosado o morado usando la prueba de Shinoda, y por último se ve espuma que persiste por 2 minutos

luego de una vigorosa agitación significa que hay saponinas. Se debió tomar en cuenta el color de cada muestra, ya que en sustancias transparentes se puede detectar fácilmente las coloraciones, sin embargo, cuando se cuenta con una muestra de diferente color, hay que saber los colores resultantes luego de la mezcla del color original y el obtenido por las pruebas de identificación.

### **Tacaco**

Para el extracto de tacaco (figura 24) las pruebas positivas fueron las de cloruro férrico con un color verde claro turbio indicando que hay presencia de taninos, sin embargo, al no ser una coloración muy intensa, la concentración de taninos es posible que sea baja, para la prueba con el reactivo de Schiff, la combinación de rosado y verde (color original del extracto) produjo como resultado el color café claro.

En la prueba de Salkowski hubo una separación de colores, y de acuerdo a la literatura, cuando esto sucede, el color que se debe revisar es el del fondo, el cual fue amarillo, lo que denota que hay terpenoides, por último, resultó positivo para saponinas (figura 23), ya que se mostró espuma persistente por más de dos minutos. (Al-Amin, Russel, Kabir, Bhattacharjee, & Hannan, 2014)

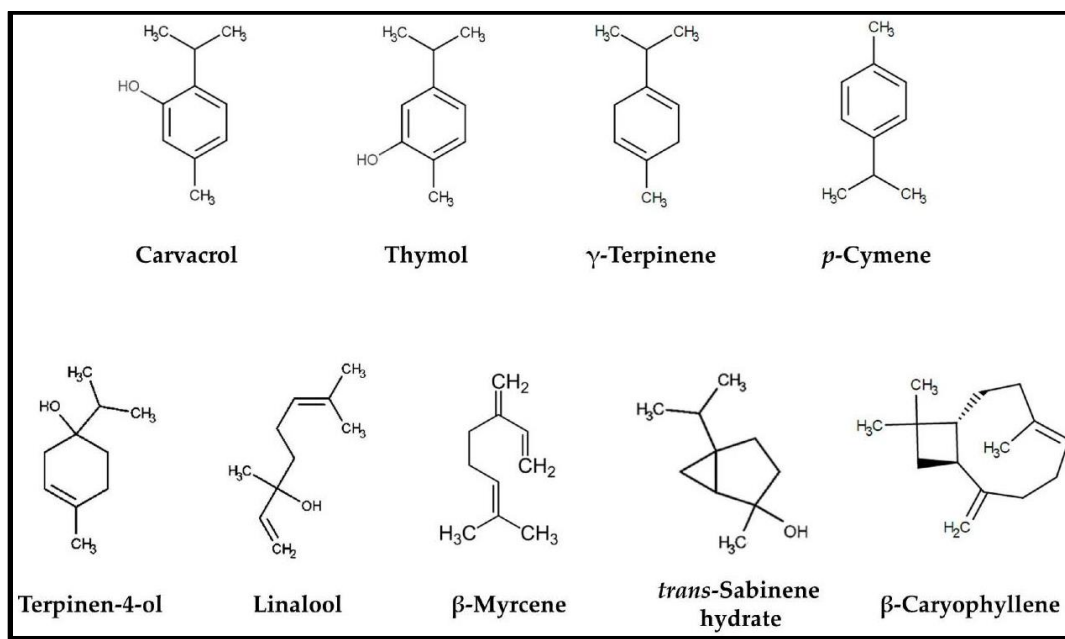
Considerando que pertenece a la misma familia que el chayote (*Sechium edule*), se considera posible predecir el tipo de metabolitos secundarios que posee, por ejemplo, en cuanto a terpenoides, podría contener cucurbitacina, sin embargo, los otros análisis fitoquímicos reportados en la literatura, no concuerdan con los componentes que reflejó el tacaco, solamente coincidieron con las saponinas y los terpenoides anteriormente mencionados. (Frías, Ramírez, de la Paz, Herrero, & Acosta, 2016)

## Orégano

El extracto de orégano posee alcaloides, taninos condensados, aldehídos, esteroides, terpenoides y flavonoides. Al igual que para el tacaco, la muestra originalmente fue de color verde, por lo cual, pruebas como la de Schiff no resultaron en color rosado, sino en café, que es la combinación de rosado y verde. Para la prueba del color es un poco ambiguo, por lo que se concluye que posee esteroides y terpenoides.

La composición del aceite esencial de orégano ha sido ampliamente estudiada. Son mezclas muy complejas de compuestos, en los cuales los componentes principales son terpenos, generalmente mono y sesquiterpenos. Los principales terpenos identificados en las diferentes especies de orégano son carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno y *p*-cymeno; mientras que terpinen-4-ol, linalool,  $\beta$ -mirceno, hidrato de *trans*-sabineno y  $\beta$ -cariofileno también están presentes (Figura 25). (Leyva-lópez, Gutiérrez-Grijalba, Vazquez-Olivo, & Basilio-Heredia, 2017)

**Figura 25** Componentes principales del orégano



(Leyva-lópez, Gutiérrez-Grijalba, Vazquez-Olivo, & Basilio-Heredia, 2017)

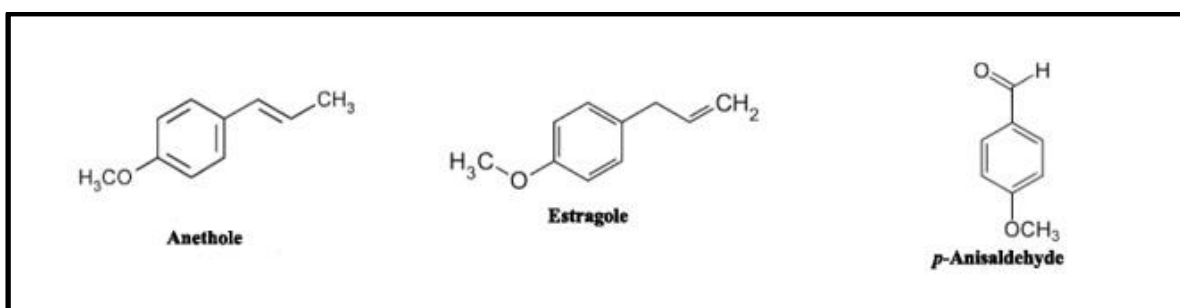
Se han realizado varios estudios para determinar y evaluar las propiedades biológicas del orégano. La mayoría de los estudios se centran en la actividad antimicrobiana, como antifúngicos, bactericidas y antivirales; Sin embargo, recientemente otras propiedades de estos compuestos han llamado la atención de los científicos. (Leyva-lópez, Gutiérrez-Grijalba, Vazquez-Olivo, & Basilio-Heredia, 2017)

### Estragón

El estragón se mostró positivo para casi todas las pruebas, con excepción de las pruebas de flavonoides y la de espuma. Para la prueba de Schiff se ve cómo el color cambió y se ve un poco café, por la combinación de colores, en cuanto a Salkowski, se puede ver una ligera coloración amarilla en el fondo de tubo de ensayo, indicando que es positivo paraterpenoides.

El estragol (figura 26) es el componente principal del aceite esencial de estragón, seguidos del anetol, y *p*-anisaldehído. Los metabolitos secundarios activos son, cumarinas (> 1%), y ácidos fenolcarbónicos. Análisis existentes del aceite esencial han arrojado como resultado los componentes principales de 3,7-dimetil-1,3,7-octatrieno (38,43%), 1S-alfa-pineno (36,96%), 1-metoxi-4- (2-propenil) -benceno (8,57%), limoneno (6,33%), 1R-alfa-pineno (3,40%), entre otros. (Long, 2019)

**Figura 26** Estructura química del estragol



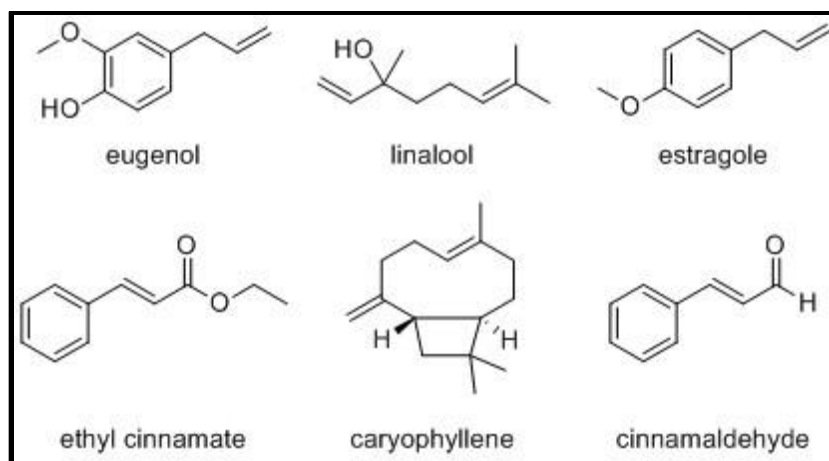
(Merck, 2019)

El estragol (1-metoxi-4- (2-propenil) benceno) es un terpenoide, y componente natural de una serie de aceites esenciales de plantas aromáticas como albahaca, estragón, anís e hinojo. Este componente ocurre naturalmente en una variedad de alimentos tradicionales, principalmente en especias y se usa como agente de saborizantes, condimentos, bebidas no alcohólicas y condimentos. Además, los extractos que contienen estragol se pueden usar en la conservación de alimentos debido a sus actividades insecticidas, antivirales, antibacterianas y acaricidas. (Kfoury, Auezova, Ruellan, & Greige-Gerges, 2015)

### Canela

Según las pruebas fitoquímicas realizadas, la canela contiene alcaloides, aldehídos, y flavonoides, en cuanto a las pruebas de Cloruro férrico y Salkowski los resultados son difíciles de determinar ya que el color obtenido para reconocer taninos y fenoles no es fácil de diferenciar, por lo cual puede contener ambos componentes. Para Salkowski hay una situación similar, debido a la coloración resultante, cabe la posibilidad de que existan esteroides y terpenoides.

