



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

“Evaluación del efecto de antraquinonas sintéticas combinadas con ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos”.

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE QUÍMICOS FARMACEUTAS

AUTORES: Olivo Aguilar, Ronny Patricio

Grunauer Pérez, Samuel Guillermo

DIRECTOR: Dr. Carpio Arévalo Juan Marcelo, PhD

CUENCA - ECUADOR

2020

*Yo me gradué en los
50 años de La Cato!*

RESUMEN

Antecedentes: *Escherichia coli* es principal agente etiológico en infecciones del tracto urinario, debido al uso indiscriminado de antibióticos para combatirla se ha generado una resistencia por parte de este microorganismo. Por lo tanto, se ha recurrido a encontrar alternativas terapéuticas naturales que potencien la acción de moléculas ya conocidas, como es el caso de la ciprofloxacina.

Objetivo: Evaluar la capacidad antibacteriana de las antraquinonas sintéticas solas o en combinación con ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli* obtenidas de aguas residuales en la ciudad de Cuenca.

Metodología: Se llevó a cabo una metodología descriptiva experimental, tomando como muestra un total de 20 cepas de *Escherichia coli* obtenidas a partir de las aguas residuales en la ciudad de Cuenca.

Resultados: Se reporta una sensibilidad de los aislados frente a ciprofloxacina, mientras que, en el caso de las antraquinonas se presentó un halo de inhibición procedente de los discos cargados con 1,8-hidroxi-4,5 dinitroantraquinona, en dos de las muestras, respectivamente. No se presentó un sinergismo del antibiótico en combinación con las antraquinonas.

Conclusión: *Escherichia coli* es sensible a ciprofloxacina, mientras que, la antraquinona 1,8-dihidroxi-4,5 dinitroantraquinona posee un efecto antibacteriano sobre ciertas cepas, pero no un efecto sinérgico en combinación con este antibiótico.

PALABRAS CLAVE: Antraquinonas sintéticas, ciprofloxacina, *Escherichia coli*, antibióticos, sensibilidad.

ABSTRACT

Background: *Escherichia coli* is the main etiological agent in urinary tract infections, which is why the indiscriminate use of antibiotics to combat it has generated resistance from this microorganism. Therefore, it has been resorted to finding natural therapeutic alternatives that enhance the action of already known molecules, such as ciprofloxacin.

Objective: Evaluate the antibacterial capacity of synthetic anthraquinones alone or in combination with ciprofloxacin on strains of *Escherichia coli* obtained from wastewater in the city of Cuenca.

Methodology: An experimental descriptive methodology was carried out, taking as a sample a total of 20 strains of *Escherichia coli* obtained from wastewater in the city of Cuenca.

Results: A sensitivity of the isolates against ciprofloxacin is reported, while, in the case of anthraquinones, an inhibition halo was presented from the disks loaded with 1,8-hydroxy-4,5 dinitroanthraquinone, in two of the samples, respectively. There wasn't synergism of the antibiotic in combination with anthraquinones.

Conclusion: *Escherichia coli* is sensitive to ciprofloxacin, while the anthraquinone 1,8-dihydroxy-4,5 dinitroanthraquinone has an antibacterial effect on certain strains, but not a synergistic effect in combination with this antibiotic.

KEY WORDS: Synthetic anthraquinones, ciprofloxacin, *Escherichia coli*, antibiotics, sensitivity.

ABREVIATURAS

E. coli: *Escherichia coli*

ITUs: Infecciones del Tracto Urinario

BLEE: Betalactamasas de Espectro Extendido

MIC: Concentración Inhibitoria Mínima

MBC: Concentración Mínima Bactericida

µg/ml: Microgramo por mililitro

µM: Micromolar

mm: milímetros

mg / disco: Miligramo por disco

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

EPEC: *E. coli* Enteropatógena

ECEH: *E. coli* Enterohemorrágica

ETEC: *E. coli* Enterotoxigénica

EAEC: *E. coli* Enteroagregativa

DAEC: *E. coli* Adherente Difusa

EIEC: *E. coli* Enteroinvasiva

UPEC: *E. coli* Uropatogénica

NMEC: Meningitis neonatal *E. coli*

MurA: Enzima Enol-Piruvil-Transferasa

IDSA: Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

cm: centímetros

°C: grados centígrados

DMSO: Dimetilsulfóxido

EMB: Azul de Metileno

ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....		1
Planteamiento Teórico.....		1
I.1.- Planteamiento de la investigación.....		3
I.2.- Justificación.....		6
I.2.1.- Pregunta científica.....		7
I.3.- OBJETIVOS		7
I.3.1.- Objetivo General:		7
I.3.2.-Objetivos Específicos:.....		7
I.4.- MARCO TEÓRICO		8
I.4.1.- Antecedentes:		8
I.4.2.- Marco referencial:		11
CAPÍTULO II		4
METODOLOGÍA		4
II.1.- Diseño de investigación.....		25
II.2.- Población y muestra		25
II.2.1. Universo – Población		25
II.2.2 Muestreo y muestra.....		25
II.4.- Definición y clasificación de las variables		25
II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos		26
II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos		26
II.6.- Aspectos éticos.....		32
CAPÍTULO III		33

III. 1 Resultados	33
III. 2 Discusion	41
CAPÍTULO IV	46
IV.1.- Conclusiones.....	46
IV.2.- Recomendaciones.....	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las Generaciones de Quinolonas.....	19
Tabla 2. Fuentes naturales de antraquinonas.....	22
Tabla 3. Operalización de variables.....	25
Tabla 4. Equipos y materiales utilizados en el proceso experimental.....	27
Tabla 5. Interpretación de pruebas bioquímicas para <i>Escherichia coli</i>	30
Tabla 6. Resultado de la prueba de Catalasa, Tinción de Gram y pruebas bioquímicas de las 20 muestras.....	33
Tabla 7. Medición de las zonas de inhibición producida por ciprofloxacina.....	34
Tabla 8. Medición de las zonas de inhibición producida por antraquinonas.....	35
Tabla 9. Medición de las zonas de inhibición producidas por ciprofloxacina y antraquinonas.....	36
Tabla 10. Estadística descriptiva de las muestras por tamaño de halo de inhibición.....	38
Tabla 11. Prueba de Manova para ciprofloxacina y antraquinonas.....	39
Tabla 12. Prueba de Tukey para ciprofloxacina.....	39
Tabla 13. Prueba de Tukey para antraquinona.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Escherichia coli</i>	12
Figura 2. Distribución de los valores del diámetro de los halos de inhibición de las muestras.....	37
Figura 3. Medición de los halos de inhibición de la muestra 3 y 6	41

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgencita del Cisne, por ser mi fortaleza y colocar en mi camino a personas maravillosas, que junto a los momentos exactos me han permitido afinar mi vocación.

A mis padres, por su amor infinito y entrega, por ser mi ejemplo a seguir, por su apoyo incondicional, por depositar su confianza en mí y a quienes les debo todo lo que soy, por siempre estar a mi lado y brindarme sus consejos que me hacen cada día mejor, por enseñarme a vivir y aprender de mis propios errores y que todo se puede conseguir con trabajo duro y dedicación, por enseñarme el valor de nunca rendirse a pesar de la adversidad que pueda presentarse y sobre todo, a luchar por mis sueños siempre.

A mi familia, por brindarme su apoyo, cariño y confianza, por animarme incansablemente en mi camino, especial a mis tíos: Milton, Hugo, Silvio y Daysi. A mis abuelos César y Nieves por creer en mí y ser la fuente de mi felicidad.

A mis hermanos: Diego, Santiago y Cristina, por sus ocurrencias y momentos únicos que transforman mi vida en algo hermoso, por brindarme el cariño más grande que pueda existir y ser lo más bello que Dios me pudo dar y por estar en los momentos más importantes de mi vida a pesar de la distancia, por ese lazo tan fuerte que nos une, que hace que nuestra familia sea ejemplar.

A mis amigos que conocí durante el trayecto de mi formación como profesional y que fueron partícipes de este gran logro: Daniel, Isaac, Sebastián, Mishel y André, en especial a mi compañero de tesis y mi ñaño Samuel a quien considero como mi hermano, por su compañía y el apoyo necesario durante el transcurso de la investigación.

A mi mejor amiga Dra. Erika Montaña, por ser una inspiración, por sus consejos, por apoyarme y estar cuando más le necesité.

Patricio

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico a Dios quien me brindo la fuerza, valentía y la guía por el buen camino, a mis padres Samuel y Soraya, por ser mis pilares fundamentales y por haber forjado la persona que soy hoy en día.

A mi hermana Kristel y a mi sobrino Mathías quienes son mi adoración.

A Gabriela por su amor y apoyo incondicional.

A toda mi familia a quien amo y son el regalo más bello de Dios.

Samuel

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme en cada paso, por iluminar mi mente y ayudarme a encontrar mi vocación, por permitirme disfrutar y crecer en un hogar lleno de amor, por ser siempre mi fortaleza para luchar por mis objetivos.

A mis padres por apoyarme en cada decisión y permitirme aprender mis errores, por brindarme los valores y principios necesarios para convertirme en un hombre de bien, por apoyarme en mi sueño de estudiar una carrera del área de Salud para poder brindar mis servicios aquellas personas que más lo necesiten.

A nuestros familiares y amigos, por su confianza, por darnos el ánimo y fuerza para continuar a pesar del cansancio y la adversidad.

A nuestros maestros, por compartir sus enseñanzas, afianzar conocimientos para poder aplicarlos en cada momento de nuestra carrera, en especial al Dr. Diego Andrade por brindarme las pautas necesarias para ser un verdadero profesional.

Un agradecimiento especial al Dr. Juan Carpio Arévalo; Director de nuestra investigación, que, mediante su constante apoyo y dedicación a nuestro trabajo, se logró alcanzar nuestros objetivos de manera satisfactoria.

Patricio

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por darme la vida y el privilegio de disfrutar de la alegría de un hogar lleno de amor, a mis padres por apoyarme en cada decisión logrando que sea un hombre de valores y principios.

Gracias a la Universidad Católica de Cuenca por abrirme sus puertas y a cada uno de sus docentes por forjarme de sabiduría para afrontar cada obstáculo en mi vida profesional. Gracias a mi Tutor Dr. Juan Carpio por brindarme sus conocimientos científicos y por su paciencia en todo el desarrollo de la tesis.

Gracias a mi compañero Ronny por el apoyo necesario durante todo el proceso de tesis.

Gracias a toda mi familia por el apoyo y amor incondicional que me supieron brindar.

Samuel

I. INTRODUCCIÓN

Existen miles de bacterias que contribuyen a la calidad de vida de los seres humanos, no obstante, algunas causan enfermedades como es el caso de *Escherichia coli* (*E. coli*) que habita en el intestino tanto de animales de sangre caliente como de individuos. A su vez, posee una gran variabilidad antigénica que da origen a varios tipos de cepas que provocan malestar digestivo leve en el caso de los adultos, mientras que, en niños presenta un riesgo para la vida (1).

La exposición a alimentos, agua contaminada o con personas infectadas son las formas más comunes para contraer la bacteria, en la actualidad no existe un medicamento o vacuna específica contra la misma, solo concurren ciertos fármacos que nos permiten combatirla, uno de ellos es la ciprofloxacina que de acuerdo con estudios tienen un alto poder de inhibición frente a *E. coli* (2)

Sin embargo, existen estudios sobre la resistencia de *E. coli* a los principales antibióticos, representando un problema de salud pública, así como la preocupación por el uso excesivo de fármacos, lo que nos permite emplear compuestos naturales como las antraquinonas como una posible alternativa terapéutica debido a sus propiedades antibacterianas que se les adjudica (3).

Sin embargo, no existen suficientes estudios que corroboren el uso y propiedades inhibitoras contra las bacterias, específicamente frente a *E. coli*.

En este contexto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal evaluar el efecto antibacteriano de antraquinonas sintéticas solas o combinadas con ciprofloxacina sobre cepas de *E. coli*, para ello se utilizó una metodología descriptiva experimental en muestras de agua provenientes de la Planta de Tratamiento de Aguas residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca.

Para cumplir con los objetivos planteados se estructuró la investigación en tres capítulos. En el primero se aborda el planteamiento de la investigación, la justificación, así como preguntas y objetivos, también se desarrolla el marco referencial que fundamenta los resultados encontrados. El segundo capítulo describe la metodología empleada, el universo y muestra de estudio, el

procedimiento del análisis experimental desde la preparación de materiales para llevar a cabo el estudio hasta las respectivas pruebas de antibiogramas para determinar la sensibilidad de los compuestos.

Finalmente, en el capítulo tres se presenta los principales resultados en función de los objetivos planteados, así como la discusión con autores para el contraste de los resultados encontrados que sirvieron para estructurar las conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Escherichia coli (*E. coli*) es un patógeno muy frecuente a nivel mundial perteneciente al grupo de bacilos Gram-negativos, se trata de un grupo de bacterias que típicamente viven en los intestinos de los animales de sangre caliente y humanos, siendo parte del microbiota normal. Sin embargo, ciertos patotipos de esta bacteria pueden ocasionalmente causar enfermedades graves (4).

E. coli, se considera como uno de los principales agentes etiológicos de las infecciones del tracto urinario, particularmente en mujeres, provocando clínicamente disuria, polaquiuria, tenesmo, urgencia urinaria, dolor supra-púbico, hematuria, piuria y bacteriuria (5).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos, es la adquisición por parte de un microorganismo, sea este una bacteria, virus, hongo o parásito, que presenta resistencia a un medicamento antimicrobiano. Este fenómeno representa una amenaza para la salud pública a nivel mundial, debido a la creciente propagación de agentes infecciosos multirresistentes a los fármacos existentes (6).

En virtud de lo expuesto, la resistencia, multiresistencia y panresistencia de los microorganismos patógenos a los principales antibióticos es un tema que preocupa a las entidades de salud pública en todo el mundo, constituyendo una situación problemática que afecta a la población en general. Esto se demuestra estudios realizados por 130 hospitales en Norteamérica, África, Asia-Pacífico y Europa, que revelaron que, en 102.829 cultivos de microorganismos patógenos, el 40% mostró resistencia a la amoxicilina; mientras que, para ampicilina y otros medicamentos como la ciprofloxacina se identificó un nivel de resistencia entre el 53,96% en Norteamérica y 71,22% en Europa (7).

El estudio de tres hospitales de Trujillo-Perú por el incremento de *E. coli* y la expansión de sus clones dio como resultado que, de los 341 aislamientos, 330 (96.8%) fueron de *E. coli*, el promedio de edad fue de 37 años y el 92.7% son de

sexo femenino. El 42% del total de las cepas fueron resistentes a Cefotaxima, 100% sensibles a Carbapenems (8).

En otro estudio se analizaron 335 muestras de orina procedentes de las poblaciones indígenas del Ecuador: Zumbahua, Colta y Guamote, en un periodo de cuatro meses (Febrero-Mayo 2016). Noventa muestras, es decir, el 26,9% mostró un recuento significativo de $\geq 10^5$ (UFC¹)/mL, compatibles con Infecciones del Tracto Urinario (ITUs). El microorganismo identificado con mayor frecuencia fue *E. coli* (n=75; 83,3%). La resistencia antibiótica encontrada para los aislados de *E. coli* fue de 56,7% a trimetoprim/sulfametoxazol, 52,5% a ampicilina, 43,3% a ácido nalidíxico, 32,5% a ciprofloxacina, 28,3% a norfloxacina, 25% a levofloxacina, 15,85% a cefazolina, 17,5% a cefoxitina, 15% a cefuroxima, 15% a ceftazidima, cefotaxima, y ceftriaxona, 15% a cefepima, 7,5% a nitrofurantoina y 1,7% a fosfomicina. Se identificaron siete aislados productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (9).

Entre los factores que han originado la alta tasa de resistencia actual se incluye la ingesta de antibióticos por automedicación, así como el consumo de antimicrobianos implícitos en la cadena alimentaria, particularmente en los productos cárnicos procedentes de animales tratados con antibióticos, entre otros (10).

Por estos antecedentes se requieren nuevos antibióticos que puedan combatir cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos o que puedan potenciar la eficacia de fármacos como la ciprofloxacina.

Las antraquinonas son un tipo de moléculas orgánicas aromáticas, estructuralmente asociadas al antraceno y que se encuentran distribuidas en la naturaleza, especialmente en algunas familias de plantas, muchas de las cuales son utilizadas como laxantes y purgantes (11).

¹ Unidades Formadoras de Colonias (ufc)

Para Malik y Müller (12) las antraquinonas representan una clase importante de compuestos naturales y sintéticos cuyos derivados se han utilizado desde hace siglos para aplicaciones médicas como agentes antimicrobianos y antiinflamatorios. Las investigaciones actuales sugieren potenciales efectos para el tratamiento de artritis, esclerosis múltiple y cáncer. Además, las antraquinonas biológicamente activas derivadas de *Reactive Blue 2*, se han utilizado en estudios bioquímicos y farmacológicos. No obstante, la presencia del resto quinona en la estructura de las antraquinonas plantea problemas de seguridad y, por lo tanto, los laxantes de antraquinona han sido objeto de una reevaluación crítica (12).

De acuerdo con Fpullinad *et. al.* (13), las propiedades químicas de las antraquinonas cautivaron recientemente la atención de industrias en campos tales como productos farmacéuticos, textiles y colorantes alimentarios. No obstante, los efectos positivos y/o negativos aún no se entienden claramente y sus posibles roles o efectos sobre la salud humana se mantienen hoy en día en investigación.

Entre las antraquinonas, la 6-metil-1,3,8-trihidroxi-antraquinona (Emodina), se encuentra en muchas plantas medicinales. Posee un amplio espectro de propiedades farmacológicas, que incluyen actividades anticancerígenas, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas. Por otro lado, la emodina también puede provocar hepatotoxicidad, toxicidad renal, toxicidad reproductiva, especialmente en dosis altas y con el uso a largo plazo (14).

La emodina es una antraquinona obtenida a partir del rizoma de *Rheum palmatum*, planta utilizada en la medicina tradicional. Se trata de un sólido amorfo de color amarillo que presenta efectos antibacterianos, además de contener un potencial agente activo contra el cáncer. La antraquinona inhibe ciertas proteínas quinasas como CK2 (caseína quinasa, implicada en el control del ciclo celular, reparación del ADN, entre otros procesos celulares) evitando la proliferación de las células cancerígenas (15). Las propiedades antibacterianas de la emodina, se debe a que inhiben la síntesis de proteínas de las células bacterianas, lo que implica la actividad antimicrobiana, comprobando su efectividad contra la bacteria *Streptococcus mutans* (16).

Adicionalmente, la emodina tiene capacidad de unirse con el grupo fosfato de ADN e intercalarse en las pares de bases de la hélice de ADN, produciendo la muerte celular. En este sentido, la emodina evidencia un efecto antimicrobiano general contra varios microorganismos, debido a su capacidad de interferir con el metabolismo celular, el efecto se demuestra sobre algunas cepas Gram-negativas incluyendo *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. (17)

Por su parte, en el estudio de Li, *et al.*, (18), se demostró la actividad antibacteriana de la emodina contra cepas Gram-negativas de *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*) *in vitro*, agente causante de la enfermedad de Glässer, caracterizada por el síndrome de poliserositis, así como peritonitis, pleuritis, pericarditis, meningitis y artritis. Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) y Concentración Mínima Bactericida (MBC por sus siglas en inglés) fueron 32 µg/mL y 64 µg/mL, respectivamente. Cuando la concentración fue de 32 µg/mL, la emodina mostró un efecto antibacteriano limitado sobre *H. parasuis*: la cantidad de bacterias disminuyó en gran medida y al transcurrir un periodo de 4 a 8 horas este microorganismo murió. Sin embargo, cuando la concentración de emodina fue de 64 µg/ml, *H. parasuis* entró directamente en la fase de disminución y todas las células bacterianas fueron destruidas en 6 h.

Este tipo de compuesto, especialmente algunos derivados sintéticos no han sido ampliamente estudiados. En este contexto, el presente proyecto pretende evaluar comparativamente, si las antraquinonas sintéticas: antraquinona, 1,8-dihidroxi-antraquinona, 1,5-dinitroantraquinona, 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona, podrían actuar como agentes antibacterianos, solas o combinadas con ciprofloxacina sobre cepas de *E. coli*, aisladas de aguas residuales de la ciudad de Cuenca y resistentes a este antibiótico.

I.2.- JUSTIFICACIÓN.

El presente estudio pretende proporcionar información relevante a toda la comunidad científica en el Área de la Salud sobre el potencial antibacteriano de las antraquinonas sintéticas, así como de su combinación con ciprofloxacina sobre cepas de *E.coli*.

En la actualidad, la resistencia de los microorganismos a los principales antibióticos es un problema que preocupa a las entidades de la Salud Pública, por lo que se requiere encontrar nuevas alternativas terapéuticas a partir de moléculas químicamente relacionadas junto a compuestos naturales. En este contexto, las antraquinonas escogidas en el presente estudio podrían poseer un potencial antibacteriano y mejorar efecto generado por la ciprofloxacina.

De acuerdo con la revisión en literatura, se puede afirmar que existen pocos estudios referentes con la evaluación de la sensibilidad de *E.coli* frente a nuevos compuestos como las antraquinonas, por lo cual, el desarrollo de esta investigación será novedosa en la zona. Se ayudará al ambiente a partir del correcto descarte de materiales como objetos peligrosos para su tratamiento correspondiente. Por otra parte, nos permitirá adquirir el conocimiento, destrezas, y habilidades para investigar, además nos brindará los créditos académicos necesarios para la obtención del título profesional de Químico Farmacéutico.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA.

¿Las antraquinonas usadas en este estudio, solas o en combinación con ciprofloxacina, presentan efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli* resistente a este antibiótico?

I.3.- OBJETIVOS.

I.3.1.- Objetivo General:

Evaluar la capacidad antibacteriana de las antraquinonas sintéticas solas o en combinación con ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli* obtenidas de aguas residuales en la ciudad de Cuenca.

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Aislar e identificar *Escherichia coli* en muestras de agua residual obtenidas del laboratorio de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca.
- Evaluar la sensibilidad de estos aislados frente a la ciprofloxacina.

- Evaluar la sensibilidad de estas bacterias frente a: antraquinona, 1,8 dihidroxiantraquinona, 1,8 dihidroxi-4,5, dinitroantraquinona y 1,5-dinitroantraquinona.
- Evaluar la sensibilidad de estos aislados frente a la ciprofloxacina en combinación con las antraquinonas antes mencionadas.

I.4.- MARCO TEÓRICO.

I.4.1.- Antecedentes:

En Estados Unidos, Mosquito, *et al.*, realizaron una investigación en el año 2011, en la que se evaluó la susceptibilidad de *Escherchia Coli* (*E. coli*) frente a fluoroquinolonas en 335 cepas, obtenidas a partir de muestras de heces de pacientes hospitalizados. Los hallazgos detectaron una sensibilidad del 85% debido a una o más mutaciones a nivel del gen *gyrA* y 46% una o más mutaciones a nivel del gen *parC* (2).

En Cuba, Cabrera *et al.* realizaron un estudio retrospectivo en 2019 de 265 cepas de *E. coli* de pacientes ambulatorios con sospechas de infección del tracto urinario, obteniendo como resultado que los niveles de sensibilidad por encima del 90% a los antibióticos fosfomicina, amikacina y nitrofurantoina, la mayor resistencia encontrada fue para ceftazidima (72%), seguido de trimetoprim–sulfametoxazol (61,5%), ácido nalidíxico (61,1%) y ciprofloxacina (52,8%) (19).

En México, López *et al.* realizaron una investigación en 2009, con el propósito de cuantificar la presencia de *E. coli* y *Salmonella typhi* en muestras de agua y determinar el perfil de resistencia a varios antibióticos, dando como resultado que, del total de muestras analizadas, el 98% resultó positiva para *E. coli*. De las 46 cepas analizadas, nueve fueron resistentes a tetraciclina, 38 a estreptomina y solo una a gentamicina (20).

En Venezuela, Requena *et al.*, analizaron en el año 2007 la resistencia antibiótica de bacterias causantes de infección del tracto urinario. Se identificó a *E. coli* como la principal causante de infección urinaria, seguido por *Proteus* spp. La primera registró una elevada resistencia a la mayoría de los antibióticos, aunque se

evidenció sensibilidad frente a las quinolonas, sobre todo a la ciprofloxacina en un 71,4% (21).

En Ecuador, un estudio descriptivo realizado por Palacio, *et al.*, una muestra de 67 pacientes del Hospital Básico de Paute, Azuay durante el período 2015 al 2016, con ITU, reportó que la bacteria aislada con mayor frecuencia fue *E. coli* (69,7% de los cultivos positivos). A su vez, la resistencia a las fluoroquinolonas fue significativa, con un valor de 66,7% para levofloxacina, 55,6% para norfloxacina, 38,1% para ciprofloxacina y 37,5% para ofloxacina (22).

Así mismo, en Ecuador, Guamán *et al.*, desarrollaron un estudio en 2017 para identificar los perfiles de resistencia a los antibióticos para tratar las infecciones del tracto urinario en poblaciones nativas de las localidades de Zumbahua, Colta y Guamote. Los resultados reportaron que el microorganismo aislado con mayor frecuencia fue *E. coli* con una resistencia del 56,7% a trimetoprim/sulfametoxazol, 52,5% a ampicilina, 43,3% a ácido nalidíxico, 32,5% a ciprofloxacina, 28,3% a norfloxacina, 25% a levofloxacina, 15,85% a cefazolina, 17,5% a cefoxitina, 15% a cefuroxima, 15% a ceftazidima, cefotaxima, y ceftriaxona, 15% a cefepima, 7,5% a nitrofurantoina y 1,7% a fosfomicina (5).

Por otro lado, existe evidencia de antraquinonas con actividad antibacteriana. Por ejemplo, Saavedra *et al.*, realizaron un estudio en Perú durante el año 2012, cuya finalidad fue evaluar la actividad antibacteriana de ciertos extractos, entre ellos el de *Aloe vera L.*, sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Aspergillus niger*; mediante la elaboración de macerados acuosos y alcohólicos, se identificó la efectividad antibacteriana del *Aloe vera*, debido a los derivados antraquinónicos (28% de isobarbaloina anhidra) (23).

La sensibilidad de *E. coli* frente a varias antraquinonas se reporta en algunos estudios, por ejemplo, en Kenia, África, los autores Leonidah *et al.*, (24), evaluaron varias antraquinonas, naftoquinonas, benzoquinonas, flavonoides (chalcones y flavonas polimetoxiladas) y diterpenoides (clerodanos y kauranos) por su potencial antimicrobiano contra diferentes bacterias Gram-negativas y Gram-positivas

sensibles a los antimicrobianos. Se demostró la actividad antibacteriana de las antraquinonas, particularmente, del compuesto activo emodina contra cepas Gram-negativas de *E. coli*. La actividad antibacteriana fue significativa cuando la MIC estuvo por debajo de 10 µg/mL.

Por su parte en Cuba, Camacho *et al.*, analizaron las propiedades antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta L. (Asteraceae)*, en donde se determinó la presencia de flavonoides, terpenoides, antocianinas, taninos, antraquinonas, glucósidos cardiotónicos. Se reportó que las hojas y flores de estas plantas presentaron propiedades antibacterianas frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* y *Staphylococcus epidermis*, con valores inhibitorios superiores en las flores, efectos que atribuyen a la presencia de antraquinonas (25).

Por otra parte, Prateeksha, *et al.*, (26) manifiestan que la antraquinona crisofanol se ha investigado como un agente antibacteriano contra algunos patógenos, pero existen resultados contradictorios en cuanto a la CMI. Sin embargo, refieren que la CMI de crisofanol frente a *S Staphylococcus aureus. aureus*, *Shigella sonnei* y *Micrococcus kristinae* es mayor a 250 µg/mL, *Staphylococcus epidermis* de 31,25 µg/mL, *E. coli* de 125 µg/mL, *Aeromonas hydrophila* IB1010 de 200 µg/mL, *Pseudomona aeruginosa* de 128 µg/mL, *Vibrio harveyi* de 1000 µg/mL, *Candida albicans* de 50 µg/mL a 128 µg/mL, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* de 50 µg/mL, *Trichophyton mentagrophytes* de 25 µg/mL a 1250 µg/mL, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* de 625 µg/mL.

Mientras que Gokulan, Kolluru & Khare (27) evaluaron el efecto antibacteriano de aloe o aloína purificada contra la microbiota comensal intestinal, encontraron que exhibe las propiedades antibacterianas, presentando un CMI entre 1 y 4 mg/mL cuando es suministrada en grandes cantidades, así, cuando se dispuso la bacteria en aloína de 0,05 – 500 µM, en tampón de pH 7,2 la resistencia transepitelial aumento, mientras que en un pH de 4,9, los resultados revelaron la integridad de la barrera intestinal porque permaneció intacta.

Jiang *et al.*, (28) indican que la antraquinona Aloe-emodina posee actividad inhibitoria sobre la formación de poros de α -toxina de *S. aureus*, inhibiendo notablemente la actividad hemolítica al disminuir las lesiones en células epiteliales del pulmón y los macrófagos pulmonares.

Hwan & Seon (29) aislaron de las semillas de *Casia obtusifolia* la 1,2-dihidroxiantraquinona (alizarina). La alizarina purificada exhibió una actividad débil contra *Bacillus cereus* (diámetro de la zona limpia, 11,0 mm) y una actividad moderada contra *Staphylococcus epidermidis* (17,5 mm) y *Salmonella entérica* (16,2 mm) con 2,0 mg/disco. En comparación con los análogos de alizarina, el ácido alizarin-3-metiliminodiacético exhibió la actividad antimicrobiana más fuerte contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis* y *Salmonella enterica* a 2.0 mg / disco. Los otros análogos no exhibieron actividad antimicrobiana contra las siete bacterias transmitidas por los alimentos.

Coenye *et al.*, (30) evaluaron la habilidad de reducción de la formación de biopelículas de *Streptococcus mutans* con el uso de emodina, hipericina, ácido carminico, crisofánico ácido, rheina, quinizarina, sennidina, crisazina, ácido antraffavico, aloe-emodina, physcion, clorhexidina, triclosán. Como resultado se deriva que ciertas antraquinonas como la emodina, hipericina, ácido carmínico, crisofánico ácido, quinizarina, disminuyen la proliferación de *Streptococcus* por debajo de la CMI.

I.4.2.- Marco referencial:

4.2.1 *Escherichia coli.*

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), *E. coli* es una bacteria que se encuentra en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente, siendo la mayoría de las cepas inofensivas (31).

Esta bacteria es un bacilo Gram-negativo, cuenta con una variabilidad antigénica que da origen a varios tipos de cepas (32). De acuerdo con Rodríguez - Ángeles (33), la *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativo de la familia Enterobacteriaceae,

entre las principales características bioquímicas señala el 98 % de positividad a la prueba Oxidasa, el 99 % a rojo de metilo, el 100 % a ácido de glucosa, entre otros.

Estructuralmente está compuesta por:

- Membrana extracelular.
- Capa peptidoglucano.
- Pared celular.
- Lipopolisacáridos.
- Espacio peri plasmático.
- Cuerpos de inclusión.
- Plásmidos.
- Ribosomas.
- Cromosomas.
- Flagelo.
- Pili.

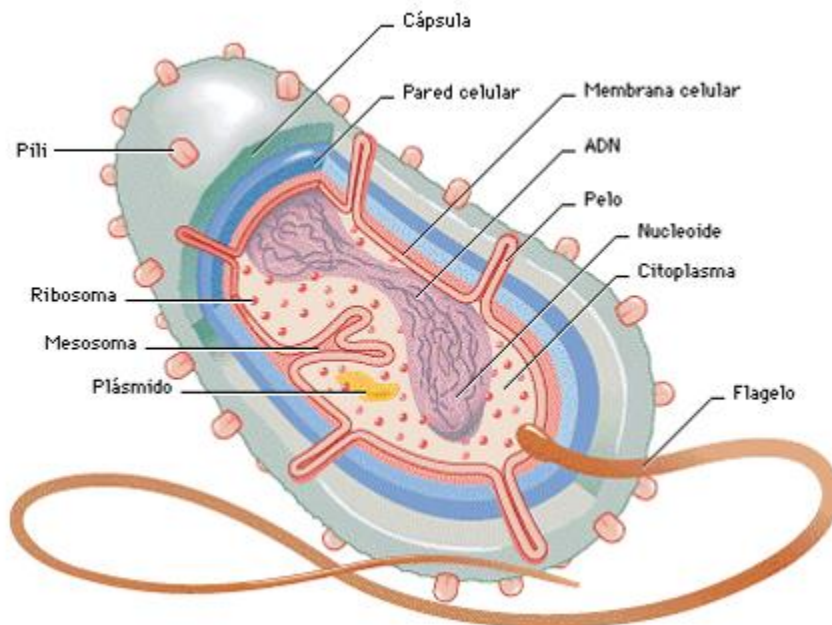


Figura 1. Morfología de la bacteria E. Coli. Liébana (33).