**Figura 27** Estructura química de los componentes principales de la canela



(Larsen, 2015)

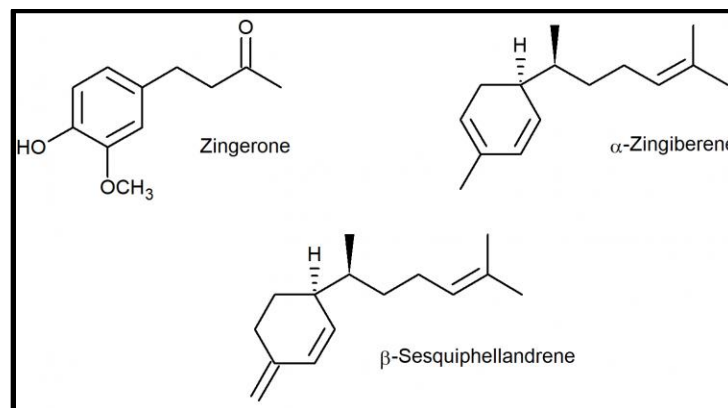
Los aceites esenciales extraídos de las cortezas comerciales de canela fueron amarillos, con notas cálidas y picantes caracterizadas simplemente como "notas de canela". El aceite esencial de refleja niveles más altos de cinamaldehído (figura 27) en comparación con sus otros componentes. Se han reportado metabolitos secundarios conformados por aldehído cinámico, eugenol y alcohol cinámico. Los aceites fueron de color naranja oscuro. (Janick & Whipkey, 2017)

## Jengibre

Para el jengibre, las pruebas positivas fueron la de alcaloides, taninos condensados, esteroides, terpenoides (por su coloración original es difícil detectar una diferencia marcada en los colores, por eso se presume que posee ambos, esteroides y terpenoides) y flavonoides.

Los rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*) son una de las especias más importantes y antiguas. El aceite esencial de jengibre comercial se caracterizó por notas cálidas, especiadas y amaderadas, con ligeras notas a limón. Los aceites eran de color amarillo pálido, líquidos de baja viscosidad. Estos aceites esenciales están dominados por el  $\alpha$ -zingibereno (figura 28) con bajo contenido de AR-cucurmeno y pequeñas cantidades de nerales y geraniales. (Janick & Whipkey, 2017)

**Figura 28** Estructura química de los componentes principales del jengibre



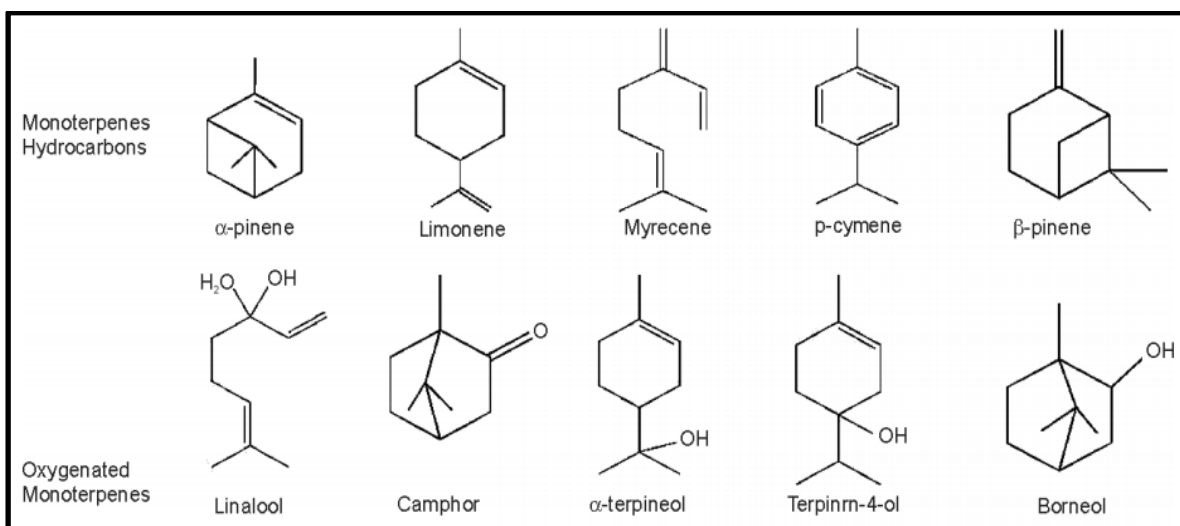
(Roger & St-GelaisA, 2017)

## Culantro

En cuanto a las pruebas fitoquímicas realizadas para el extracto de culantro, éste sólo fue positivo para 3 pruebas, se vio presencia de alcaloides, terpenoides y flavonoides, las pruebas de Schiff, Shinoda y Espuma dieron negativas, para éstas pruebas hubo un leve cambio de color en comparación con la muestra original, pero no fue significativo, por lo cual, se catalogaron cómo negativas.

Los componentes identificados para el aceite de culantro, por el análisis GC – MS realizado en el 2010 un equipo de investigadores obtuvo cómo resultado que el aceite estaba dominado por monoterpenos. Los componentes principales (figura 29) fueron linalool (73,11%) (Figura 22), p-mentha-1,4-dien-7-ol (6,51%),  $\alpha$ -pineno (3,41%) y acetato de nerilo (3,22%). (Zoubiri & Baaliouamer, 2010)

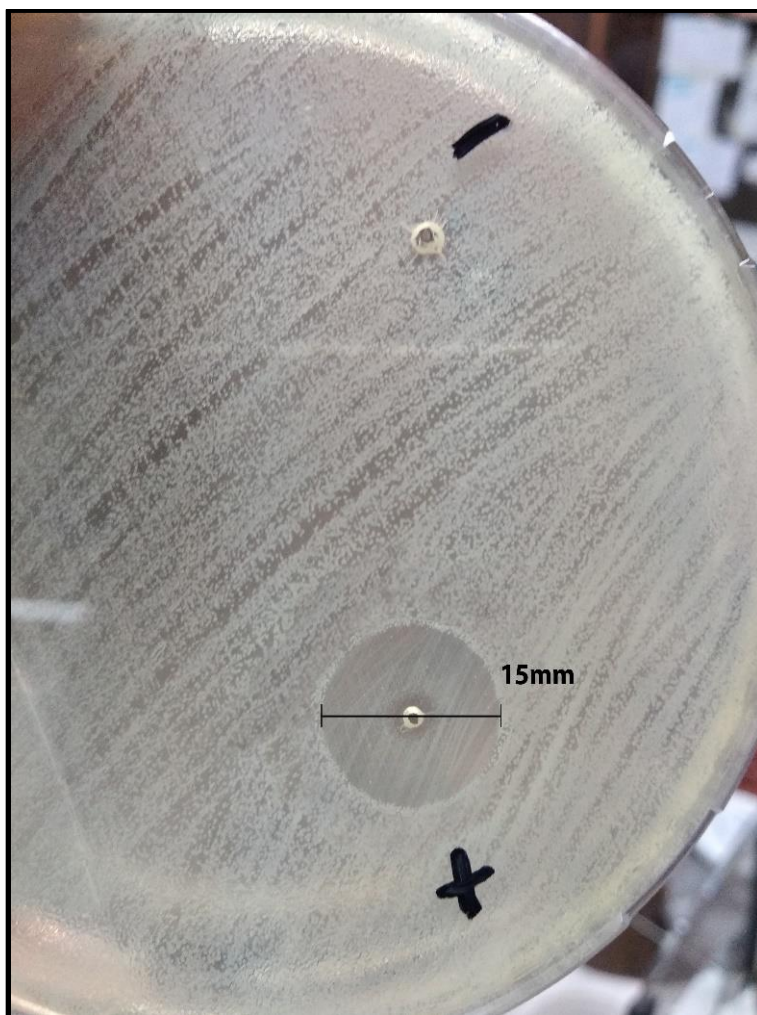
**Figura 29 Estructura química de los componentes principales del culantro**



(Vafaei, 2016)

**Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano de la cepa AOAC-113 de Escherichia coli para cada extracto obtenido individualmente.**

**Figura 30 Resultados de inhibición de Amoxicilina en solución y el blanco**



(Elaboración propia, 2019)

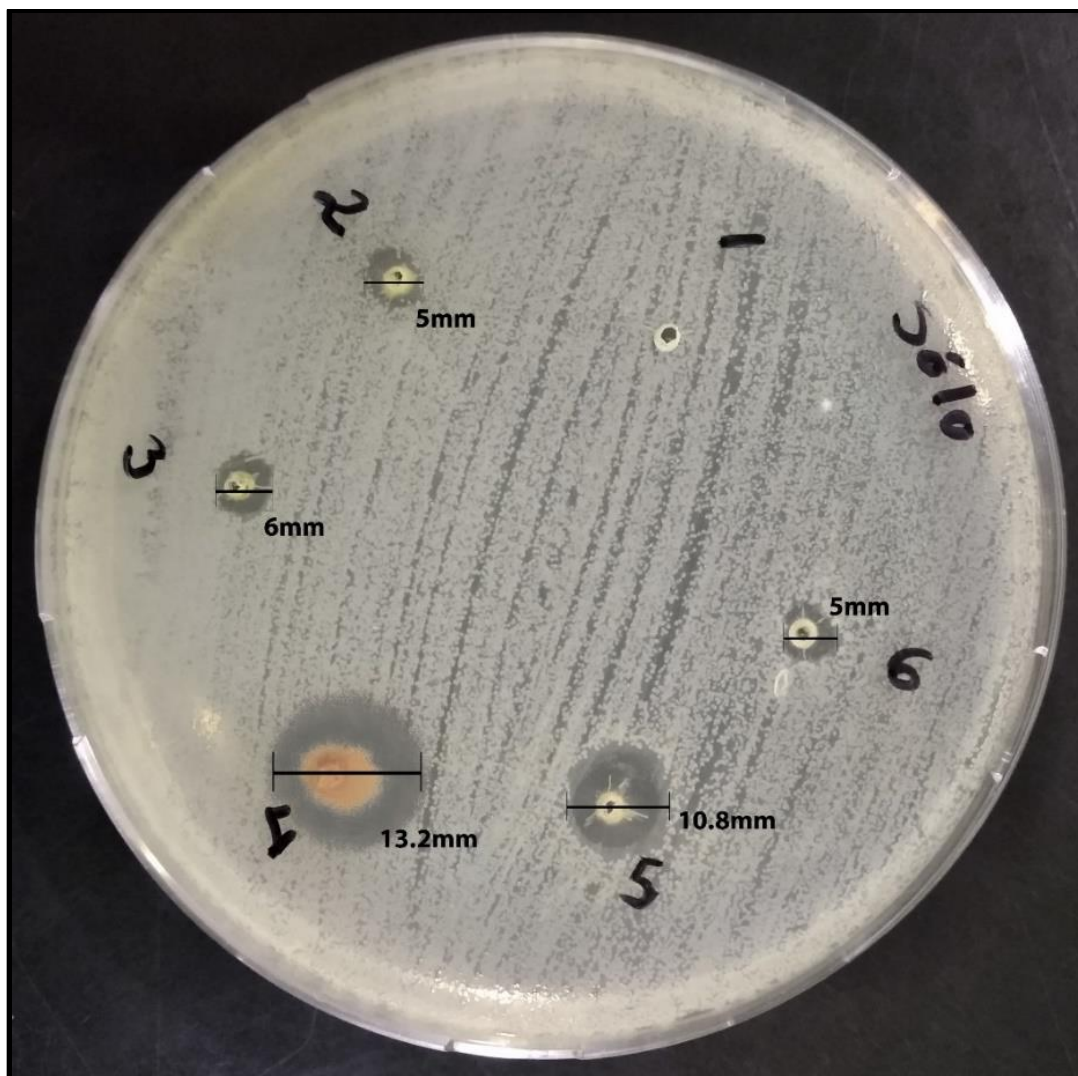
**Tabla 3. Control negativo y positivo para las pruebas de actividad bactericida**

<b>Control</b>	<b>Sustancia</b>	<b>Diámetro (mm)</b>
Positivo	Solución oral de amoxicilina	15
Negativo	Etanol	0

(Elaboración propia, 2019)

Se obtuvo un halo de inhibición 15 mm para el control positivo (figura 30 y tabla 3), que fue Amoxicilina 125mg/5mL polvo para suspensión del laboratorio MK previamente reconstituida siguiendo las instrucciones de la caja. Para el control negativo se usó como blanco etanol, el mismo etanol utilizado para la obtención de los aceites esenciales analizados. Tanto para el control negativo como para el positivo se usaron muestras de 10 $\mu$ L.

**Figura 31** Resultados de inhibición de los extractos en presencia de *E. coli*

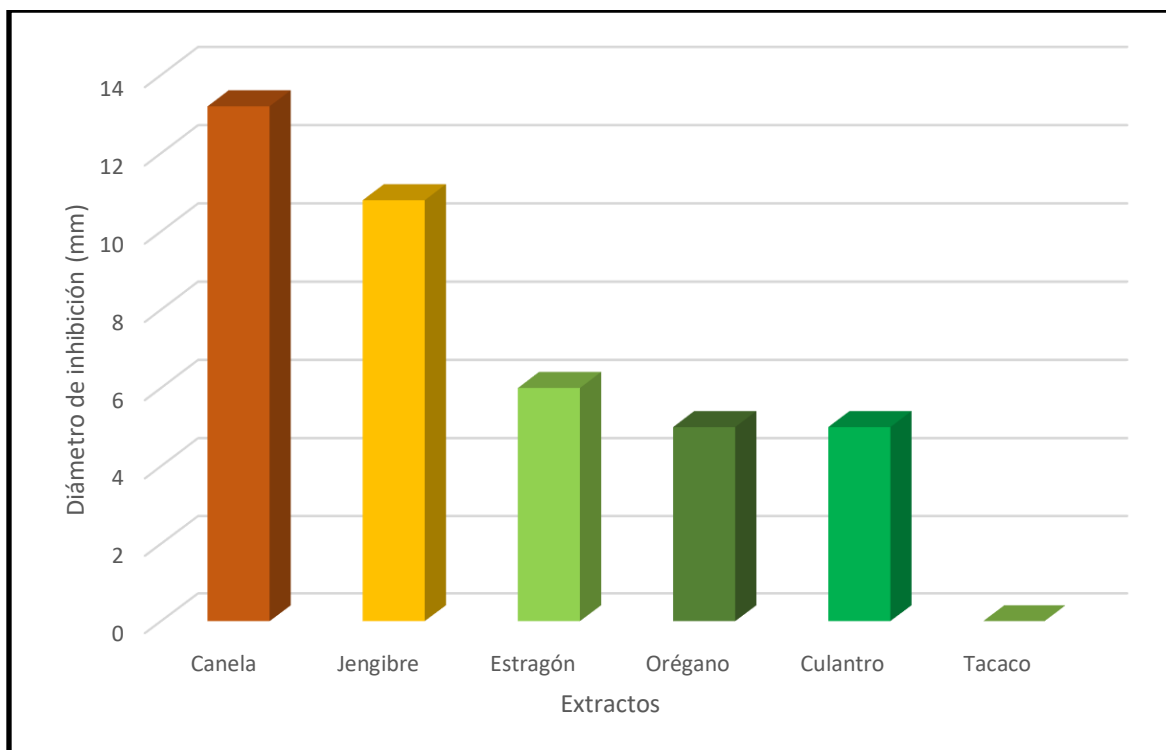


(Elaboración propia, 2019)

**Tabla 4. Mediciones de halo de inhibición de las plantas solas analizadas**

Extracto	Diámetro (mm)
Tacaco	0
Orégano	5
Estragón	6
Canela	13.2
Jengibre	10.8
Culantro	5

(Elaboración propia, 2019)

**Figura 32 Orden descendiente de los diámetros de inhibición de cada extracto solo individualmente**

(Elaboración propia, 2019)

### ***Sechium tacaco*: Tacaco**

El tacaco no mostró ningún tipo de actividad bactericida en presencia de *E. coli*, se desconoce si será efectivo contra algún otro tipo de bacteria u hongo, pero sería muy interesante que se siga estudiando éste fruto endémico de Costa Rica, ya que no se conoce mucho acerca de él. Debido a su contenido positivo de saponinas, se presume que podría ser un componente útil en la elaboración de cosméticos.