E. coli al ser una bacteria Gram-negativa consta de membrana citoplasmática, membrana externa y el espacio entre estas dos, conocido como periplasma, en donde se encuentra una capa de peptidoglucano y una gran variedad de enzimas y proteínas importantes para el metabolismo bacteriano (34).

E. coli, puede clasificarse en varias cepas:

- ***E. coli* Enteropatógeno (EPEC):** Causa diarrea en niños y animales.
- ***E. coli* Enterohemorrágica (ECEH):** Es responsable de la colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico-urémico.
- ***E. coli* Enterotoxigénica (ETEC):** Provoca diarrea del viajero y diarrea porcina y bovina.
- ***E. coli* Enteroagregativa (EAEC):** Causa diarrea persistente en humanos.
- ***E. coli* Adherente difusa (DAEC).**
- ***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC):** Provoca diarrea acuosa y disentería.
- ***E. coli* Uropatogénica (UPEC):** Causa infecciones del tracto urinario en humanos y animales.
- **Meningitis Neonatal *E. coli* (NMEC):** Es responsable de la meningitis y la sepsis (35).

Entre las múltiples enzimas que contiene esta bacteria destaca la enzima catalasa, la cual descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno mediante la reacción: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$, así las bacterias se protegen del efecto tóxico del H_2O_2 , el cual representa uno de los productos del metabolismo aerobio (36).

Además, *E. coli* posee un metabolismo que le permite fermentar lactosa, por otro lado, la bacteria resulta positiva para indol y lisina descarboxilasa. También, se ha demostrado a partir de algunas investigaciones la resistencia a antimicrobianos y la capacidad de producir toxinas (37).

4.2.2 Principales enfermedades causadas por *Escherichia coli*.

Varias cepas patógenas pueden causar diarrea o enfermedades extraintestinales, tanto en individuos sanos como inmunocomprometidos. Las enfermedades diarreicas son un grave problema de salud pública y una causa importante de

morbilidad y mortalidad en lactantes y niños pequeños, especialmente en países en desarrollo. Las cepas de *E. coli*, que causan diarrea han evolucionado al adquirir características de resistencia, mediante la transferencia horizontal de genes (38).

Por otro lado, están las infecciones de tracto urinario, que comprende un cuadro clínico de uretritis, cistitis o inclusive pielonefritis. Estas infecciones son provocadas generalmente por la bacteria *E. coli*, que se encuentra en el tracto digestivo y sobre la piel que rodea la zona vaginal y rectal, cuando estas bacterias ingresan a la uretra pueden avanzar y provocar estas infecciones (39).

4.2.3 Epidemiología.

E. coli, es un agente importante causal de la diarrea responsable de la muerte especialmente en niños menores de cinco años, de diferentes regiones a nivel mundial con ingresos intermedios y bajos. Se estima que produce mil millones de casos de diarrea cada año, y la mortalidad atribuible en este grupo etario en el año 2015 fue de 23.600 (40).

Es el patógeno aislado con mayor frecuencia en cultivos de peritonitis, cuya resistencia en antibióticos fue del 16%, principalmente en trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina, ampicilina-sulbactam, ciprofloxacina y gentamicina (45). El aislamiento del cultivo con *E. coli* mostró la generación de BLEE con el 4,7%.

Por su parte, Hernández *et al.*, (44) en su investigación reportó que *E. coli* con un fenotipo sugestivo de BLEE de 16% por su resistencia a cefalosporinas de tercera generación, registró un comportamiento similar a los identificados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) de los países europeos. En donde durante el año 2011, se evidenció un brote de 4.075 casos con la mortalidad de 16 personas

De la misma manera, la tasa de *E. coli* en la Región Asiática y Pacífico fueron entre 34,9 y 42,2%, mientras que en la India y China alcanzo el 79% y 59%, respectivamente, siendo las zonas más afectadas que superan los 2 billones de habitantes. Mientras tanto, a nivel de Latinoamericano, existe un mayor porcentaje para el empleo de las cefalosporinas que alcanza el 23,9% frente a *E.coli*.

El elevado uso de las quinolonas en los tratamientos terapéuticos ambulatorios incide en el aumento de la resistencia de *E. coli*. Según Aguilar (41) en Austria aumentó de 7% a 25,5% en los años 2001 y 2010, respectivamente; en tanto que, en el Reino Unido, la bacteria representa 30% de todos los casos de bacteriemia.

En Estados Unidos el número de padecimientos vinculados con la bacteria disminuyó durante los años 2014 - 2015, atribuido a factores relacionados con el cuidado de los alimentos.

En el año 2006, en Argentina, *E. coli* provocó 12,2 muertes por cada 100.000 niños menores de 5 años. Según Torres (42), en un estudio realizado en la misma Argentina durante el año 2017, señala que esta bacteria es considerada como la causa principal de insuficiencia renal aguda en niños y el responsable del 20% de trasplantes de riñón (42).

En el Ecuador, se realizaron varios estudios para evaluar la prevalencia de *E. coli* en la población. Según el Ministerio de Salud, *E. coli* es el principal patógeno aislado en infecciones de vías urinarias durante la etapa del embarazo (43).

4.2.4 Fármacos antibacterianos y mecanismos de acción.

Entre los fármacos más utilizados para combatir esta bacteria están:

4.2.4.1 Aminoglucósidos.

Los antibióticos aminoglucósidos – aminociclitoles constituyen un grupo de agentes antibacterianos con interesantes propiedades para el tratamiento en especial de infecciones bacterianas producidas por bacilos Gram-negativos. Está constituido por dos tipos de moléculas, azúcares y alcoholes cíclicos no aminados (46). A continuación se muestra algunos ejemplos como: estreptomina $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$; neomicina $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$; amikacina $C_{22}H_{43}N_5O_{13}$; kanamicina $C_{18}H_{38}N_4O_{15}S$; tobramicina $C_{18}H_{37}N_5O_9$; gentamicina $C_{21}H_{43}N_5O_7$; espectinomicina $C_{14}H_{24}N_2O_7$ (47).

4.2.4.2 Cefalosporinas.

Tienen una excelente actividad frente a las Gram-positivas, se obtienen de un hongo conocido como *Cephaosporium Acremonium*. Su farmacología es simple se

encuentran de forma parental y tienen una vida entre 1 y 2 horas. Además, es efectiva frente a cepas de *E. coli* en infecciones urinarias y neumonía bacteriana (48). La clasificación de este grupo de antibióticos se divide en:

- **Primera generación:** cefadroxilo $C_{16}H_{17}N_3O_5S$; cefalexina $C_{16}H_{17}N_3O_4S$; cefradina $C_{16}H_{19}N_3O_4S$; cefalotina $C_{16}H_{16}N_2O_6S_2$; cefazolina $C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$.
- **Segunda generación:** cefaclor $C_{15}H_{14}ClN_3O_4S$; cefuroxima $C_{16}H_{16}N_4O_8S$; cefprozilo $C_{18}H_{19}N_3O_5S$; cefonicida $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$; cefoxitina $C_{16}H_{17}N_3O_7S_2$; cefuroxima $C_{16}H_{16}N_4O_8S$.
- **Tercera generación:** cefixima $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$; cefpodoxima $C_{15}H_{17}N_5O_6S_2$ proxetilo $C_{21}H_{27}N_5O_9S_2$; ceftibuteno $C_{15}H_{14}N_4O_6S_2$; cefditoreno $C_{19}H_{18}N_6O_5S_3$; cefotaxima $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$; ceftazidima $C_{16}H_{17}N_5O_7S_2$; ceftriaxona $C_{18}H_{18}N_8O_7S_3$.
- **Cuarta generación:** cefepima $C_{19}H_{24}N_6O_5S_2$; cefpiroma $C_{22}H_{22}N_6O_5S_2$ (47).

4.2.4.3 Trimetoprim/Sulfametoxazol (TMP/SMX).

Es un antibiótico bacteriostático obtenido a partir de la trimetoxibenzilpirimidina; pertenece al grupo de inhibidores del dihidrofolato reductasa (49). Individualmente TMP y SMX son fármacos antibacterianos eficaces, pero en conjunto se utilizan tanto para la prevención como para el tratamiento de diversas infecciones, en especial ocasionados por la bacteria *Pneumocystis Carinii* (50).

4.2.4.4 Fosfomicina.

Es un antibiótico utilizado hace varias décadas a nivel internacional en el tratamiento de infecciones urinarias bajas; posee un amplio espectro bactericida y actúa impidiendo la formación de ácido N-acetil murámico debido a la inhibición de la enzima enol-piruvil-transferasa (MurA) Se ha demostrado que fosfomicina afecta las propiedades de adhesión de varios microorganismos uropatógenos (51).

4.2.4.5 Nitrofurantoína.

Es un nitrofurano sintético utilizado para el tratamiento y la profilaxis de infecciones urinarias, posee varios mecanismos de acción, la forma activa se produce dentro de

la bacteria mediante enzimas reductoras y nitroreductasas, que generan metabolitos intermedios activos (52). Se trata de un nitrofurano sintético que trata y previene la infección del tracto urinario. Es activa contra muchas cepas de *E. coli* y *Enterococcus* y resulta ser bacteriostática frente a la mayor parte de los microorganismos en concentraciones por encima de los 32 mcg/mL, tras la ingestión de forma oral se absorbe rápida y totalmente, no alcanza concentraciones plasmáticas activas debido a su rápida eliminación.

En cuanto a los efectos, se menciona la aparición de náuseas, vómitos y diarreas, ocasionalmente existen reacciones de hipersensibilidad, fiebre, escalofríos, anemia, etc. Además, no se recomienda su administración en mujeres embarazadas, en pacientes con insuficiencia renal y menores de un mes de edad (53).

Este fármaco se encuentra en el grupo de los nitrofuranos, quimioterápico sintético que tiene efecto antibacteriano y/o antiparasitario debido a la degradación del ADN, algunos ejemplos son: ornidazol, tinidazol, nifurtimox (47).

4.2.4.6 Quinolonas.

Son un grupo de antimicrobianos de amplio espectro, son utilizadas frecuentemente para las infecciones intra y extrahospitalarias. Su efectividad se debe a su alta biodisponibilidad, nivel de seguridad y la forma de administración que puede ser enteral o parenteral, los fármacos identificados en este grupo son: ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y norfloxacina. La resistencia de algunos patógenos es una preocupación a nivel mundial, de hecho, Grecia es el mayor usuario de quinolonas y tienen la mayor incidencia de aislados por *E. coli* resistente a estos fármacos (54).

4.2.4.6.1 Ciprofloxacina.

Es una fluoroquinolona y posee un amplio espectro de acción según el nivel de actividad, están indicado para (55):

- **Infecciones de vías respiratorias como:** Bronconeumonías y neumonía lobar por aerobios Gram-negativos, bronquitis aguda y reagudización de la bronquitis crónica.

- **Infecciones del tracto genitourinario:** Uretritis complicadas y no complicadas, cistitis aguda no complicada en mujeres, anexitis, prostatitis bacteriana crónica, epididimitis, pielonefritis y uretritis o cervicitis gonocócica no complicada.
- **Infecciones gastrointestinales:** Fiebre tifoidea y diarrea infecciosa.
- **Infecciones osteoarticulares:** Osteomielitis por bacterias Gram-negativos y artritis séptica.
- **Infecciones sistémicas graves causadas por Gram-negativos como:** bacteriemia y septicemia, infecciones en pacientes inmunodeprimidos y pacientes en UCI con problemas específicos, como quemaduras infectadas.
(55)

4.2.5 Mecanismos de resistencia bacteriana.

La resistencia a antibióticos entre los bacilos Gram-negativos constituye un problema preocupante, limitando los diversos tratamientos terapéuticos. El proceso para generar un genotipo de multiresistencia es complejo, esta adquisición se atribuye a los mecanismos de mutación en genes cromosómicos o por la adquisición de genes ubicados en estructuras genéticas móviles (56).

Existen diversos criterios para conceptualizar la resistencia, de acuerdo con los perfiles fenotípicos se clasifican en: multirresistente, extremadamente resistente y panresistente. El primero refiere a la no sensibilidad en al menos un antibiótico de tres o más familias antibióticas. La segunda significa la falta de sensibilidad en mínimo un antibiótico aprobado para uso clínico; en tanto que la panresistencia refiere a que no es sensible a ningún antibiótico de ninguna categoría (57).

La resistencia en bacterias patógenas es un problema progresivo que surge después de la introducción de los diferentes antimicrobianos, cuyo desarrollo y comportamiento se realiza de forma acumulativa en diferentes especies, tendiendo a ser multirresistente y detectable en hospitales y la comunidad. La capacidad de resistir el efecto se encuentra presente en forma infrecuente en una población bacteriana que tiene previa exposición al compuesto, cuya capacidad de resistencia se presenta cada un millón o 10 millones del total. Frente a tal exposición mantienen

la capacidad replicativa, reemplazando a la población original con una nueva resistente. Fenómeno que obedece principalmente a prácticas de uso indiscriminado de antibióticos (58).

El mecanismo de resistencia de mayor relevancia en las bacterias Gram-negativas es la producción de betalactamasas; clínicamente consideradas como de alto impacto están las BLEE, las inducibles tipo Amp-C y las carbapenemasas. En cuanto, a los mecanismos no enzimáticos, resaltan la alteración de los transportadores de membrana de tipo porina, así como la expresión de las bombas de expulsión. El grupo que lidera el número de aislamientos entre los bacilos Gram-negativos son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, los cuales logran alcanzar un mayor nivel de multirresistencia (44).

4.2.5.1 Mecanismos de acción y de resistencia bacteriana frente a quinolonas.

Las quinolonas son una clase de antibióticos que interfieren con la síntesis del ADN, Respecto del espectro de actividad, las quinolonas se agrupan en cuatro diferentes generaciones, tal como se aprecia en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de las generaciones de quinolonas.

Generación	Representantes	Espectro de actividad
Primera	Ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido piromídico, ácido pipemídico, rosoxacina, cinoxacina, flumequina.	Bacilos Gram negativos: <i>E. coli</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Serratia spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Shigella spp.</i>
Segunda	Ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina, lomefloxacina, nadifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, rufloxacina	<i>P. aeruginosa</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Campylobacter spp.</i>

Tercera	Levofloxacin, esparfloxacin, tosulofloxacin, temafloxacin, grepafloxacin	Al igual que la primera y segunda generaci3n.
Cuarta	Balofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin, pazufloxacin, arenfloxacin, sitafloxacin, rovfloxacin, trovafloxacin	Bacilos Gram positivos, espectro extendido en anaerobios y "at3picos"

Fuente: Infecciones por *E Coli*. lvarez, Garza y Vázquez. (54)

4.2.5.2 Mecanismos de acci3n antibacteriana de las quinolonas

El mecanismo de acci3n de las quinolonas es la inhibici3n de la acci3n de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa) y topoisomerasa IV. En bacterias Gram-negativas la ADN girasa, es el blanco principal mientras que la topoisomerasa IV actuaría como diana secundaria. El ADN girasa es una enzima compuesta por cuatro subunidades, dos cadenas A y dos B codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente y es la encargada de catalizar el súper enrollamiento negativo del ADN. En el caso de la topoisomerasa IV, blanco principal en el caso de las Gram-positivas, se trata tambi3n de una enzima con cuatro subunidades codificadas por *parC* y *parE*, hom3logas a *gyrA* y *gyrB*, respectivamente (59).

Las quinolonas al interferir con la síntesis del ADN, llevan a la muerte bacteriana por medio de la fragmentaci3n cromos3mica. Se introducen en la pared celular mediante porinas. (54).

4.2.5.3 Mecanismos de resistencia de bacterias frente a quinolonas.

Los sistemas de resistencia a quinolonas se dividen en dos grupos: I) los que están codificados en genes cromos3micos, que incluyen las modificaciones en los sitios blanco del antibi3tico y los sistemas de expuls3n; y II) los codificados por genes presentes en plásmidos, que incluyen a las proteínas *Qnr*, la enzima aminogluc3sido acetil transferasa modificada y los sistemas membranales de expuls3n.

Entre los mecanismos moleculares de resistencia a estos antibióticos, se encuentran las mutaciones en los blancos de quinolonas, así como el aumento de la expresión de bombas de expulsión activa y la transferencia de genes de resistencia plasmídicos. La alta resistencia hacia fluoroquinolonas, tales como la ciprofloxacina, se relaciona con más de una mutación a nivel de *gyrA*, gen que codifica una subunidad de la ADN girasa (normalmente además del codón 83 se afecta el codón 87) o con mutaciones además en *gyrA*, gen que codifica una subunidad de la ADN girasa a nivel de otros genes como *parC*, gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa (codones 80 o 84 de manera usual) (60).

La resistencia a fluoroquinolonas, específicamente a ciprofloxacina y norfloxacina, se ha relacionado con la variante *cr* de la acetiltransferasa 6', que debido a la presencia de dos cambios de aminoácidos en los codones 102 y 179, es capaz de acetilar no solo aminoglucósidos (AAC (6')-Ib), sino también algunas fluoroquinolonas provocando su inactivación (61).

Otro mecanismo de resistencia a quinolonas es relacionado con la transferencia de genes mediante plásmidos, como es el caso de los genes *Qnr* que codifican a la familia de las proteínas *Qnr* (*QnrA*, *QnrB*, *QnrS*, *QnrC*, *QnrD*) que se unen a la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) disminuyendo la acción de las quinolonas (60).

4.2.6 Antraquinonas.

4.2.6.1 Antecedentes.

Son un grupo de moléculas que se encuentran de forma natural en algunas plantas, hongos e insectos y que sirven como base para elaborar pigmentos, por lo que son utilizadas como colorantes. Además, tienen alta importancia por sus diversas actividades farmacológicas entre las cuales se destacan las laxantes y potenciales propiedades anticancerígenas, antimicóticas, antiinflamatorias, antiartríticas, antibacterianas entre otras. En el reino vegetal están distribuidas en diversas familias de plantas especialmente las familias *Xanthorrhoeaceae*, *Polygonaceae*, *Rhamnaceae*, *Rubiaceae* y *Fabaceae* (62).

El nombre de "antraquinona" fue propuesto por Graebe y Liebermann en 1868, a pesar de que el compuesto ya fue sintetizado por Laurent en 1840 a través de la oxidación de antraceno con ácido nítrico, y fue inicialmente llamado antracenuso. Graebe y Liebermann establecieron la relación entre antraceno, antraquinona y alizarina; al mismo tiempo que plantearon la fórmula estructural para el antraceno; y alizarina sintetizada del antraceno como el primer colorante natural que se preparó sintéticamente. A pesar de esto, fue Fittig en 1873 quien definió la estructura correcta de dicetona de la antraquinona (12).

4.2.6.2 Fuentes naturales de antraquinonas.

Las antraquinonas se encuentran en un gran número de familias de plantas, bacterias, hongos, líquenes, en la siguiente tabla se presentan algunas de ellas y su respectiva descripción:

Tabla 2. Fuentes naturales de antraquinonas.

Nombre Común	Nombre científico	Propiedades medicinales	Antraquinonas relacionadas
Aloe vera – Sábila	<i>Aloe barbadensis miller</i>	Antiséptico Antiinflamatorio Antiasmático Cicatrizante Laxante	Crisofanol Aloe-emodina Barbolóinas A y B
San Juan	<i>Hypericum perforatum</i>	Antidepresivo	Hipericina
Ruibardo	<i>Rheum rhabarbarum</i>	Laxante Antiflogístico	Alizarina Crisofano Áloe-emodina Fisciona
Frángula	<i>Rhamnus frangula</i>	Laxante	Fisciona Emodina Reidinas A, B y C
Cascara sagrada	<i>Rhamnus purshiana</i>	Laxante	Emodina Áloe- emodina

Sen	<i>Cassia angustifolia</i> Vahl	Laxante	Áloe-emodina Reinas libres Monoglicósidos Senidinas A, B y C.
-----	------------------------------------	---------	--

Fuente: (63) (64) (65) (66) (67).

Las plantas que contienen antraquinonas, por ejemplo, el ruibarbo (*Rheum rhabarbarum*) y el aloe, se conocen y usan desde hace más de 4.000 años en la medicina popular (12). Así, las antraquinonas obtenidas a partir de extractos frescos o secos de diferentes plantas como del Aloe, han demostrado propiedades antibacterianas, fungicidas y antivirales. Por ejemplo, se ha evidenciado la efectividad antibacteriana de compuestos derivados de *Aloe vera* frente a *E. coli* (23). Por su parte el *Rheum rhabarbarum* conocidos como ruibarbo chino, contiene metabolitos secundarios y crecen en India, China, Corea y Japón (68).

Las antraquinonas tienen alta reactividad, lo que les permite formar complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, inactivando y anulando su función, lo que incide en el potencial antimicrobiano de este grupo. La hipericina es un ejemplo, se trata de una antraquinona aislada de la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), planta que en la antigüedad era utilizada como antidepresivo (69).

Otro ejemplo es la planta *Bersama engleriana* (Melianthaceae) cuyo análisis fitoquímico reportó la presencia de antraquinonas, los extractos se aplicaron sobre cepas de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, mostrando alta actividad sobre bacterias como *Bacillus subtilis* y *Streptococcus faecalis*.

La diversidad química y las actividades biológicas de la antraquinona fúngica y los derivados de origen marino son considerables; por lo tanto, pueden representar un recurso prometedor para identificar nuevos candidatos a fármacos terapéuticos (13).

Los principios activos de la corteza de la Frángula (*Rhamnus frangula*) son entre otros derivados de los hidroxiantracénicos y heterósidos de antraquinonas, adicional poseen una propiedad laxante este efecto se da por la presencia de principios

activos de la frángula lo que hacen incrementar el peristaltismo intestinal, se trata de un laxante útil pero más suave que el Sen y el Aloe (3).

Finalmente, las antraquinonas denominadas Senósidos C, D y Heterósidos presentes en la planta denominada cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) pertenece a la familia de las *Rhamnaceas* que contienen principios activos con propiedades laxantes, adicional posee efectos expectorantes y acción antiséptica en las vías respiratorias altas, por lo tanto, es utilizada ampliamente en el uso de preparaciones para la tos y resfriados (70).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

II.1.- Diseño de investigación.

Descriptiva y Experimental.

II.2.- Población y muestra.

II.2.1. Universo – Población.

El universo estuvo conformado por las bacterias *Escherichia coli*, obtenidas por el aislamiento de muestras de agua residual, procedentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba en la ciudad de Cuenca.

II.2.2 Muestreo y muestra.

La muestra fue constituida por 20 cepas de *Escherichia coli* que fueron aisladas e identificadas a partir del agua residual de Ucubamba.

II.4.- Definición y clasificación de las variables.

Se consideraron como variables a la sensibilidad, resistencia y potenciación o sinergismo de las cepas de *E. coli*, tal como muestra la tabla 3:

Tabla 3. Operalización de variables.

Variables	Definición	Dimensión	Indicador	Escala
Sensibilidad.	Reducción de la viabilidad o de la capacidad de proliferar de una bacteria por acción de un agente.	Cuantitativa.	Halo de inhibición.	diámetro (mm).
Resistencia.	Capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un agente antimicrobiano.	Cuantitativa.	Halo de inhibición.	diámetro (mm).
Potenciación o sinergismo.	Capacidad de una agente para aumentar el efecto de un antimicrobiano.	Cuantitativa.	Aumento de halo de inhibición, en relación con el halo del antibiótico solo.	Tamaño de la distorsión del halo de inhibición entre disco antibiótico y antraquinona (mm).

Elaborado por: Autores.

II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.

Método bibliográfico. – Se realizó una revisión de la literatura que permitió fundamentar los resultados de la investigación, para ello se seleccionó fuentes de información válidas en los motores de búsqueda académicos y publicaciones indexadas a revistas científicas.

Método experimental. – Este método fue aplicado mediante el desarrollo de ensayos experimentales para evaluar el efecto de las diferentes antraquinonas solas o combinadas con ciprofloxacina sobre las cepas aisladas. Con los resultados obtenidos se construyeron tablas en el programa Microsoft Excel con el propósito de facilitar el manejo de la información obtenida.

El procesamiento de los datos obtenidos se realizó en el programa estadístico SPSS versión 20, los resultados se exponen a través de tablas y gráficos estadísticos, calculando la media aritmética con la desviación estándar de los halos de inhibición de los compuestos evaluados. Además, se realizó el análisis de varianza, seguida de la prueba de Tukey.

II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos.

✓ Aislamiento e identificación de las cepas *Escherichia coli*.

Las muestras de coliformes totales fueron proporcionadas por el laboratorio de la Planta de tratamiento de aguas residuales de Ucubamba, la misma que se encuentran bajo la administración de ETAPA EP. Por consiguiente, se transportaron en un contenedor y fueron trasladadas hacia el laboratorio de la Carrera de Biofarmacia de la Universidad Católica de Cuenca.

Tabla 4. Equipos y materiales utilizados en el proceso experimental.

Descripción	Marca
Estufas	Memmert
Balanza Analítica	Boeco Germany
Contador de colonias	Boeco Germany
Descripción	Marca
Agar EMB X 500 g	Himedia
Agar Mueller Hinton X 500 g	Himedia
Ciprofloxacina 5 mcg x 50 U	Bioanalysis
Eppendorf Tubo 1,5 ml Grad Funda X 500 U	Global
Gram Alcohol Acetona x 100 ml	Quimical
Gram Violeta Cristal x 100 ml	Quimical
Fucsina (Safranina) x 100 ml	Quimical
Gram Lugol x 100 ml	Quimical
Agua Oxigenada	Paracelso
Solución salina (0,9%) 500 ml	-
Kit Pruebas bioquímicas	Microgen GNA
Dimetilsulfoxido (DMSO)	Fisher Chemical
1,8 dihidroxiantraquinona	Sigma Aldrich
1,8 dihidroxi-4,5, dinitroantraquinona	Sigma Aldrich
1,5-dinitroantraquinona	Sigma Aldrich
Antraquinona	Sigma Aldrich

Elaborado por: Autores.

- **Cultivos.**

Los cultivos bacteriológicos son un método para la proliferación deliberada de un microorganismo dentro de un medio adecuado para su desarrollo. El cultivo se realizó usando métodos estándar de laboratorio para identificar y aislar las bacterias usadas en el estudio.

Para esto se realizaron los siguientes pasos:

1. Se esterilizó el asa bacteriológica posteriormente se introdujo en el tubo que contenía los coliformes totales.
2. Se realizó una siembra de estría por agotamiento en medio Agar con Eosina y Azul de Metileno (EMB).
3. Se incubaron las muestras por 24 horas a 37 °C y se identificaron las colonias.

4. Se seleccionaron las colonias aisladas de interés que presentaron ciertas características como es un centro negro oscuro e incluso negro con brillo que se torna verde metálico cuando se observa con la luz.

- **Conservación.**

1. Se colocaron las colonias en tubos *Eppendorf* con 200 μL de solución salina.
2. Se añadió glicerina estéril a este tubo hasta alcanzar una concentración del 15%.
3. Se colocaron estas bacterias en tubos criogénicos con esta solución.
4. Posteriormente, se procedió a sellar y congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

- **Preparación de las antraquinonas.**

Las antraquinonas se disolvieron empleando como solvente Dimetilsulfóxido (DMSO). Las concentraciones preparadas fueron: 4 μM para la 1,8-dihidroxi-antraquinona, 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona y 1,5-dinitroantraquinona, mientras que, por su menor solubilidad la antraquinona se preparó a la concentración 1 μM .

- **Tinción de Gram.**

Este procedimiento permite diferenciar bacterias en dos grandes grupos: las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas. El primer grupo de microorganismos posee una pared celular gruesa conformada de peptidoglicano, aunque carecen de una membrana celular externa, mientras que el segundo grupo, posee de capa fina de peptidoglicano, pero con una membrana celular externa (71).

- **Preparación de la muestra.**

1. Se añadió una gota de suero fisiológico y se colocó una colonia aislada, suspendiendo la muestra sobre un portaobjetos.
2. Se fijó la muestra aplicando calor.
3. Se colocó el portaobjetos en una bandeja para tinción.

- **Tinción.**

1. Se cubrió la preparación con colorante Cristal violeta por un 1 minuto y se lavó con agua destilada la superficie de la placa.
2. Después, se colocó la solución de Lugol durante un minuto y se procedió a lavar.
3. Se agregó Alcohol acetona durante un período de 10 a 15 segundos y se lavó inmediatamente (decoloración).
4. Posteriormente, se añadió Safranina a la preparación durante 1 minuto y se lavó.
5. Luego, se procedió a secar el portaobjeto.
6. Se añadió aceite de inmersión a la muestra.
7. Por último, se observó con el lente 100X y se identificó a las bacterias (Bacilos Gram-negativos).

- **Prueba de Catalasa.**

1. Se colocó una colonia fresca sobre el portaobjetos
2. Se observó inmediatamente si existió la presencia de burbujas, lo que evidencia la liberación de oxígeno.
3. Finalmente, se reportaron los hallazgos.

- **Pruebas Bioquímicas.**

Se utilizaron pruebas bioquímicas de la marca Microgen GNA que consisten en una tira compuesta de 12 substratos deshidratados estandarizados, cada pocillo se reconstituye con una suspensión de solución salina del organismo a identificar. En el caso de los sustratos metabolizados por el microorganismo, se observó un cambio en su coloración durante la incubación o después de la adición de reactivos específicos.

- **Preparación de la muestra**

1. Se colocó 3 ml de Solución Salina (0,9%) en tubos de vidrio y se recolectó una colonia del agar nutritivo, empleando un asa previamente esterilizada.
2. Posteriormente, se aplicó una agitación leve a cada uno de los tubos hasta generar una re-suspensión.

- **Procedimiento para realizar pruebas bioquímicas.**

1. Se pipetearon 100 µL de la suspensión y se colocaron en cada uno de los pocillos, luego se homogenizaron.
2. Posteriormente, se añadió 2 gotas de aceite mineral en los pocillos 1,2,3 y 9, con borde de color negro.
3. Se incubaron por un periodo de 24 horas a 37 °C.
4. En el pocillo 12, se adicione Triptófano Desaminasa (TDA) e inmediatamente, se realizó la lectura del resultado.
5. Luego, se añadió 2 gotas de reactivo de Kovacs en el pocillo número 8 y se revisó el resultado en el transcurso de dos minutos.
6. En el pocillo 10, se añadió una gota de Voges Proskauer (VPI) 1 y luego una gota de VP2. Transcurrido los 30 minutos se procedió a la lectura correspondiente.

- **Interpretación:**

Para identificarse como *E. coli*, las bacterias deben presentar los siguientes resultados:

Tabla 5. Interpretación de pruebas bioquímicas para *Escherichia coli*.

Pruebas bioquímicas	Resultado	Coloración
Lisina	(+)	Verde / azul
Ornitina	(+)	Azul
H ₂ S	(-)	Amarillo pálido
Glucosa	(+)	Amarillo
Manitol	(+)	Amarillo

Xilosa	(+)	Amarillo
ONPG	(+)	Amarillo
Indol	(+)	Rosa / Rojo
Ureasa	(-)	De color paja a rosa salmón pálido
VP	(-)	Incoloro a rosa pálido
Citrato	(-)	Amarillo/ Verde pálido
TDA	(-)	Color paja

Elaborado por: Autores.

Determinación de la sensibilidad de antraquinonas y ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*.

Para iniciar con este procedimiento se estandarizó el número de bacterias *E. coli* en cada una de las muestras, de esta forma se obtuvo una cantidad equivalente a 0,5 dentro de la escala McFarland.

Para la evaluación de la sensibilidad efectuó el siguiente procedimiento realizado por Ali et al. (72):

- Se realizó la siembra de las bacterias en el Agar Mueller Hinton.
- Se colocaron discos de ciprofloxacina y discos de papel filtro cargados con 5 μ l de cada una de las antraquinonas por separado.
- Se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas.
- Se midió el tamaño del halo de inhibición.

✓ **Evaluación del potencial sinérgico de antraquinonas con ciprofloxacina sobre cepas de *Escherichia coli*.**

Para este experimento se usó el **protocolo** descrito por Kaur *et al.* (73):

- Se realizó una siembra de las bacterias (0,5 en la escala de McFarland) en el agar Müller Hinton.
- Se añadió un disco de ciprofloxacina en el centro y los discos con 5 μ L de cada una de las antraquinonas separadas a una distancia de 2 cm del disco

central. Además, se colocó un disco con 5 μL de DMSO como control negativo.

- Se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas.
- Una distorsión o incremento del tamaño del halo de inhibición del disco de ciprofloxacina cercano a alguna de las antraquinonas sugiere que existe capacidad de aumentar el efecto de la ciprofloxacina.