La industria cosmética es actualmente una de las secciones de la economía en rápido crecimiento en muchos países. La tendencia reciente hacia el uso de cosméticos de origen natural ha llevado a la industria a buscar alternativas a los componentes sintéticos en la formulación de productos. Los biosurfactantes como las saponinas son compuestos naturales que tienen un potencial considerable de aplicación en la formulación de cosméticos seguros y efectivos como reemplazo de los agentes tensioactivos químicos de uso común. (Gercyane, Rufino, Luna, & Sarubbo, 2018)

### ***Origanum vulgare*: Orégano**

El orégano presentó un halo de inhibición de 5mm, éste diámetro fue menor que el de amoxicilina, pero probó ser eficaz en cuanto a inhibición de crecimiento se requiere, sin embargo, el orégano y el culantro, que obtuvieron el mismo diámetro bactericida fueron los que menor actividad demostraron, a pesar de ser positiva (Figura 31).

Las hierbas y especias se han estudiado ampliamente debido a sus propiedades antipatógenas. Se han realizado numerosas investigaciones in vitro e in vivo para evaluar las posibles actividades antibacterianas, antivirales y antifúngicas de las plantas. Este tipo de estudios son de gran importancia debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, el aumento de la población con menor inmunidad y la mayor incidencia de infecciones asociadas a biopelículas resistentes a los medicamentos. (Leyva-lópez, Gutiérrez-Grijalba, Vazquez-Olivo, & Basilio-Heredia, 2017)

Según la literatura, hay estudios que se han centrado en aceites esenciales individuales y en una combinación de ellos, o mediante la extracción por varios métodos de las diferentes hierbas y especias. Las diferentes especies de orégano se encuentran entre las hierbas más estudiadas y se han utilizado diferentes composiciones en para este propósito, sin embargo, los compuestos más comunes que se encuentran en el orégano son el timol y el carvacrol. (Leyva-lópez, Gutiérrez-Grijalba, Vazquez-Olivo, & Basilio-Heredia, 2017)

El extracto de orégano se ha estudiado como agente antipatógeno en productos de carne, frutas y verduras. A veces se han usado en combinación con recubrimientos comestibles, como el caso cuando se usan en frutas y verduras después de la cosecha. Se toman precauciones en la posible modificación de las propiedades organolépticas de dichos productos cuando se agregan con aceites esenciales. Por otro lado, en algunos casos, la capacidad antioxidante del producto final aumenta, lo que se considera un efecto secundario positivo del uso de estos compuestos. (Hernández, et al., 2017)

El orégano pertenece a la familia *Lamiaceae* y su principal especie representativa es *Origanum vulgare*. El contenido de *O. vulgare* del aceite esencial fluctúa de 0.5-2% hasta 7%, y sus componentes principales son los isómeros fenoles carvacrol y timol, así como sus precursores monoterpenos p-cimeno y  $\gamma$ -terpinene en una proporción más baja. (Sakkas & Papadopoulou, 2017)

Se informan diversas concentraciones de los principales componentes, llegando a 80% y 64% para carvacrol y timol, respectivamente, y hasta 52% para cada una de sus moléculas precursoras. El contenido de carvacrol de diferentes quimiotipos de *O. vulgare* es variable y puede llegar hasta el 95%. En general, la concentración de aceite esencial depende de la especie, la temporada de recolección de la planta, la posición geográfica, la parte de la planta que se utiliza y el método de extracción del aceite. (Sakkas & Papadopoulou, 2017)

El efecto antimicrobiano del aceite de orégano está acreditado para el carvacrol y el timol, y su espectro antimicrobiano es amplio, incluidas las bacterias (*S. aureus* resistente a la meticilina, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157: H7, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus carvatus* y *Lactobacillus sakes*), hongos (*Aspergillus spp.* y *Candida spp.*) y parásitos (*Blastocystis hominis*, *Entamoeba hartmanni* y *Endolimax nana*). (Sakkas & Papadopoulou, 2017)

### ***Artemisia dracunculus*: Estragón**

El extracto de estragón fue el segundo en orden ascendente, con un diámetro de inhibición de 6mm (Figura 31, 32; Tabla 4). Se ha visto que en previos estudios realizados internacionalmente el estragón tiene una mayor actividad bactericida, la diferencia de esos estudios con el realizado aquí, es que los extractos fueron realizados en metanol, no etanol.

Varios estudios han mostrado que el extracto de metanol de *A. dracunculus* es más efectivo contra algunos organismos (hubo inhibición de *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Shigella*, *L. monocytogenes*) que los extractos de cloroformo o acetona. (Long, 2019)

La actividad antibacteriana del aceite esencial de estragón se atribuye a su alto contenido en estragol, mientras que el espectro antimicrobiano está restringido a bacterias específicas (*Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *A. hydrophila*, *B. cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter spp.*, *Listeria spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens* e *Y. enterocolitica*) y hongos (*Candida spp.*, *Rhodotorula spp.* y *Saccharomyces cerevisiae*). (Sakkas & Papadopoulou, 2017)

### ***Cinnamomum verum*: Canela**

El aceite esencial de canela fue el que mostró la mayor capacidad bactericida de todos los extractos (Figura 31, 32; Tabla 4). Éste obtuvo un diámetro de 13.2 mm, el cual fue bastante cercano al de la amoxicilina utilizada, mostrando una pequeña diferencia de 1.8 mm.

Las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de canela se han identificado contra las bacterias transmitidas por los alimentos, en este estudio el aceite esencial de canela demostró ser efectivo contra *E. coli*, el cuál es un patógeno comensal, oportunista y especializado. En la Figura 20 y la Tabla 4 podemos observar el halo de inhibición resultante, en este caso fue el de mayor diámetro de todos los extractos analizados.

Una extensa revisión de la literatura documentó que una variedad de aplicaciones y exposiciones del aceite de canela fue eficaz contra una gran cantidad de levaduras, hongos y bacterias gram positivas y gram negativas. Entre los organismos inhibidos por el aceite de corteza de canela se encuentran *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella spp.* (Baker & Grant, 2018)

Se han realizado comparaciones de la actividad antimicrobiana de 51 aceites esenciales diferentes, y se ha mostrado que el aceite de canela, usado con o sin un agente dispersante, fue efectivo contra levaduras y un rango de bacterias gram positivas y gram negativas. De varios aceites esenciales probados a concentraciones de 500 µg / ml, el aceite de canela fue el más efectivo contra *Pseudomonas aeruginosa* con una reducción del crecimiento del 85.8% y *E. coli*, con una reducción del crecimiento del 100%. (Baker & Grant, 2018)

En comparaciones que han usado 11 aceites esenciales diferentes analizados, el de canela proporcionó el control más efectivo sobre *A. flavus* y se mostró sin fitotoxicidad para *Zea mays*. Cuando se probó contra bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, se descubrió que el aceite de canela era muy efectivo con una concentración inhibitoria mínima

del 1,25% (v/v) contra *Bacillus sp.*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *Klebsiella sp.* (Baker & Grant, 2018)

Las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de canela se han identificado contra las bacterias transmitidas por los alimentos, pero su eficacia aún no se ha determinado por completo. Se ha visto que el aceite esencial de canela en concentraciones de 2% y 4% ha demostrado ser efectivo contra *Salmonella*. Sin embargo, su efecto sobre un patógeno comensal, oportunista y especializado como *E. coli* no se ha descrito completamente, a pesar de que se ha visto su efectividad contra ésta bacteria. (Adams, Johnson, Santos, & Santos, 2017)

La propiedad antimicrobiana del aceite esencial de canela al 4% ha mostrado mayor efecto antimicrobiano contra *Escherichia coli* en comparación con 2, 1 y 0,5%. Se ha visto que concentraciones del 2% de extractos de canela han mostrado una eficacia creciente contra *Escherichia coli*. La concentración al 2% ha mostrado una mayor zona de inhibición contra *E. coli* que los tratamientos con ampicilina. (Adams, Johnson, Santos, & Santos, 2017)

### ***Zingiber officinale*: Jengibre**

El jengibre fue el segundo extracto más fuerte en cuanto a capacidad bactericida se refiere (Figura 31, 32; Tabla 4), mostrando un diámetro de 10.8 mm, el cual fue considerablemente mayor al de los extractos de estragón, orégano y culantro, esto comparando sólo los extractos que si presentaron inhibición ante la cepa de *E. coli*, ya que el tacaco no presentó ningún tipo de inhibición.