II.6.- Aspectos éticos

Durante el desarrollo de la investigación, se aplicaron las normas y medidas de protección personal como: guantes, batas quirúrgicas, zapatos desechables, cofias y mascarillas. Con la finalidad de evitar contaminación de las muestras o por parte de los autores de la investigación.

El presente trabajo no incurre en contradicciones bioéticas, sin embargo, fue necesario obtener una autorización para el acceso y adquisición de las muestras.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 RESULTADOS

Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* en muestras de agua.

Se obtuvo 20 tubos con coliformes totales en agua, con los cuales se realizó una siembra de estría por agotamiento en placas con Agar EMB y se procedió a incubar por un periodo de 24 horas a 37 °C.

Se presentó un crecimiento significativo en las 20 muestras, lo que se evidenció por la característica particular de reaccionar con EMB, como es un centro oscuro e incluso negro con brillo verde metálico cuando se observa con la presencia de la luz, surgiendo de esta manera la presencia de *Escherichia coli*. Por consiguiente, se realizó la prueba de catalasa, colocando una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos.

De las 20 cepas aisladas 15 evidenciaron la presencia de la enzima catalasa como se observa en la **Tabla 6**, ya que al agitar estas presentaron burbujas. Posteriormente, se efectuó la tinción de Gram en las cepas que presentaron catalasa (+) donde solo 12 mostraron bacilos con coloración rosa pálido, característica de bacterias Gram-negativas. De la misma manera, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas Microgen GNA, donde 10 cepas presentaron los resultados esperados para identificar a la bacteria presente como *E. coli*. De esta forma, se obtuvo 10 bacterias para proseguir en los experimentos planificados.

Tabla 6. Resultados de la prueba para identificar presencia de catalasa, tinción de Gram y pruebas bioquímicas en las 20 muestras.

Muestras	Catalasa	Tinción Gram	Pruebas Bioquímicas
1	(+)	(-)	(+)
2	(+)	(-)	(+)
3	(+)	(-)	(+)
4	(+)	(-)	(+)
5	(+)	(-)	(+)
6	(+)	(-)	(+)
7	(+)	(-)	(+)
8	(+)	(-)	(+)

9	(+)	(-)	(+)
10	(+)	(-)	(+)
11	(+)	(-)	(-)
12	(+)	(-)	(-)
13	(+)	(+)	(-)
14	(+)	(+)	(-)
15	(+)	(+)	(-)
16	(-)	(+)	(-)
17	(-)	(+)	(-)
18	(-)	(+)	(-)
19	(-)	(+)	(-)
20	(-)	(+)	(-)

Nota: (+) Positivo para Catalasa; (-) Negativo para Catalasa, (+) Positivo para Pruebas Bioquímicas; (-) Negativo para Pruebas Bioquímicas, (+) Gram Positivo; (-) Gram Negativo.

Elaborado por: Autores.

Evaluación de la sensibilidad de *Escherichia coli* frente a ciprofloxacina.

Con la finalidad de evaluar la sensibilidad frente a ciprofloxacina de las 10 cepas de *E. coli*, se empleó el método de Kirby Bauer. En el caso de la ciprofloxacina se colocó un disco en cada placa, alcanzando un total de 10 muestras. En tal virtud, se presentan los resultados producidos por ciprofloxacina, según el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano.

Tabla 7. Medición de las zonas de inhibición producida por ciprofloxacina.

Muestra	Diámetro de la zona de inhibición (mm)
1	32
2	34
3	32
4	34
5	28
6	34
7	34
8	34
9	39
10	28

Elaborado por: Autores

Los patrones estándar del halo de inhibición para cepas de *E. coli*, clasifican la sensibilidad de la ciprofloxacina de la siguiente forma: ≤ 15 mm es resistente, entre 16-20 mm es intermedio y ≥ 21 es sensible (74).

Como se observa, en resultados frente a la ciprofloxacina todas las bacterias presentaron zona de inhibición con valores mayores a 21 mm, hallazgos que se enmarcan en el rango de sensibilidad. Estos resultados indican que las cepas estudiadas, no presentan resistencia frente al compuesto evaluado.

Evaluación de sensibilidad de *Escherichia coli* frente a las antraquinonas.

Cuando se evaluó la sensibilidad de *E. coli* frente a las antraquinonas, los discos cargados con 5 μ l de antraquinona (equivalente a 1,25 μ g), 1,8-dihidroxiantraquinona (equivalente a 5 μ g) y 1,5-dinitroantraquinona (equivalente a 5 μ g), no presentaron una zona de inhibición. No obstante, los discos con 5 μ l de 1,8 dihidroxi - 4,5 dinitroantraquinona (equivalente a 5 μ g) en las muestras 6 y 9 presentaron una zona de inhibición promedio de 14 mm, lo que sugiere que este compuesto es capaz de ejercer algún efecto antibacteriano sobre estas cepas.

Tabla 8. Medición de las zonas de inhibición producida por antraquinonas. Los resultados representan la media aritmética de tres experimentos realizados en triplicado.

Muestras	Promedio del diámetro de la zona de inhibición (mm)			
	1,8 dihidroxiantraquinona	1,8 dihidroxi - 4,5, dinitroantraquinona	1,5 dinitroantraquinona	Antraquinona
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	14	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	14	0	0
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

Elaborado por: Autores.

Evaluación de la sensibilidad de *Escherichia coli* frente a la combinación de ciprofloxacina y antraquinonas.

Para el análisis de la sensibilidad de *E coli* frente a la combinación de antraquinonas y ciprofloxacina, se realizó el método de doble disco. Con respecto a la sensibilidad de los aislados frente a ciprofloxacina junto con antraquinonas, en la serie de la lectura y medición de los halos, se observó que todas las cepas fueron sensibles a ciprofloxacina, puesto que los halos de inhibición se encuentran por encima del promedio ≥ 21 (sensible), mientras que por antraquinonas no presentaron inhibición.

Se observa que la mayoría de las bacterias son sensibles a ciprofloxacina, en mayor proporción las placas de la muestra 9, cuyos halos de inhibición corresponden a 39 mm a diferencia de la muestra 10 que presenta halos de crecimiento que oscilan entre 27 mm.

Tabla 9. Medición de las zonas de inhibición producida por ciprofloxacina y antraquinonas.

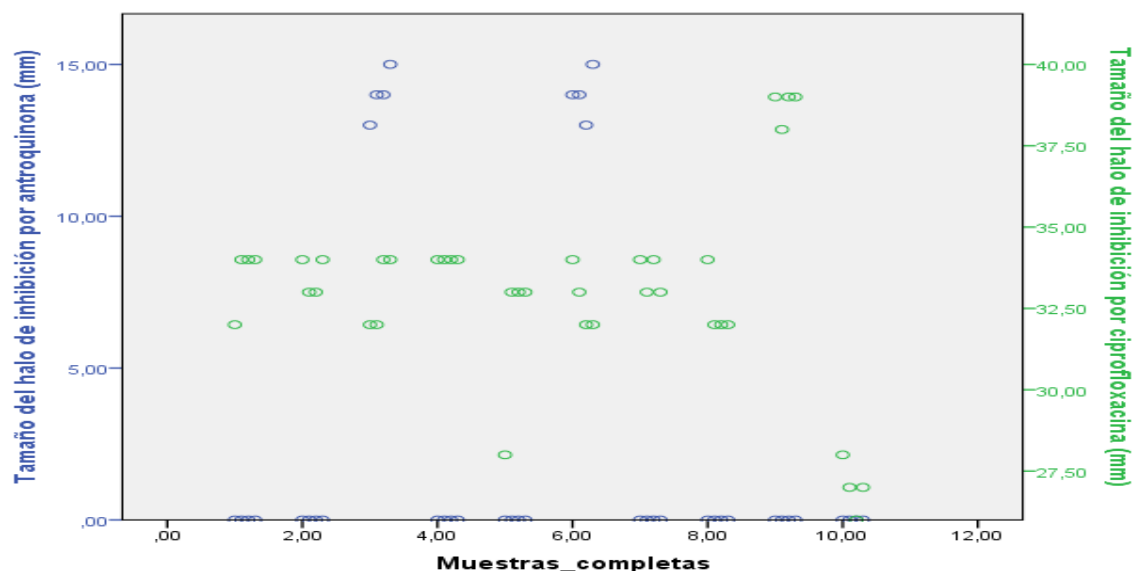
Muestras	Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm)				
	Ciprofloxacina	1,8 dihidroxi	1,8 dihidroxi - 4,5, dinitroantraquinona	1,5 dinitroantraquinona	Antraquinona
1	33	0	0	0	0
2	33	0	0	0	0
3	33	0	0	0	0
4	34	0	0	0	0
5	31	0	0	0	0
6	33	0	0	0	0
7	34	0	0	0	0
8	33	0	0	0	0
9	39	0	0	0	0
10	27	0	0	0	0

Elaborado por: Autores.

En la **Figura 2**, se muestra el diagrama de dispersión de las 10 muestras por el tamaño de halo de inhibición por 1,8 dihidroxi - 4,5 dinitroantraquinona (azul) y ciprofloxacina (verde). Como se observa, la mayoría de las muestras no exhiben halos de inhibición por 1,8 dihidroxi - 4,5 dinitroantraquinona, con excepción de las muestras 3 y 6 que presentan valores mayores a 10mm, pero menores a 15mm. Por

su parte, frente a ciprofloxacina la mayoría presentaron zonas de inhibición entre 32,5 mm y 35 mm, mientras que la muestra 10 y 5 presentan un valor menor a 27,0 mm y el aislado 9 toma un valor mayor a 39,0 mm.

Figura 2. Distribución de los valores del diámetro de los halos de inhibición de las muestras.



Elaborado por: Autores.

Una vez medidos los halos de inhibición que determinan la sensibilidad de ciprofloxacina y el poco efecto frente a antraquinonas sobre las cepas de *E. coli*, se procedió a realizar las pruebas estadísticas mediante el análisis Manova, para medir la variación entre las medias de los diámetros de los halos y la prueba Tukey, para identificar la diferencia entre las mismas, para ello se utilizó los datos de la antraquinona 1,8- dihidroxi -4,5 dinitroantraquinoina que fue la única que presento efecto significativo de zona de inhibición y con respecto a ciprofloxacina se utilizaron todos los datos.

Tabla 10. Estadística descriptiva de las muestras por tamaño de halo de inhibición.

Compuesto	Muestras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ciprofloxacina	Mínimo	33	33	32	34	28	32	33	32	38	26
	Máximo	34	34	34	34	33	34	34	34	39	28
	Media	33,5	33,5	33	34	31,8	32,8	33,5	32,5	38,8	27
	Desviación estándar	1,00	0,58	1,15	0,00	2,50	0,96	0,58	1,00	0,50	0,82
	Varianza	1,00	0,33	1,33	0,00	6,25	0,92	0,33	1,00	0,25	0,67
Antraquinona	Mínimo	0	0	13	0	0	13	0	0	0	0
	Máximo	0	0	15	0	0	15	0	0	0	0
	Media	0	0	14	0	0	14	0	0	0	0
	Desviación estándar	0,00	0,00	0,82	0,00	0,00	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00
	Varianza	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00

Elaborado por: Autores.

En la **Tabla 10**, se exhibe la estadística descriptiva de las muestras, como se observa los diámetros de los halos de inhibición de la ciprofloxacina tienen efecto en todas las muestras, mientras que la 1,8-dihidroxi-4,5 dinitroantraquinona, solo en los aislados 3 y 6.

En este sentido, el mayor valor promedio de diámetro de inhibición por ciprofloxacina presenta la muestra nueve, con una desviación estándar de 38,8 mm una desviación estándar de 0,50 y una varianza de 0,25, mientras que el menor valor presenta el aislado 10 con un valor medio de 27 mm y una desviación estándar de 0,82 y una varianza de 0,67.

Por su parte, la 1,8-dihidroxi-4,5 dinitroantraquinona en la muestra 3 y 6 presenta un valor mínimo de halo de inhibición de 13 y un máximo de 15 con una media de 14, una desviación estándar de 0,82 y una varianza de 0,67.

Tabla 11. Prueba Manova para ciprofloxacina y antraquinona.

Efecto		Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Muestras	Traza de Pillai	1,886	55,019	18,000	60,000	,000
	Lambda de Wilks	,000	170,797 ^b	18,000	58,000	,000
	Traza de Hotelling	331,221	515,232	18,000	56,000	,000
	Raíz mayor de Roy	323,225	1077,416 ^c	9,000	30,000	,000

Elaborado por: Autores.

Como se observa en la **Tabla 11**, los resultados de la prueba Manova, para ciprofloxacina y antraquinona muestra un valor de significancia de 0,00 menor a 0,05, por lo que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias de los aislados, es decir, al menos dos de las medias de los valores del diámetro de inhibición son diferentes en los aislados analizados.

Para saber que muestras presentan diferencias se utilizó la prueba de Tukey que se muestra a continuación.

Tabla 12. Prueba de Tukey para la ciprofloxacina.

Muestra	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
10	4	27,00		
5	4		31,75	
8	4		32,50	
6	4		32,75	
3	4		33,00	
1	4		33,50	
2	4		33,50	
7	4		33,50	
4	4		34,00	
9	4			38,8
Sig.		1,000	,151	1,00

Elaborado por: Autores.

Como se observa en la **Tabla 12**, la prueba de Tukey dividió a las muestras en tres subconjuntos, lo que indica las diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los aislados analizados y los que se ubican en la misma columna implica que no difieren significativamente.

En este sentido, las muestras 1,2,3,4,5,6,7 y 8 pertenecen al subconjunto dos que no presentan diferencias estadísticamente significativas en el valor promedio del diámetro de inhibición con valor mínimo de 31,75 mm y un valor máximo de 34 mm, mientras que los aislados 9 y 10 si presentan diferencias significativas en comparación con los demás aislados con un valor de 27 mm y 38,8 mm, respectivamente.

Los resultados evidencian que todas las muestras de *E. coli* son sensibles a la ciprofloxacina debido a que toman valores mayores a 21.

Tabla 13. Prueba de Tukey para la antraquinona.

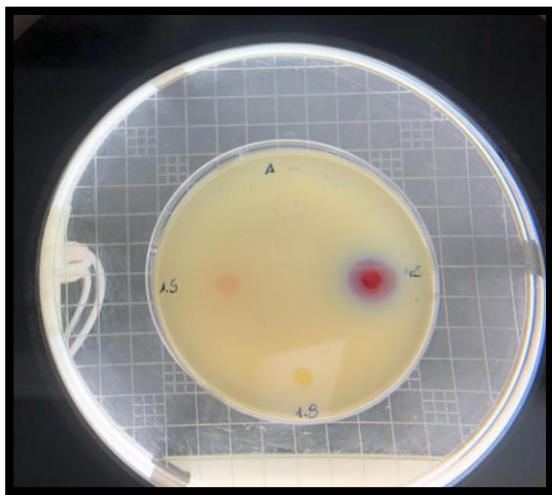
Muestras	N	Subconjunto	
		1	2
1	4	,0000	
2	4	,0000	
4	4	,0000	
5	4	,0000	
7	4	,0000	
8	4	,0000	
9	4	,0000	
10	4	,0000	
3	4		14,0000
6	4		14,0000
Sig.		1,000	1,000

Elaborado por: Autores.

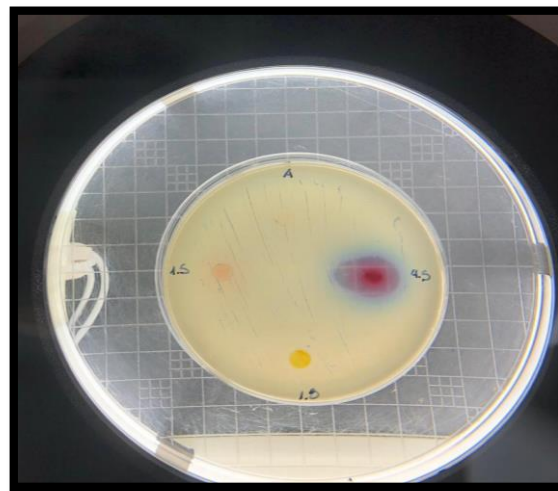
Como se observa en la **Tabla 13**, la Prueba de Tukey para 1,8- dihidroxi -4,5 dinitroantraquinoina presenta dos subconjuntos en los que la mayoría de las muestras presentaron una media de 0 mm, mientras que en los aislados 3 y 6 presentaron un valor promedio de 14 mm.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los experimentos de sensibilidad frente a la ciprofloxacina y a las antraquinonas por separado realizados al inicio de la investigación. Sin embargo, no se observó en ninguno de los casos una distorsión o aumento de la zona de inhibición de la ciprofloxacina inducido por la cercanía de alguno de los discos con antraquinonas, como se muestra a continuación:

Figura 3. Medición de los halos de inhibición de la muestra 3 y 6.



Muestra 3.



Muestra 6.

Elaborado por: Autores.

III. 2 Discusión

Las bacterias Gram-negativas son unos de los grupos bacterianos que tienen un incremento de la resistencia antimicrobiana, siendo *E. coli* una causa frecuente de infecciones bacterianas comunes como del tracto urinario, bacteriemias y diarreas, además, constituye un agente etiológico de meningitis neonatal y neumonía (75).

Por lo antes expuesto, la evaluación de la capacidad antibacteriana de las antraquinonas sintéticas solas o en combinación con ciprofloxacina sobre cepas de *E. coli*, fue el propósito del presente estudio, para ello, se aisló e identificó a la bacteria a partir de 20 muestras obtenidas de agua residual del laboratorio de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca. Se estudió la sensibilidad *in vitro* de los aislados a ciprofloxacina y antraquinonas

(antraquinona, 1,8- dihidroxiantraquinona, 1,5 dihidroxiantraquinona y 1,8-dihidroxi-4,5 dinitroantraquinona) utilizando el método de Kirby Bauer.

De las 20 muestras evaluadas, se obtuvo 10 aislados de *E. coli*. A partir de la identificación de las muestras de *E. coli*, se realizaron los antibiogramas para determinar la susceptibilidad de las cepas frente a ciprofloxacina y antraquinonas por separado y en combinación. En efecto, los resultados obtenidos muestran que, en la evaluación por separado, frente a la ciprofloxacina en las 10 cepas se presentó sensibilidad (halo de inhibición ≥ 21 mm), lo que significa que las cepas no fueron resistentes frente al compuesto.

Los resultados encontrados para ciprofloxacina difieren con los valores presentados por Izquierdo (76), en donde, se valoró la eficacia antibacteriana de los tratamientos para *E. coli* a partir de *Chenopodium ambrosioides* L., comparado con ciprofloxacina, en una muestra de 32 placas, es decir, 160 cepas, que fueron cultivadas en el laboratorio, por una parte la bacteria presentó resistencia a ciprofloxacina, dado que presentó un halo de inhibición promedio de 14,26 mm, en cambio por *Chenopodium ambrosioides* L. se presenta una zona de inhibición de 11,64 mm. La diferencia de los resultados, especialmente por ciprofloxacina se puede ocasionar porque en el experimento de Izquierdo (76) utilizaron el método de crecimiento de colonias, equivalente a un 0,5 McFarland estándar.

Por otro lado, el presente estudio concuerda con los datos presentados por Alves, Jerónima y Sousa (77), investigación realizada en Brasil para analizar el efecto de la ciprofloxacina frente a *E. coli*. Las muestras de bacterias se tomaron de una colección de cultivos de laboratorio de análisis de un hospital de la región. Los resultados de las medias aritméticas de los halos de inhibición para la bacteria muestran que la ciprofloxacina tuvo un diámetro de crecimiento superior a los 37 mm, lo que evidencia sensibilidad. Como se observa en este estudio las cepas se tomaron de un hospital, en donde se presenta mayor sensibilidad, presumiblemente por la acción de otros antibióticos ya suministrados a los pacientes.

De igual manera, Romeu, Salazar, Lugo, Rojas y Eslava (75), reportaron que a partir de 113 aislados de *E. coli* colectados de ríos de la zona urbana, 11 cepas resultaron resistentes a ciprofloxacina. En tal sentido, el 23% de las cepas de *E. coli* resultaron resistentes a varios antibióticos, entre ellos la ciprofloxacina. En este caso, las muestras provienen de un lugar muy similar a las consideradas en el presente estudio, pero la resistencia se muestra en un pequeño porcentaje, no obstante, es evidente que el tamaño de la muestra empleada en esta investigación no fue lo suficientemente amplia, por lo que ninguna presentó resistencia.

En contraste, en la investigación de Domínguez (78) encontraron que 36 muestras de *E. coli* presentaron un diámetro de halo de inhibición mínimo de 26 y máximo de 32, con una media de 28, con ello se evidenció la eficacia de la ciprofloxacina, resultados que concuerdan con la presente investigación en donde se evidenció un valor mínimo de 27 y un máximo de 39 mm. Es importante mencionar que las muestras del estudio de Domínguez (78) se sembraron en el laboratorio (aire ambiente) por un periodo de 16 a 20 horas. Aunque son resultados similares con los obtenidos en el presente estudio, se observó una zona de inhibición menor.

Por otro lado, al realizar las pruebas con las antraquinonas: antraquinona, 1,8 dihidroxi-antraquinona y 1,5 dinitroantraquinona no evidenció una zona de inhibición en ninguna de las cepas estudiadas. Sin embargo, con la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona dos de las muestras evaluadas presentaron una zona de inhibición mínima de 13 mm y máxima de 15 mm. Estos resultados sugieren que este compuesto podría tener potencial antibacteriano sobre algunas cepas de *E. coli*. Obviamente nuevas investigaciones deberían ser realizadas para determinar los mecanismos que permiten que este compuesto actúe solamente sobre algunas cepas de esta bacteria.

Sin embargo, existe un registro con la evaluación del efecto de la *Cassia reticulata* que contiene tres antraquinonas (dihidroxiantraquinonas; 1, 3,8-tridroxiantraquinona; 1, 6,8-triidroxi-3-metoxiantraquinona), cuyo extracto en concentraciones al 100% refleja un halo de 23,4 mm, inferior al producido por

ciprofloxacina con un diámetro de 28 mm para las cepas *E. coli*, demostrando mayor eficacia antimicrobiana para este antibiótico. (78)

Por otro lado, Cooling et al. (79) evidenciaron que 1,8 dihidroxiantraquinona en cantidades de 2,8,41 y 102 μM no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento bacteriano de *E. coli*, resultados que concuerdan con el presente trabajo.

Además, estos resultados sugieren que para ser activos este tipo de antraquinonas requieren de la presencia de grupos nitro en las posiciones 4 y 5 de la antraquinona junto con los grupos hidroxilo en las posiciones 1 y 8, ya que la antraquinona con solamente grupos hidroxilo no presentó efecto. Por otro lado, los grupos nitros en las posiciones 1 y 5, no presentaron beneficio para el efecto antibacteriano en las concentraciones probadas. Sin embargo, en vista de que la antraquinona sin grupos funcionales solo fue probada en una cantidad de 1,25 μg en disco, no se puede descartar que mayores concentraciones puedan exhibir algún efecto.

Los resultados publicados con antraquinonas, hasta el momento de la presente discusión, no muestran estudios con 1,8-dihidroxi-4,5 dinitroantraquinona, por lo que este sería el primer reporte sobre sus efectos sobre algunas cepas de *E. coli*.

En cuanto a la evaluación de la sensibilidad de los aislados frente a ciprofloxacina en combinación con las antraquinonas, se identificaron los halos de inhibición de la ciprofloxacina, cuyos diámetros oscilan entre 26 y 39 mm, pero que no se acrecientan por la proximidad de las antraquinonas.

Por otro lado, un estudio presentado por Domínguez (80) en Perú, verificó la eficacia de senósidos (*Cassia*) y de ciprofloxacina, registrando mayor eficacia de ciprofloxacina por separado, debido que presenta una zona de inhibición máxima de 32 mm, mientras que al conjugar la ciprofloxacina con antraquinona presenta un halo de 28mm.

Adicionalmente, tampoco existen antecedentes en la bibliografía del estudio del potencial de los compuestos usados en el presente trabajo para mejorar el efecto de la ciprofloxacina. A pesar de que los resultados obtenidos en esta investigación no revelan esta capacidad en estas antraquinonas, nuevas investigaciones deberán

ser realizadas para evaluar su capacidad potenciadora o sinérgica sobre un mayor número de cepas.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

Una vez desarrollado el presente estudio con la finalidad de evaluar la capacidad antibacteriana de las antraquinonas sintéticas solas y en combinación con ciprofloxacina sobre cepas *E. coli*, se presentan las siguientes conclusiones:

- En las muestras de agua residual se determinó la existencia de *E. coli*, mismas que presentan sensibilidad frente a ciprofloxacina.

- Al evaluar los resultados *in vitro* de la susceptibilidad de *E. coli* frente a la antraquinona, se determinó que únicamente 1,8-dihidroxi-4,5 dinitroantraquinona muestra halos de inhibición en dos cepas, razón por la cual, se evidenció un efecto antibacteriano generado por esta antraquinona sobre las cepas de *E. coli*.

- Por último, la comparación de la sensibilidad *in vitro* de *E. coli* a la ciprofloxacina en combinación con las antraquinonas utilizadas en este estudio refleja que, las antraquinonas no presentaron capacidad para aumentar el efecto de la ciprofloxacina.

IV.2.- RECOMENDACIONES

De acuerdo con las conclusiones precedentes, a continuación, se presentan las recomendaciones derivadas del desarrollo del estudio.

- Se debería estudiar un mayor número de cepas en futuras investigaciones para tener un mayor panorama de la situación de resistencia a ciprofloxacina en nuestro medio.
- En nuevos trabajos se podría evaluar el efecto de estos compuestos sobre otras cepas de *E. coli*, resistentes a otros antibióticos.
- Adicionalmente, se debería probar la antraquinona sin grupos funcionales en concentraciones equivalente a las que fueron usadas las otras antraquinonas de este estudio y así esclarecer si la ausencia de efecto se debió solamente a la menor concentración.
- Además, se podría evaluar el efecto de estas mismas antraquinonas empleando otras metodologías que permitan probarlos en otras concentraciones, inclusive mayores a las usadas en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Orrego-Marin C, Henao-Mejia P, Cardona-Arias J. Prevalencia de infección urinaria, uropatógenos y perfil de susceptibilidad antimicrobiana. Acta médica colombiana. 2014 Octubre-diciembre; 39(4).
2. Mosquito S *et al.* Mecanismo moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2011; 28(4).
3. López M. Plantas de acción laxante en el tratamiento del estreñimiento primario. Fitoterapia. 2000.
4. European Food Safety Authority. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. Scientific Report. Estocolmo.; 2020.
5. Guamán W, Tamayo V, Villacís J, Reyes J, Muñoz O, Torres J, *et al.* Resistencia bacteriana de *Escherichia coli* uropatógena en población nativa amerindia Kichwa de Ecuador. Rev Fac Cien Med. 2017 octubre; 42(1).
6. Organización Mundial de la Salud. Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Manual. Ginebra: OMS; 2017.
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. ECDC; 2019.
8. Asmat P, Peña H, Ruiz W, Lezama P. Detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* aisladas de urocultivos de tres hospitales de la ciudad de Trujillo-Perú, noviembre 2014. PUEBLO CONTINENTE. 2015 noviembre; 26(1).

9. Tamayo V, Guamán W, Villacís J, Reyes J, Muñoz O, Torres J, *et al.* Resistencia bacteriana de *Escherichia coli* uropatógena en población nativa amerindia Kichwa de Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*. 2017 ; 42(1).
10. Sánchez J, Guillán C, Fuster C, López R, González M, Raya C, *et al.* Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Urología General*. 2008 ; 61(7).
11. ECDC/EMA ITC. Tiempo de Reacción una llamada a reducir la brecha entre las bacterias a múltiples fármacos. In *Enfermedades CEplpycd. Desafío Bacteriano*. Estocolmo; 2015.
12. Malik E, Müller C. Anthraquinones As Pharmacological tools and drugs. *Wiley Online Library*. 2016; 36(4).
13. Fouillaud M, Venkatachalam M, Girard-Valenciennes , Emmanuelle , Caro Y, Dufossé L. Anthraquinones and Derivatives from Marine-Derived Fungi: Structural Diversity and Selected Biological Activities. *marine drugs*. 2016.
14. Dong X, Fu , Yin X, Cao S, Li X, Lin L, *et al.* Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. *Wiley Online Libreary*. 2016; 30(8).
15. Hernández M. Caracterización de fármacos (emodina, ketorolaco, indometacina y piroxicam) sobre nanopartículas metálicas mediante espectroscopía molecular (SERS y MEF). Madrid. 2017.
16. López M. Efectividad antibacteriana *in vitro* del gel de *Burm. f.(aloe vera)* y extracto hidroetanólico de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Perú. 2018.

17. Malmir M, Serrano R, Silva O. Anthraquinones as potential antimicrobial agents - A review. Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa). 2017.
18. Li L, Song X, Yin Z, Ji R, Li Z, Zhou X, *et al.* The antibacterial activity and action mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis in vitro*. Elsevier. 2016.
19. Cabrera, L., Díaz, L., Miralles, A., Ones, R., Torres, Y., Pantaleón, M. Efectividad in vitro de la amikacina y fosfomicina en cepas de *Escherichia coli* uropatógena multidrogosresistentes. Correo científico médico. 2019; 23(4).
20. López O, León J, Jiménez M, Chaidez C. DETECCIÓN Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE *Escherichia coli* Y *Salmonella* EN AGUA Y SUELO AGRÍCOLA. Rev. Fitotec. 2009 mayo; 32(2).
21. Requena I, Carlos de Pace PT, Padrón A. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO. Saber, Universidad de Oriente. 2007 noviembre; 19(2).
22. Palacio M. Caracterización clínico-demográfica y resistencia bacteriana de las infecciones del tracto urinario en el Hospital Básico de Paute, Azuay - Ecuador. Researchgate. 2018.
23. Saavedra F, López B, Yrei V, Gallardo T, Ale N, Gordillo G. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y FUNGICIDA DE LAS ANTRAQUINONAS DE *Aloe vera* L. COMBINADAS CON CATIONES COBRE, HIERRO, PLATA Y BISMUTO. Ciencia e Investigación. 2012; 15(1).
24. Leonidah K, Jacob O, Armelle T, Simplicie B, Jackson A, Voukeng I, *et al.* Antibacterial activities and structure– activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. SpringerPlus. 2016.

25. Camacho C, Pérez Y, Valdivia A, Ramírez H, Gómez L. Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta* L. Centro de Estudios Biotecnológicos. 2018.
26. Prateeksha , Aslam M, Singh B, Sudheer S, Kharwar R, Siddiqui S, et al. Chrysophanol: A Natural Anthraquinone with Multifaceted Biotherapeutic Potential. *Biomolecules*. 2019 ; 9(2).
27. Gokulan K, Kolluru P, Khare S. Dose-Dependent Effects of Aloin on the Intestinal Bacterial Community Structure, Short Chain Fatty Acids Metabolism and Intestinal Epithelial Cell Permeability. Division of Microbiology. 2019.
28. Jiang L, Tian Y, Shen Z, Teng Z, Wang J. Aloe-emodin Attenuates *Staphylococcus aureus* Pathogenicity by Interfering With the Oligomerization of α -Toxin. Department of Dermatology, Second Hospital of Jilin University, Jilin University, Changchun, China. 2019.
29. Park J, Seon H. Antimicrobial activities of 1,2-dihydroxyanthraquinone derivatives against food-borne bacteria. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2015; 58.
30. Coenye T, Honraet K, Rigole P, Jimenez P, Nelis H. In Vitro Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation on Hydroxyapatite by Subinhibitory Concentrations of Anthraquinones. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2007; 51(4).
31. Organización Mundial de la Salud. Organización Mundial de la Salud. [Online].; 2018 [cited 2020 marzo 11. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
32. Pèrez, M., & Mota, M. Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*. 2008.

33. Liébana J. MICROBIOLOGÍA ORAL Madrid: Mc Graw Hill; 2002.
34. Aquili V. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* con fenotipos de multirresistencia inducidos o seleccionados in vitro con antimicrobianos. Tesis doctoral. Las Palmas de Gran Canaria: Universidad de las Palmas de Gran Canaria; 2007.
35. Palaniappan RU, Zhang Y, Chiu D, Torres A, DebRoy C, Whittam TS, et al. Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. [Online].; 2006 [cited 2019 Junio 27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1448672/#!po=86.5385>.
36. Seija V. COCOS GRAM POSITIVOS: Aspectos prácticos. Higiene. 2019.
37. Hernandez S, Domínguez E, Gonzaga L. Magnetic field influence in *E coli*, and *S. cerevisiae* Growth and the Ability of *Pseudomonas* sp an *Bacillus* sp to be Phosphorous Solubilizers for industrial Usage. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. 2015 ; 19(1).
38. Gomes, T., Elias, W., Scaletsky, I., Guth, B., Rodrigues, J., Piazza, R., Ferreira, L., Martinez, M. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology. 2016 ; 47(1).
39. Figueroa E. TeensHealth. [Online].; 2016 [cited 2020 marzo 11. Available from: <https://kidshealth.org/es/teens/uti-esp.html>.
40. Ríos D, Cerna J, Morán N, Meza M, Estrada T. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. Gaceta médica de México. 2019.
41. Aguilar D. *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. Médica Sur. 2016; 22(2).