Se ha visto que el jengibre extraído por hidrodestilación ha sido el que presenta mayor inhibición del crecimiento de *B. cereus*. Además, *S. aureus* también ha sido comprobado que fue inhibido por el jengibre. *L. monocytogenes* ha sido la bacteria más sensible al aceite esencial de jengibre. Las bacterias Gram-positivas son más sensibles al aceite vegetal y al extracto que las bacterias Gram-negativas, a pesar de que sí muestra inhibición en éstas

bacterias, también presentó inhibición ante *E. coli*. (Norajit, Laohakunjit, & Kerdchoechuen, 2017)

Los diversos grados de sensibilidad de los organismos de prueba bacterianos pueden deberse tanto a la tolerancia intrínseca de los microorganismos como a la naturaleza y las combinaciones de fitocompuestos presentes en el aceite esencial. El procedimiento de fraccionamiento guiado por bioensayo mostró que el aceite esencial de la planta era rico en terpenos (monoterpenos, monoterpénos oxigenados y sesquiterpenos, el principal es el zingibereno). En la actualidad, sin embargo, el modo de acción de los componentes terpénicos sobre los microorganismos no se comprende completamente. (Norajit, Laohakunjit, & Kerdchoechuen, 2017)

### ***Coriandrum sativum*: Culantro**

El culantro se encuentra en el mismo nivel que el orégano (Figura 31, 32; Tabla 4), ambos presentaron un halo de inhibición de 5mm, a pesar de no ser un valor muy alto en comparación con los demás extractos que mostraron actividad bactericida, se considera un éxito el hecho de que tuvieron inhibición bacteriana positiva.

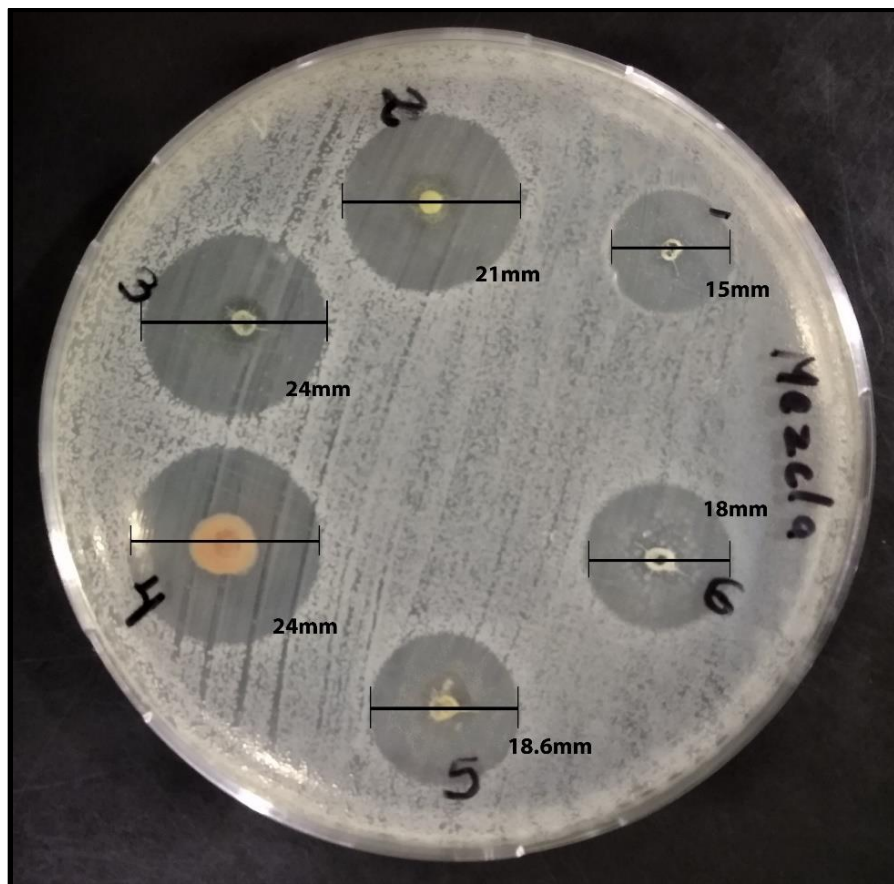
Se sabe que *C. sativum* produce aceites esenciales con actividad antimicrobiana contra varios microorganismos ambientales y oportunistas como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Acinetobacter baumannii*. También hay muchos datos que confirman la actividad antibacteriana contra aislados clínicos de *E. coli* resistentes a múltiples fármacos que se inhiben o mueren in vitro a concentraciones inferiores al 1% v/v de aceite esencial. (Scazzocchio, et al., 2017)

Ensayos de yoduro de propidio y microscopía electrónica han sugerido una actividad positiva del aceite sobre la permeabilidad de la membrana. Se cree que la susceptibilidad al aceite de culantro de las cepas Gram negativas (*E. coli*) está relacionada con la permeabilidad de la membrana alterada que influye en otras funciones celulares, como el potencial de

membrana y las actividades de la bomba respiratoria o de flujo de salida. Además, se ha informado que existe una interacción sinérgica entre aceites esenciales y antibióticos. (Scazzocchio, et al., 2017)

**Pruebas de inhibición de crecimiento bacteriano de la cepa AOAC-113 de *Escherichia coli* para cada extracto obtenido en combinación con 10µL de amoxicilina.**

**Figura 33      Resultados de inhibición de los extractos en conjunto con el antibiótico en presencia de *E. coli***

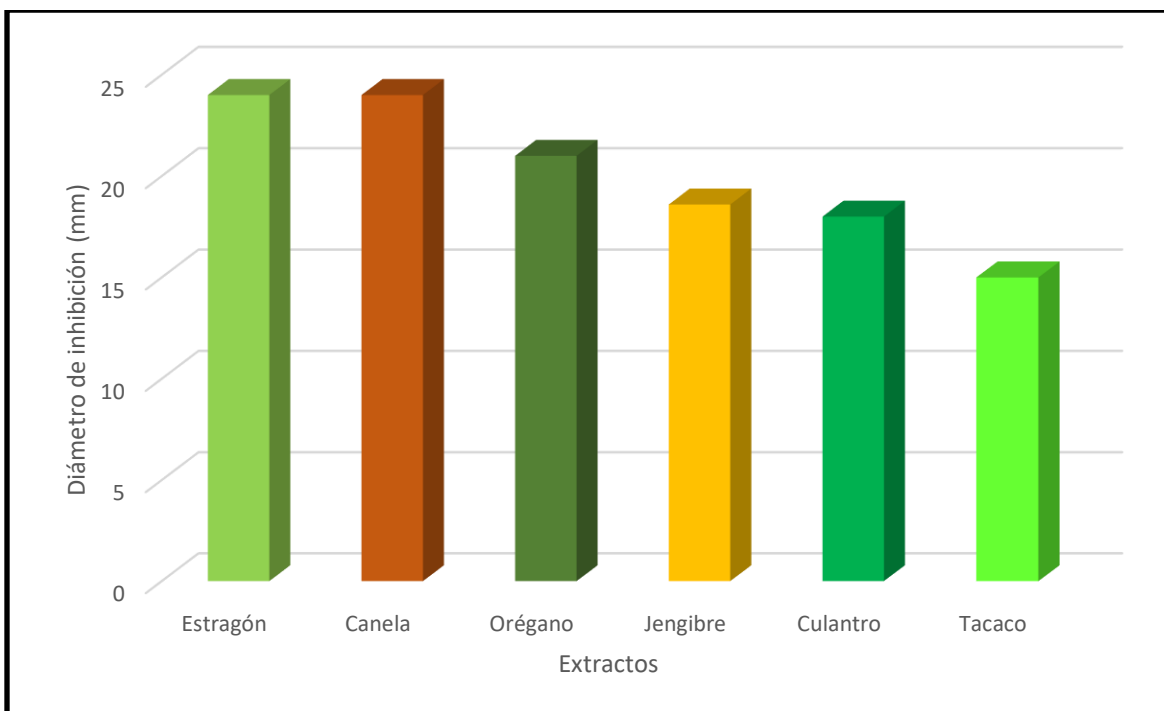


(Elaboración propia, 2019)

**Tabla 5. Mediciones de halo de inhibición de los extractos + antibiótico**

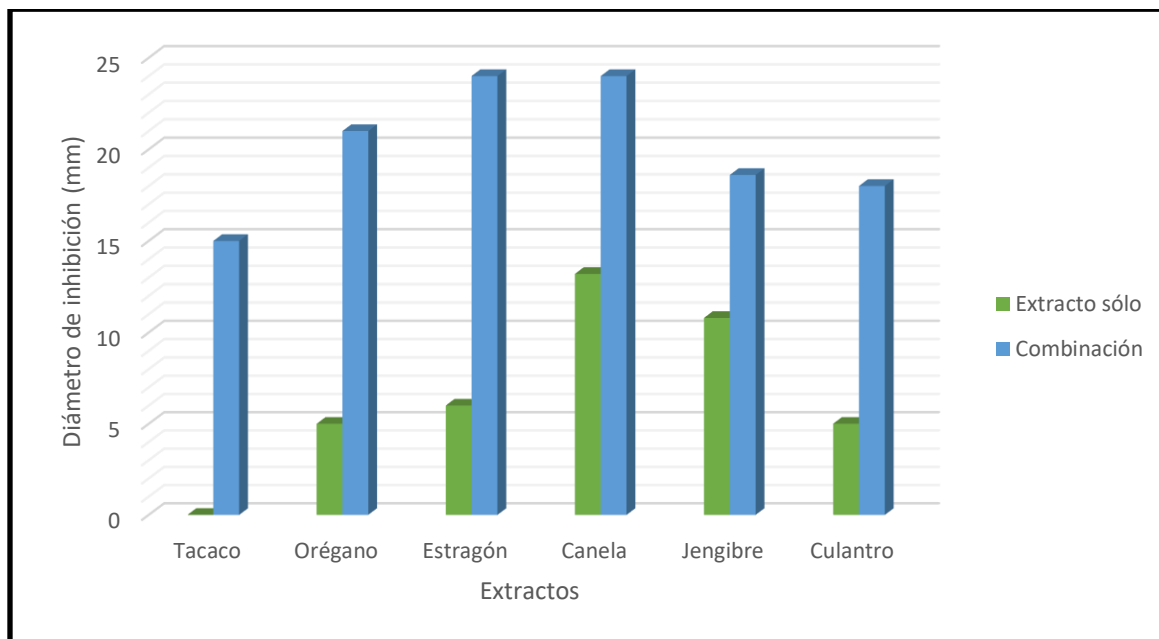
<b>Extracto</b>	<b>Diámetro (mm)</b>
Tacaco	15
Orégano	21
Estragón	24
Canela	24
Jengibre	18.6
Culantro	18

(Elaboración propia, 2019)

**Figura 34 Orden descendiente de los diámetros de inhibición de cada extracto en combinación**

(Elaboración propia, 2019)

**Figura 35** Orden descendiente de los diámetros de inhibición de cada extracto en combinación y solos



(Elaboración propia, 2019)

La combinación de los extractos se realizó para analizar si se podía presentar sinergia al realizar una combinación de cada aceite esencial con la amoxicilina, y, por ende, poder considerar éstos extractos como posibles potenciadores de Antibioticoterapia y así utilizar una menor cantidad de antibiótico, u obtener una respuesta más fuerte al tratamiento de infecciones.

En la figura 33 y la tabla 5 podemos observar que hubo un considerable aumento de los halos de inhibición obtenidos para cada extracto, excepto para el aceite esencial de tacaco, el cual al no tener actividad bactericida mostró el mismo diámetro de inhibición que el control positivo utilizando amoxicilina (Figura 30).

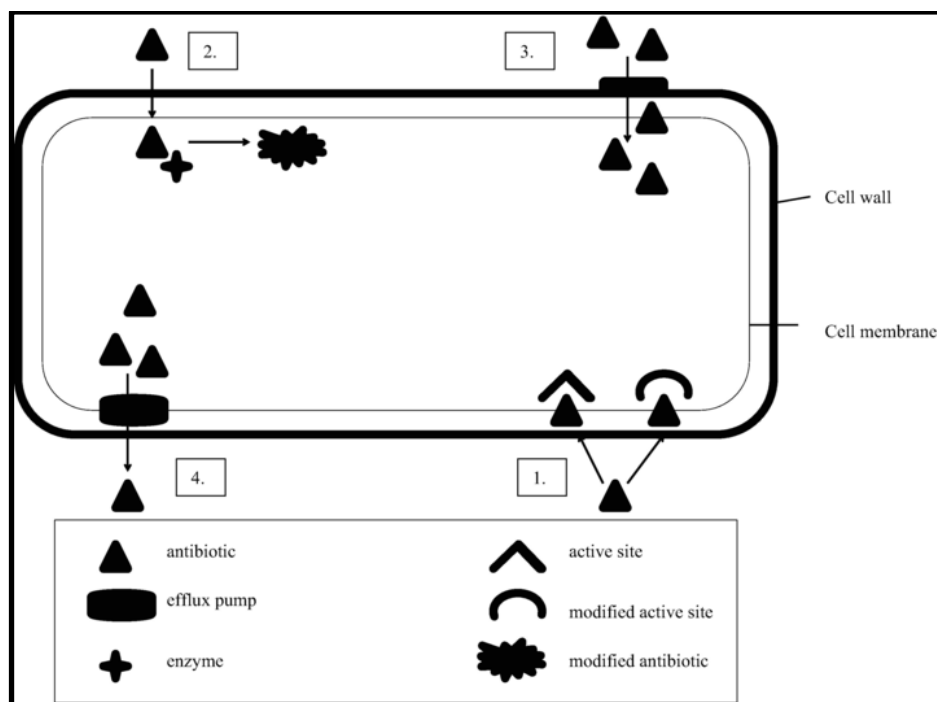
Al realizar la combinación de cada planta medicinal con 10 $\mu$ L de amoxicilina 125 mg/5 mL se ve que el orden descendente cambió (Figura 34), ahora es el siguiente: estragón

y canela comparten la posición más alta, seguidos de orégano, jengibre, culantro y por último tacaco, que como ya fue mencionado anteriormente, no presentó actividad propia ante *E. coli*.

Cuando comparamos la diferencia entre la potencia que presentaron los extractos solos, junto con la mezcla con el antibiótico (Figura 35) podemos ver que a pesar de que la canela y el estragón tuvieron el mismo diámetro de inhibición en la mezcla, el estragón fue el extracto que tuvo un mayor nivel de crecimiento, ya que éste aceite tuvo una diferencia de 18mm, siendo la mayor diferencia de todos los extractos solos.

Según la literatura hay una serie de investigaciones científicas han confirmado la actividad sinérgica de los extractos de muchas plantas y antibióticos, el siguiente paso es investigar los mecanismos de la acción sinérgica. Se cree que los compuestos activos de las plantas modifican e inhiben los mecanismos de resistencia adquirida en las células bacterianas y, por lo tanto, exhiben un efecto sinérgico con los antibióticos. (Stefanović, 2017)

**Figura 36 Mecanismos de actividad antibacteriana sinérgica**



(Stefanović, 2017)

El mecanismo de acción sinérgica se explica por (figura 36): (1) modificación de sitios activos en células bacterianas, (2) inhibición de enzimas, que catalizan la degradación o modificación de antibióticos, (3) aumento de la permeabilidad de la membrana y (4) inhibición de las bombas de salida. (Stefanović, 2017)

Los beneficios de la sinergia entre las plantas seleccionadas y la amoxicilina son grandes, esto puede llevar a la menor utilización de antibióticos, lo cual puede reducir la utilización de la antibioticoterapia, no sólo con amoxicilina, sino con otros antibióticos, pero para esto se requieren de pruebas más extensas con diferentes tratamientos.

Se considera que todas las plantas seleccionadas, con excepción de tacaco, son muy buenas opción para realizar sinergia con la amoxicilina, ya que potencian la acción inhibitoria ante *E. coli*, esto puede ayudar a la medicina costarricense exponencialmente, pero aún se requiere de más estudios para lograr utilizar éstas pruebas en humanos.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

La canela mostró la mayor capacidad antimicrobiana en presencia de *Escherichia coli* con un diámetro de halo de inhibición de 13.2mm, por lo tanto responde a la pregunta inicial, siendo el extracto que mostró mayor potencia bactericida de los 6 extractos analizados.

El extracto de tacaco no demostró actividad bactericida para *E. coli*. Éste extracto no logró ninguna inhibición bacteriana.

Según el diámetro de inhibición bacteriana observado, el orden descendente de potencia bactericida de los extractos es: canela, jengibre, estragón, orégano/culantro (mismo diámetro) y tacaco (que no presentó ninguna actividad)

El componente principal del aceite esencial de canela es el cinamaldehído según ha sido reportado por la literatura, el cuál es el responsable de su alta actividad bactericida, color y aromaticismo, y se obtuvo que el grupo de componentes más importantes fueron los aldehídos.

El linalool, un terpenoide, es el metabolito secundario más importante reportado por la literatura para el extracto de culantro, pero también posee la presencia de otros componentes como alcaloides y taninos

En la extracción de estragón, su principal grupo fueron los terpenoides, y según la literatura, el componente estragol es el más importante.

El orégano presentó alto contenido de terpenoides, según la literatura el carvacrol es el principal, clasificado como su componente más importante.

El aceite esencial de jengibre contiene como grupo principal los terpenoides, según la literatura el principal es el zingibereno.

Todos los extractos mostraron una difusión de disco menor al del antibiótico para la inhibición de la cepa de *E. coli* utilizada.

El aceite esencial de canela y el de estragón fueron los extractos que mostraron el halo de inhibición de mayor diámetro en la mezcla con la suspensión oral de amoxicilina en presencia de la cepa analizada de *E. coli*.

Todos los extractos mostraron sinergia al ser combinados con la suspensión de amoxicilina aumentando el halo de inhibición en presencia de la cepa utilizada de *E. coli*.

El estragón fue el que tuvo mayor aumento del diámetro de inhibición al combinarlo con amoxicilina.

El uso del aceite esencial de canela fue el que demostró mayor inhibición bacteriana, tanto como extracto sólo y como combinación con amoxicilina, éste puede ser una importante alternativa en la batalla contra *E. coli*, pero se requiere de más estudios para poder identificar la concentración óptima para su utilización como tratamiento antibacteriano.