42. Torres A. *Escherichia coli* diseases in Latin America—a 'One Health' multidisciplinary approach. Europa.; 2017.
43. Ministerio de Salud Pública. Infección de vías urinarias en el embarazo. Quito.; 2013.
44. Hernández C, Blanco V, Mota G, Correa A, Maya J, de la Cadena E, *et al.* Grupo de Resistencia Bacteriana Nosocomial en Colombia Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 2014; 34(1).
45. Díaz S, Ríos C, Solórzano F, Calle C, Penagos D, Matallana R, *et al.* Microbiología de la peritonitis secundaria adquirida en la comunidad, Clínica CES. *Revista Colombia*. 2012 2002; 27.
46. Mella S, Sepúlveda M, González G, Bello H, Domínguez M, Zemelmanz E, Ramírez G. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Rev Chil Infect*. 2004; 21(4).
47. Ministerio de la Salud. Guía de medicamentos esenciales para el PNA Antimicrobianos. Guía. Argentina: Presidencia de la Nación; 2017.
48. Shahbaz K. Cephalosporins: pharmacology and chemistry. University of Technology Sydney. 2017.
49. Mensa J, Gatell J. Guía de terapéutica antimicrobiana 2012. Elsevier Doyma. 2012.
50. IQB Er. VADEMECUM. [Online].; 2012 [cited 2019 Junio 27. Available from: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/t074.htm>.
51. Quintela M. Fosfomicina trometamol: perfil farmacológico y lugar en el tratamiento de las infecciones urinarias. Departamento de farmacología y terapéutica. 2017; 8(1).

52. Quintela M. Nitrofurantoína macrocristales para el tratamiento empírico de la cistitis aguda no complicada en mujeres. Departamento de Farmacología y Terapéutica. 2016 ; 7(2).
53. Camacho V. Los antimicrobianos en la practica médica. 2011.
54. Álvarez, D., Garza, G., Vázquez, R. Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. Antimicrobianos. 2015.
55. Spain V. Vademecum.es. [Online].; 2019 [cited 2019 Junio 27. Available from: <https://www.vademecum.es/principios-activos-ciprofloxacino-j01ma02>.
56. Ruiz P, Cantón R. Epidemiología de los Bacilos Gramnegativos. Rev Esp Quimioter. 2016 ; p. 21-25.
57. Magiorakos A, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas M, Giske C. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18(2).
58. Fica A. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN BACILOS GRAM NEGATIVOS, COCÁCEAS GRAM POSITIVAS Y ANAEROBIOS. REV. MED. CLIN. CONDES. 2014; 25(3).
59. Ruíz J. Mechanisms of resistance to quinolones, target alterations decreased accumulation and DNA gyrase protection. Antimicrob Chemother. 2013.
60. Mosquito S, Ruiz J, Bauer J, Ochoa T. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en Escherichia coli asociadas a diarrea. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2011 noviembre; 28(4).
61. Chemycal C. Cattior Nordmann Plasmid - mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species. Medical Chemycal. 2018 Apr.

62. Tan Z ,Li F & Xu X. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from Aloe vera L. using alcohol/salt aqueous two-phase system. Bioprocess and biosystems engineerin. 2013 ; 36(8)
63. Vega A, Ampuero N, Díaz L, Lemus R. El *aloe vera* (Barbadensis miller) como componente de alimentos funcionales. Revista chilena de nutrición. 2005; 32(3).
64. Tres J. Interacción entre fármacos y plantas medicinales. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 2006 ; 29(2).
65. Pájaro N, Granados C, Torrenegra E. Actividad antibacteriana del extracto etanólico del peciolo de *Rheum Rhabarbarum*. Revista Colombina Quimica Farmaceutica. 2018 ; 47(1).
66. Borri K, Varela B, Gurni A. Estudio preliminar comparativo entre la corteza de ¿espino cerval? Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2007; 6(5).
67. Ramírez G. Sen (*Cassia agustifolia Vahl*). Natura Medicatrx. 2003; 6.
68. Singh P, Pant N. Phytochemistry and Biological Activity Perspectives of Rheum Species. The Natural Products Journal. 2016; 6(2).
69. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Servicio de Microbiología. 2003 ; 16(4).
70. Zúñiga C. Preparaciones farmacéuticas de los siglos XIX y XX en la región oriental de Cuba. Revista Cubana de Farmacia. 2016; 50(1).
71. López L, Hernández M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. invetigacion en discapacidad. 2014; 3(1).

72. Ali S, Naqvi B, Shah S, Bushra R. Resistance pattern of ciprofloxacin Against Different Pathogens. *Oman Med.* 2010 ; 25(4).
73. Kaur J, Chopra S, Mahajan G. Modified double disc synergy test to detect ESBL production in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Diag Res.* 2013; 7(2).
74. García J. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 2000.
75. Romeu B, Salazar P, Lugo D, Rojas N, Eslava C. Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista Cubana de Medicina Tropical.* 2012; p. 132-141.
76. Izquierdo H. Eficacia antibacteriana de los extractos etanólicos de *Chenopodium ambrosioides* L. "Paico" y el *Pimpinella anisum* L. "Anis" comparado con Ciprofloxacino sobre Cepa de *Escherichia coli*: un estudio in vitro ; 2016.
77. Alves E, Jerónima M, Sousa V. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E TRIAGEM FITOQUÍMICA DO. DO HIBISCO. 2018
78. Domiguez J. Eficación antimicrobiana de *Cassia reticulata* "retama" sobre cepas de *Staphylococcus* y *Escherichia coli*, comparado con ciprofloxacino, estudio in vitro. 2016.
79. Cooling , Maloney E, Nagel J, Tabinowski , Odom J. Inhibition of sulfate respiration by 1,8-dihydroxyanthraquinone and other anthraquinone derivates. *Applied and enviromental microbiology.* 1996 .

80. Dominguez J. Eficacia antimicrobiana de *Cassia reticulata* “retama” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, comparado con Ciprofloxacino, Estudio In Vitro. Perú;; 2016.
81. INEC. Ecuador, pionero en medición de ODS de Agua, Saneamiento e Higiene. Ecuador;; 2017.
82. Yábar N, Curi B, Torres C, Calderón R, Riveros M, Ochoa T. Multirresistencia y factores asociados a la presencia de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* provenientes de urocultivos. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2017; 34.
83. Ovalle M, Saavedra S, González M, Hidalgo A, Duarte C, Beltrán M. Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. Biomédica. 2017; 37.
84. Díaz S, Ríos D, Solórzano F, Calle C, Penagos D, Matallana R, et al. Microbiología de la peritonitis secundaria adquirida en la comunidad, Clínica CES.. Revista Colombia. 2012; 27(1).
85. Suárez B, Milián Y, Espinosa F, Hart M, Llanes N, Martínez M. Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos en un hospital de tercer nivel. Revista Cubana de Medicina. 2014; 53(1).
86. Chávez Jacobo V, Ramírez-Díaz M, Silva-Sánchez J, Cervantes C. Resistencia Bacteriana a Quinolonas: Determinantes Codificados en Plásmidos. SciELO Analytics. 2015 mayo; 34(1).
87. Campos Arcce R. Contenido de antraquinonas en hojas y flores de *Senna alata* “mutuy” y *Senna birostris* “mutuy”. Tesis universitario. Ayacucho:

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD; 2016.

88. Díaz L *et al.* El Aloe vera su aplicación terapéutica en la enfermedad periodontal inflamatoria crónica. *Revista Médica Electrónica*. 2018; 3(40).
89. Rodríguez A. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *SciELO Analytics*. 2002 septiembre; 44(5).
90. Peña. Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Escuela Latinoamericana de Medicina*. 2011; 1(6).
91. Azelmat J, Larente J, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Oral Biology*. 2015 ; 60(2).
92. Arokiyaraj , Muthupandian Y, Kyoung K. Green synthesis of silver nanoparticles using Rheum palmatum root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016; 45(2).
93. Rodríguez R, Muñoz E. Frecuencia y Susceptibilidad Antimicrobiana de Bacterias Causantes de Mastitis en Bovinos de un Establo de Trujillo, Perú. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28(4).
94. Ramírez G. Sen (cassia angustifolia Vhl). *Natura Medicatrix*. 2003; 21(6).
95. Organización Mundial de Salud. *infosalus.com*. [Online].; 2020. Available from: <https://www.infosalus.com/actualidad/noticia-oms-advierte-colapso-sanitario-coronavirus-puede-aumentar-muertes-enfermedades-tratables-20200330172909.html>.

96. Herrera L. Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. 2004; p. 33-41.
97. Sarasti D. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal *Moringa oleífera*. Quito; 2018.
98. Masadeh M, Alzoubi K, Khabour O, Al-Azzam S. Ciprofloxacin-induced antibacterial activity is attenuated by phosphodiesterase inhibitors. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2015; p. 14-17.
99. Ali S, Zehra A, Naqvi B, Shah S, Bushra R. Resistance pattern of ciprofloxacin against different pathogens. *Oman Med*. 2010; p. 294-298.
100. Raianny W, Da Silva H, Rmalho , Eugênia L , Sonildo B, De Oliveira M. Actividad antibacteriana e interaçã *in vitro* do extrato de *Piper montealegreanum* Yuncker com antibióticos de uso clínico. *Revista Cubana de Plantas medicinales*. 2018; 23(2).
101. Borroto J, Trujillo R, De la Torre C, Waksman N, Hernández M, Salazar R. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracjo diclorometánico de raíces de *Morinda royo*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2011; 16(1).
102. Suasnavas J, Flores R, Echeverría I. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de microalgas usando cepas ATCC. *Química Central*. 2017; 6(1).

ANEXOS

Anexo 1. Esterilización de material.



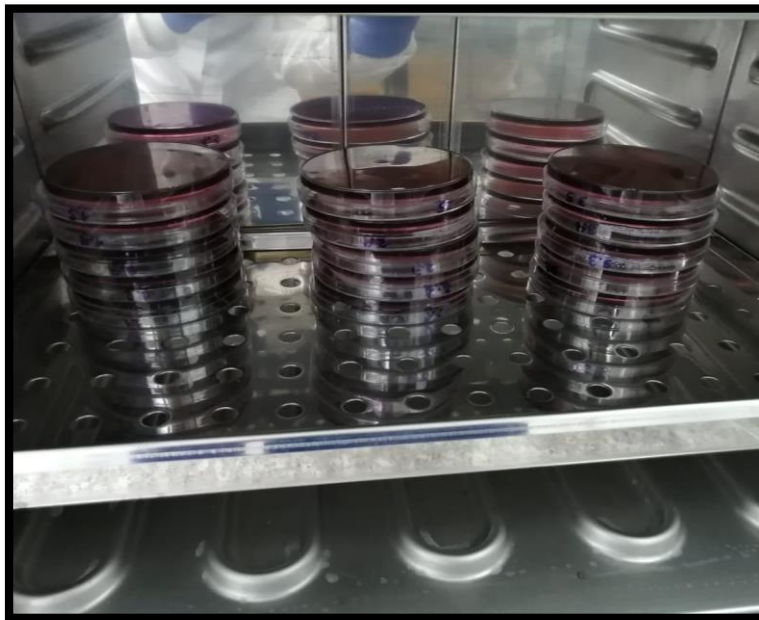
Anexo 2. Preparación del agar EMB.



Anexo 3. Siembra por estría normal en el agar EMB.



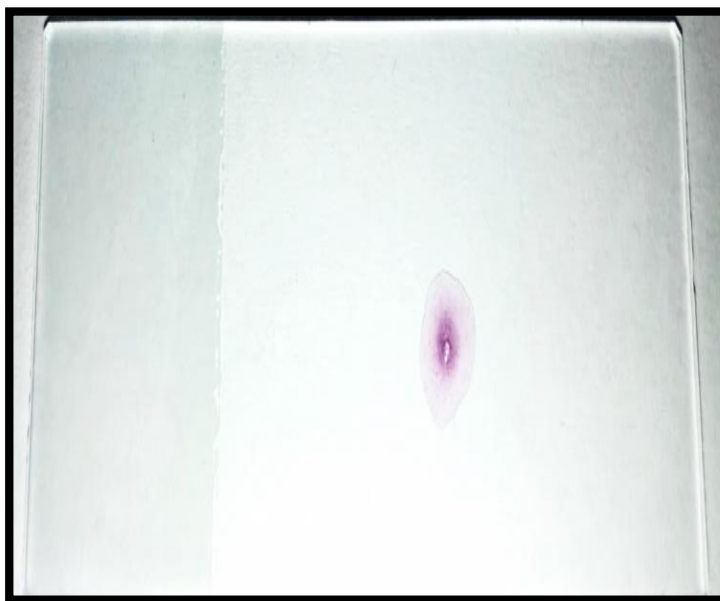
Anexo 4. Incubación de *Escherichia coli* sembrada en Agar EMB.



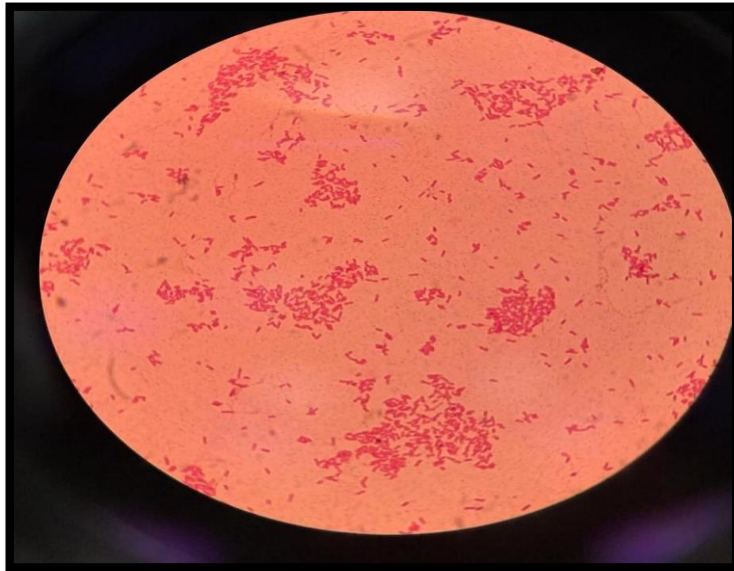
Anexo 5. Crecimiento de *Escherichia coli* en Agar EMB.



Anexo 6. Prueba de catalasa realizada en *Escherichia coli*.



Anexo 7. Tinción de Gram realizada a muestras de *Escherichia coli*.



Anexo 8. Identificación de *Escherichia coli* empleando pruebas bioquímicas Microgen GNA.



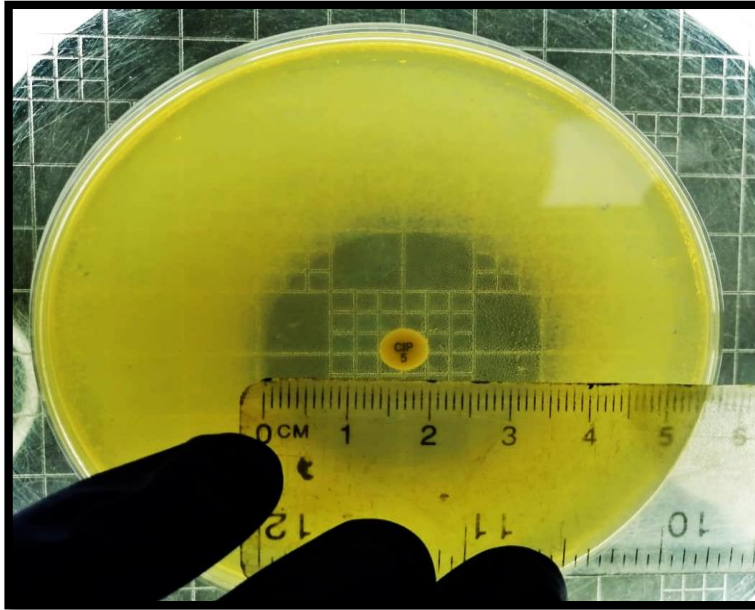
Anexo 9. Preparación del Agar *Müller Hinton*.