Se rechaza la hipótesis planteada inicialmente, ya que no todos los extractos tuvieron actividad bactericida positiva contra *E. coli*.

## **Recomendaciones**

### **Universidad Internacional de las Américas**

Se recomienda al cuerpo docente encargado de impartir cursos como Farmacognosia, Toxicología y Farmacología, incorporar en los programas de cada uno de ellos, experimentos nuevos usando diferentes bacterias para incentivar la búsqueda de posibles alternativas de tratamientos para evitar el uso de antibióticos y así poder evitar los riesgos de aumentar la resistencia a antibióticos que es un creciente problema de interés mundial.

Debe considerarse implementar un programa de ética que permita realizar estudios cuantitativos más amplios.

Se le recomienda a la institución realizar convenios con la UCR, INISA, LEBi y laboratorios como MicroLabs, con el fin de poder obtener investigaciones más completas y actualizadas para poder realizar estudios con muestras humanas o animales de laboratorio.

Es imperativo que la universidad valore adquirir equipo de laboratorio necesario para la elaboración de investigaciones más especializadas, para las cuales se necesitan cámaras de flujo laminar, rotavapores, cámaras de incubación con temperatura regulable, equipo de esterilización entre otros.

### **Estudiantes de farmacia**

Se les recomienda realizar proyectos de investigación cuantitativos con el fin de generar resultados palpables y generar posibles nuevos tratamientos o descubrir nuevos extractos que puedan presentar un impacto en el mundo farmacéutico y en el área de la salud en general.

## **Farmacéuticos**

Los farmacéuticos como profesionales de la salud deben mantenerse en constante actualización, muchas veces los productos naturales no son considerados como alternativa de tratamientos farmacológicos, y por lo tanto no se estudian con mucha amplitud. Se debe tomar en cuenta que en muchos casos las terapias farmacológicas requieren ajustes especiales con el fin de asegurar la eficacia y seguridad de cada paciente.

## **Colegio de farmacéuticos**

Llevar a cabo seminarios actualizados en el área de farmacognosia para abordar aspectos como los ajustes terapéuticos que se pueden realizar en pacientes con características fisiológicas y fisiopatología especializadas.

## **Médicos**

Limitar el uso de antibióticos para pacientes a los que se les haya realizado exámenes de laboratorio y se conozca el patógeno específico para lograr la selección del tratamiento óptimo

Tomar en cuenta los extractos de plantas medicinales, evitando utilizar antibióticos de amplio espectro que empeoran la aparición de bacterias multirresistentes.

## **Población en general**

Seguir las indicaciones terapéuticas brindadas por un profesional de la salud en cuanto a cantidad y frecuencia de la ingesta de medicamentos, y bajo toda circunstancia evitar la automedicación.

En cualquier momento de duda, deben solicitar la ayuda de un farmacéutico.

### **Área investigativa**

Con respecto al desarrollo de nuevos productos farmacológicos, se necesita que se promueva la investigación de terapias alternativas, no sólo para combatir la resistencia antibiótica, sino también para encontrar productos con menor toxicidad, eventos adversos y en muchos casos eliminar la adicción, para esto, se debe aumentar el presupuesto designado al área de investigación.

**REFERENCIAS**

- Acosta, M. (2004). Actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano. *Tesis. Licenciatura en Farmacia. UNIBE*, Tutor: Oscar Castro Castillo.
- Adams, V., Johnson, A., Santos, F., & Santos, A. (2017). The Effect of Cinnamon Essential Oil on Escherichia coli. *The FASEB journal*, 50-62.
- Agarwal, S., Yewale, V., & Dharmapalan, D. (2015). Antibiotics Use and Misuse in Children: A Knowledge, Attitude and Practice Survey of Parents in India. *Journal of clinical diagnostic research*, 21-24.
- Al-Amin, B., Russel, S., Kabir, S., Bhattacharjee, R., & Hannan, J. (2014). Phytochemical Screening and Evaluation of Analgesic Activity of *Oroxylum indicum*. *Indian J Pharm Sci*, 571-575.
- Alva, D. (5 de Mayo de 2013). *METABOLITOS SECUNDARIOS*. Obtenido de Scribd: <https://es.scribd.com/document/159381861/METABOLITOS-SECUNDARIOS>
- Aminov, R. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in microbiology*, 1-7.
- Aminov, R. (2016). History of antimicrobial drug discovery – Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 1-16.
- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle,. *Medicinal & Aromatic Plants*, 1-6.
- Baker, B., & Grant, J. (2018). Cinnamon & Cinnamon Oil Profile. *New York State IPM Program*, 1-16.
- Bird, K., Boopathy, R., Nathaniel, R., & LaFleur, G. (2019). Water pollution and observation of acquired antibiotic resistance in Bayou Lafourche, a major drinking water source in Southeast Louisiana, USA. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-13.
- Caban, M., Bialk-Bielinska, A., Stepnowski, P., & Kumirska, J. (2016). Current Issues in Pharmaceutical Residues in Drinking Water. *Current Analytical Chemistry*, 249-257.
- Chen, W., Tang, H., Jiang, N., Zhong, Q., Hu, Y., Chen, H., & Chen, W. (2019). Antibacterial Effect of Black Pepper Petroleum Ether Extract against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Quality*, 1-10.

- Chibueze, S., & Aseibai, E. (2018). Antibacterial and Synergistic Activities of Methanolic Leaves Extract of Lemon Grass (*Cymbopogon citratus*) and Rhizomes of Ginger (*Zingiber officinale*) against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *Acta Scientific Microbiology*, 26-30.
- Conrad, J. (2017). TACACO VINES GONE WILD. *Naturalist Newsletter*, 1-3.
- Darfeuille-Michaud, A. (2015). Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int. J. Med. Microbiol*, 185-193.
- Del Ángel, O., León-García, E., Vela-Gutiérrez, G., De la Cruz, J., García, R., & García, H. (2017). Chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Swartz). *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health*, 979-989.
- Diaz-Sanchez, S., D'Souza, D., Biswas, D., & Hanning, I. (2015). Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. *Poultry Science*, 1419-1430.
- Durand, G., Raoult, D., & Dubourg, G. (2018). Antibiotic discovery: History, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1-35.
- Economou, V., & Gousia, P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*, 49-61.
- El Atki, Y., Aouam, I., El Kamari, F., Taroq, A., Nayme, K., Timinouni, M., . . . Abdellaoui, A. (2019). Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J Adv Pharm Technol*, 63-67.
- El Fawal, G., Omer, A., & Tamer, T. (2019). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities for cellulose acetate films incorporated with Rosemary and Aloe Vera essential oils. *J Food Sci Technol*, 1-9.
- Fleece, M., Nshama, R., Walongo, T., Kimathi, C., Gratz, J., Rowgawski, E., . . . Platts-Mills, J. (2019). Longitudinal Assessment of Antibiotic Resistance in Fecal *Escherichia coli* in Tanzanian Children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1110-1114.
- Frías, J., Ramírez, G., de la Paz, C., Herrero, C., & Acosta, Y. (2016). *Sechium edule* (jacq) sw: potencia fitoterapéutica como agente antibacteriano. *MediSur*, 124-126.

- Gercyane, K., Rufino, R., Luna, J., & Sarubbo, L. (2018). Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics. *Biotechnology Progress*, 40-52.
- Ghosh, C., Sarkar, P., Issa, R., & Haldar, J. (2019). Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance. *Trends in microbiology*, 323-338.
- Gidaya, N., Berger, A., Altincatal, A., Wang, R., T, B., Gillard, P., & Lodise, T. (2018). Impact of Delayed Appropriate Antibiotic Therapy on Patient Outcomes by Antibiotic Resistance Status From Serious Gram-negative Bacterial Infections. *Southern Society for Clinical Investigation*, 103-109.
- Gill, E., Franco, O., & Hancock, R. (2014). Antibiotic Adjuvants: Diverse Strategies for Controlling Drug Resistant Pathogens. *Canadian Institutes for Health*, 1-49.
- Golkar, Z., Bagazra, O., & Pace, D. (2015). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *journal of infectious diseases*, 129-136.
- Granados-Chinchilla, F. (2017). A Review on Phytochemicals (Including Essential Oils and Extracts) Inclusion in Feed and Their Effects on Food Producing Animals. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 1-11.
- Heinrich, M., & Jäger, A. (2015). *Ethnopharmacology*. Oxford: Wiley Blackwell.
- Hernández, H., Fraňková, A., Sýkora, T., Klouček, P., Kouřimská, L., Kučerová, I., & Banout, J. (2017). The effect of oregano essential oil on microbial load and sensory attributes of dried meat. *J. Sci. Food Agric.*, 82-87.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. México: McGrawHill.
- Hub, E. S. (2019). Antibiotics in water and the risk of drug-resistant bacteria. *The European Commission's science and knowledge service*, 1-8.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 1-7.
- Janick, J., & Whipkey, A. (2017). Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar. *Issues in new crops and new uses*, 338-342.
- Kaper, J., Nataro, J., & Mobley, H. (2014). PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. *Nature reviews: Microbiology*, 123-138.

- Kfoury, M., Auezova, L., Ruellan, S., & Greige-Gerges, H. (2015). Complexation of estragole as pure compound and as main component of basil and tarragon essential oils with cyclodextrins. *Carbohydrate Polymers*, 156-164.
- Kuehn, M., Heuser, J., Normark, S., & Hultgren, S. (2016). P pili in uropathogenic E. coli are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature*, 252-255.
- Larsen, J. (2015). *PREVALIZACI3N DE UN M3TOD0 DE AN3LISIS DE ACEITES ESENCIALES MEDIANTE CROMATOGRAF3A DE GASES*. Tarragona: Universitat Rovira I Virgil.
- Leyva-l3pez, N., Guti3rrez-Grijalba, E., Vazquez-Olivo, G., & Basilio-Heredia, J. (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 989-1002.
- Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M., Chi, F., Cravens, R., . . . Gay, C. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary Research*, 49-79.
- Long, H. (2019). Taragon. *Philippine medicinal plants*, 1-3.
- Low, W., Kenward, K., Britland, S., Amin, M., & Martin, C. (2016). Essential oils and metal ions as alternative antimicrobial agents: a focus on tea tree oil and silver. *International Wound Journal*, 1-16.
- Ma, L., Li, B., & Tong, Z. (2018). New insights into antibiotic resistome in drinking water and management perspectives: A metagenomic based study of small-sized microbes. *Water research*, 191-201.
- Mathers, A., Peirano, G., & Pitout, J. (2015). Chapter Four - Escherichia coli ST131: The Quintessential Example of an International Multiresistant High-Risk Clone. *Advances in Applied Microbiology*, 109-154.
- McLellan, J., Pitcher, J., Ballard, S., Grabsch, E., Bell, J., Barton, M., & Grayson, L. (2018). Superbugs in the supermarket? Assessing the rate of contamination with third-generation cephalosporin-resistant gram-negative bacteria in fresh Australian pork. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7-30.

- Merck. (2019). *Estragole*. Recuperado el 16 de Setiembre de 2019, de Merck: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/estragole1482014067011?lang=en&region=CR>
- Morales, J. (1994). Morfología general del tacaco, *Sechiun tacaco* (Cucurbitaceae). *Biología tropical*, 1-13.
- Mukherjee, P., Venkatesh, P., & Ponnusankar, S. (2017). Ethnopharmacology and integrative medicine – Let the history tell the future. *J Ayurveda Integr Med*, 100-109.
- Nichols, L. (2019). Step-by-Step Procedures for Rotary Evaporation. *Chemistry libretexts*, 1-9.
- Nicolaou, K., & Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The journal of antibiotics*, 153-184.
- Norajit, K., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2017). Antibacterial Effect of Five Zingiberaceae Essential Oils. *molecules*, 2047-2060.
- Nyino, I., Atu, B., & Oluma, H. (2018). The Use of Medicinal Plants as Alternatives for Typhoid Fever and Bacterial Gastroenteritis Therapy in Abwa-Mbagen, Nigeria. *European Journal of Medicinal Plants*, 1-12.
- Otto, B., VanDooren, S., Dozois, C., Luirink, J., & Oudega, B. (2015). Escherichia coli hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of Bacteroides fragilis. *Infect. Immun*, 5-10.
- Page, G., Gunnarsson, L., Snape, J., & Tyler, C. (2017). Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: A critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance. *Environment International*, 155-169.
- Patel, J., Keelara, S., & Green, J. (2018). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on Fresh herbs by Plant Essential oils. *FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE*, 1-7.
- Petrosyan, M., Sahakyan, N., & Trchounian, A. (2018). Chemical composition and antimicrobial potential of essential oil of Artemisia dracunculus L. cultivated at high altitud armenian landscape. *Chemistry and Biology*, 116-121.

- Podolsky, S. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave communications*, 1-8.
- Prevention, C. f. (Abril de 2015). *Antibiotic resistance threats in the United States*. Recuperado el 20 de Noviembre de 2019, de Office of Infectious Disease: <http://www.cdc.gov/drugresistance/>
- Pu, J., Chen, D., Tian, G., He, J., Zheng, P., Mao, X., . . . Yu, B. (2018). Protective Effects of Benzoic Acid, Bacillus Coagulans, and Oregano Oil on Intestinal Injury Caused by Enterotoxigenic Escherichia coli in Weaned Piglets. *BioMed Research International*, 1-12.
- purity, H. (07 de Noviembre de 2016). *Why Choose Ethanol for Botanical Extractions?* Recuperado el 16 de Setiembre de 2019, de High purity extractions and equipment: <http://www.highpurityextractions.com/blog/why-choose-ethanol-for-botanical-extractions>
- Quiñones, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista cubana de medicinatropical*, 13-27.
- RAE. (2019). *Diccionario de la lengua española*. Madrid: Larousse.
- Rather, I., Kim, B., Bajpai, V., & Park, Y. (2017). Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 808-812.
- Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D., & Verran, J. (2014). Using Soxhlet Ethanol Extraction to Produce and Test Plant Material (Essential Oils) for Their Antimicrobial Properties. *J Microbiol Biol Educ*, 45-46.
- Robinson, T., Bu, D., Carrique-Mas, J., Fèvre, E., Gilbert, M., Grace, D., . . . Woolhouse, M. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 377-380.
- Roger, B., & St-Gelais, A. (7 de Diciembre de 2017). *Oil profiles: Ginger*. Recuperado el 15 de Setiembre de 2019, de Phytochemia: <https://www.phytochemia.com/en/2017/12/07/oil-profiles-ginger/>
- Russo, T., & Johnson, J. (2015). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli. *J. Infect. Dis*, 1753–1764.

- Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol*, 429-438.
- Sansonetti, P. (2012). Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*, 2-8.
- Scazzocchio, F., Mondì, L., Ammendolia, M., Goldoni, P., Comanducci, A., Marazzato, M., . . . Longhi, C. (2017). Coriander (*Coriandrum sativum*) Essential Oil: Effect on Multidrug Resistant Uropathogenic *Escherichia coli*. *Natural product communications*, 623-626.
- Stefanović, O. (2017). Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *intechopen*, 1-12.
- Steiner, T., Nataro, J., Poteet-Smith, C., Smith, J., & Guerrant, R. (2015). Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J. Clin. Invest*, 1769-1777.
- Tapping, R., Akashi, S., Miyake, K., Godowski, P., & Tobias, P. (2016). Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J. Immunol*, 5780-5787.
- Taylor, D., & Werneke, U. (2018). Ethnopharmacology. *NORDIC JOURNAL OF PSYCHIATRY*, 30-32.
- Tchesnokova, V., Rechkina, E., Larson, L., Ferrier, K., Weaver, J., Schroeder, D., . . . Sokurenko, E. (2018). Rapid and Extensive Expansion in the United States of a New Multidrugresistant *Escherichia coli* Clonal Group, Sequence Type 1193. *Clinical Infectious Diseases*, 334-338.
- Vafaei, A. (2016). Opiate System Mediate the Antinociceptive Effects of *Coriandrum sativum* in Mice. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 679-688.
- Varma, J., Greene, K., Reller, M., DeLong, S., Trottier, J., Nowicki, S., . . . Mead, P. (2016). An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA*, 2709-2712.
- Ventola, L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and therapeutics*, 277-283.

- Walsh, C., Guinane, C., Hill, C., Ross, R., O'Toole, P., & Cotter, P. (2015). In silico identification of bacteriocin gene clusters in the gastrointestinal tract, based on the Human Microbiome Project's reference genome database. *BMC Microbiol*, 15-25.
- Wang, J., Han, M., Zhang, G., Qiao, S., Shiyan, L., & Ma, X. (2016). The Signal Pathway of Antibiotic Alternatives on Intestinal Microbiota and Immune Function. *Current Protein and Peptide Science*, 785-796.
- Welch, R., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., . . . Blattner, F. (2012). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 17020-17024.
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *medicines*, 251-286.
- Yelin, I., & Kishony, R. (2018). SnapShot: Antibiotic Resistance. *Cell*, 1136-1137.
- Zarei-Baygi, A., Harb, M., Wang, P., Stadler, L., & Smith, A. (2019). Evaluating Antibiotic Resistance Gene Correlations with Antibiotic Exposure Conditions in Anaerobic Membrane Bioreactors. *Environmental Science & Technology*, 1-19.
- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food control*, 1-21.
- Zoubiri, S., & Baaliouamer, A. (2010). Essential oil composition of *Coriandrum sativum* seed cultivated in Algeria as food grains protectant. *Food Chemistry*, 1 226-1 228.