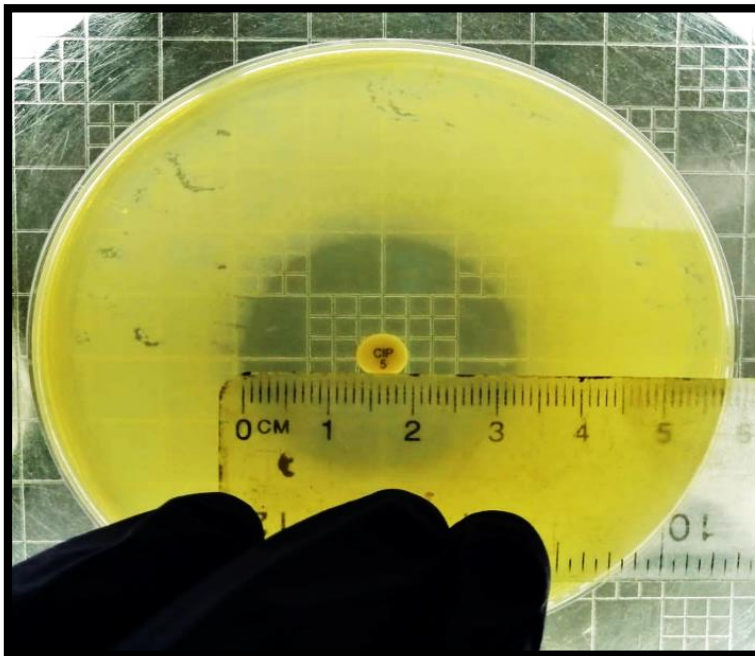
Anexo 10. Incubación de las muestras de *Escherichia coli* en Agar *Müller Hinton*.



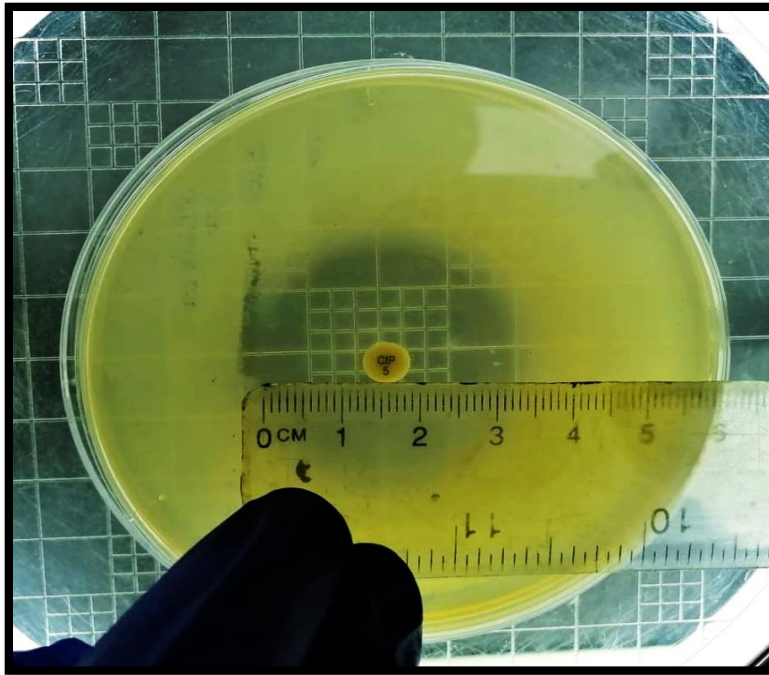
Anexo 11. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 1.



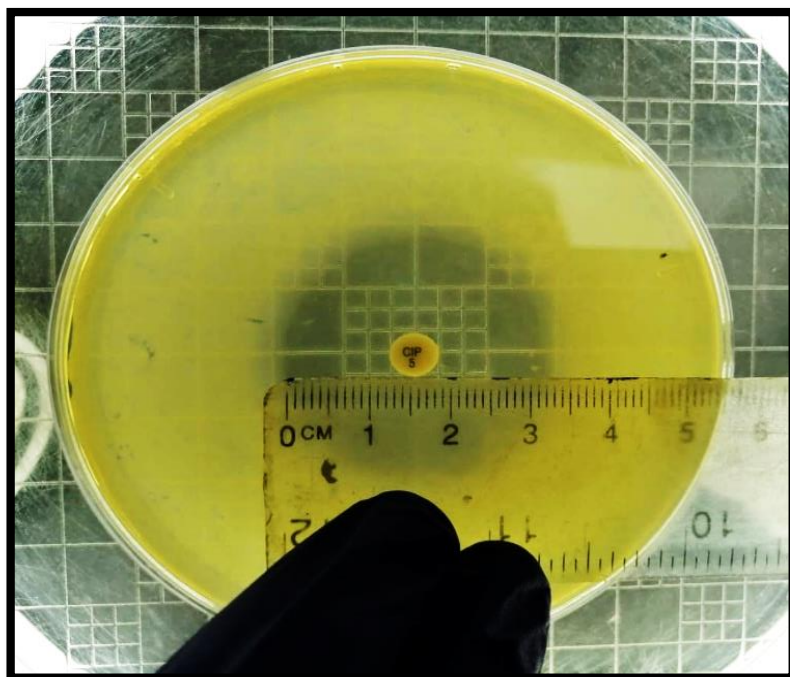
Anexo 12. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 2.



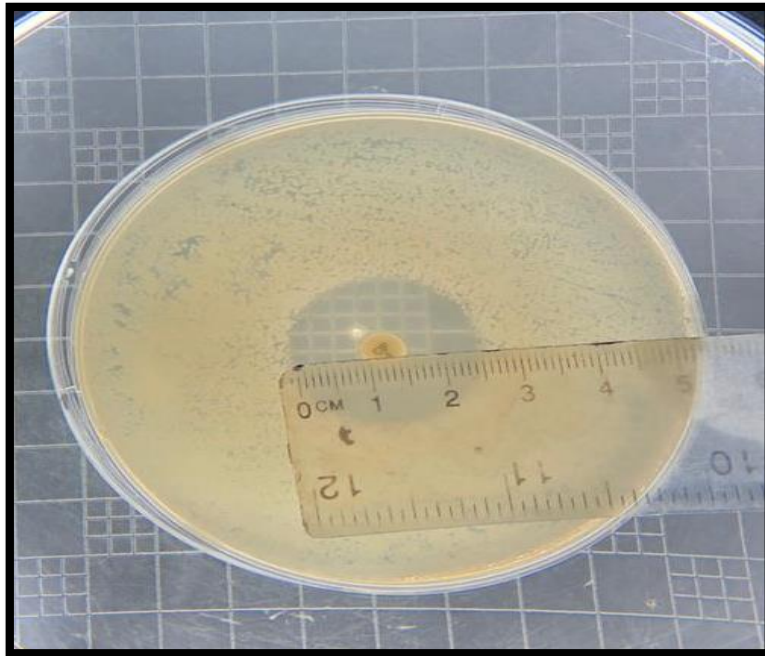
Anexo 13. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 3.



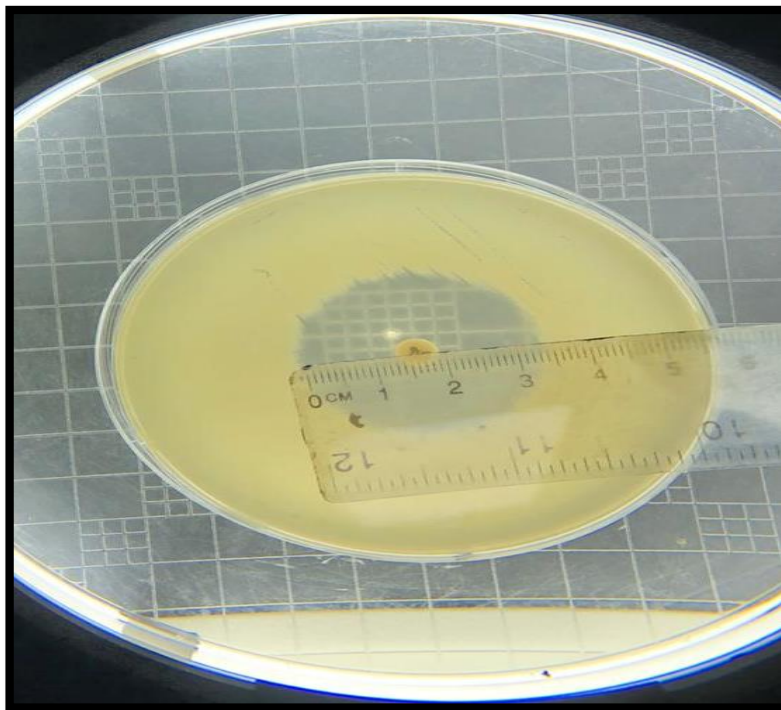
Anexo 14. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 4.



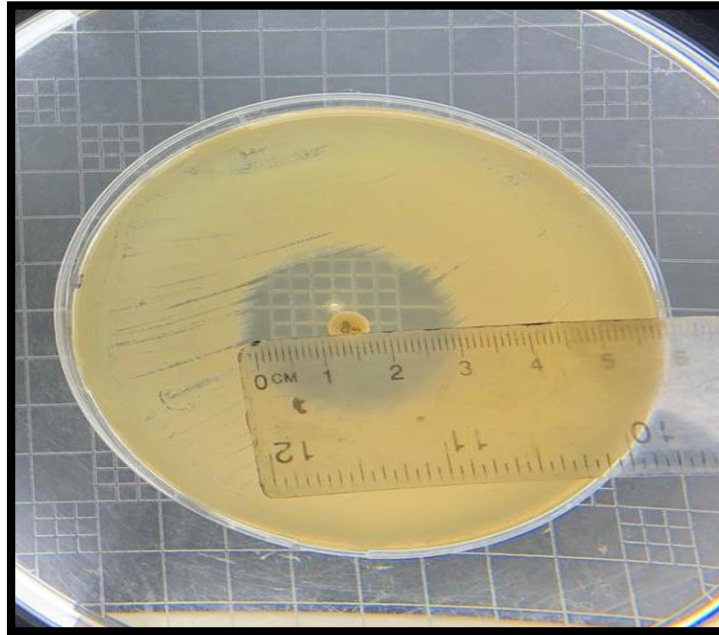
Anexo 15. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 5.



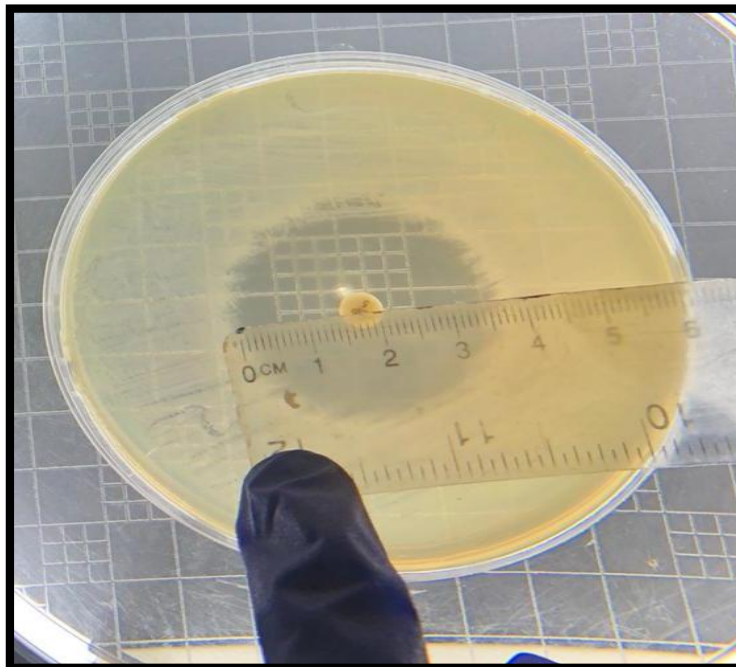
Anexo 16. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 6.



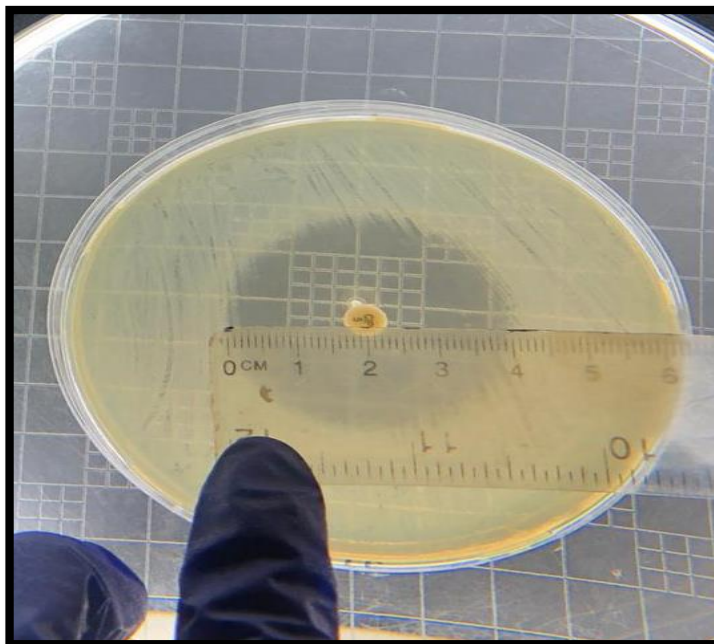
Anexo 17. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 7.



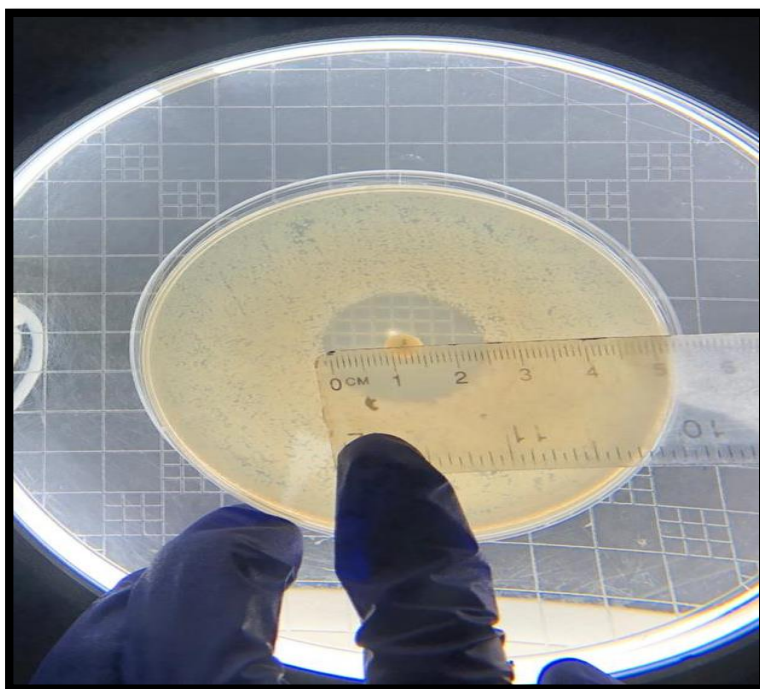
Anexo 18. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 8.



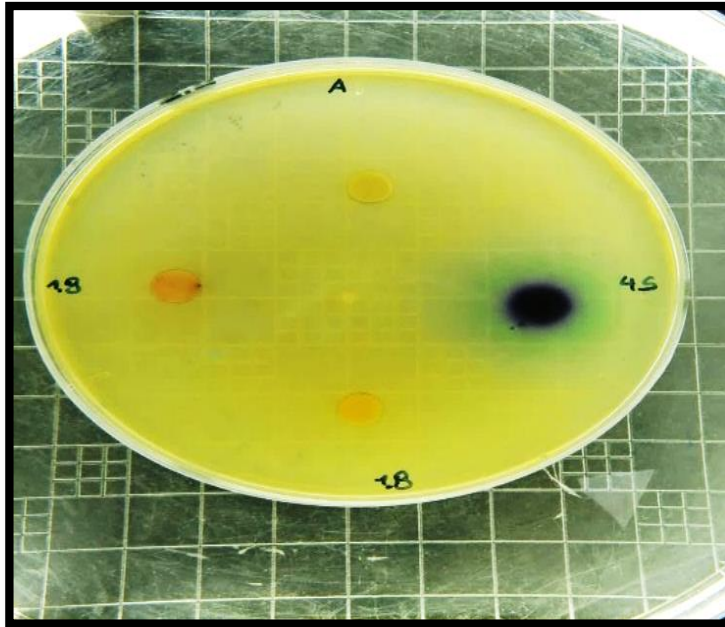
Anexo 19. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 9.



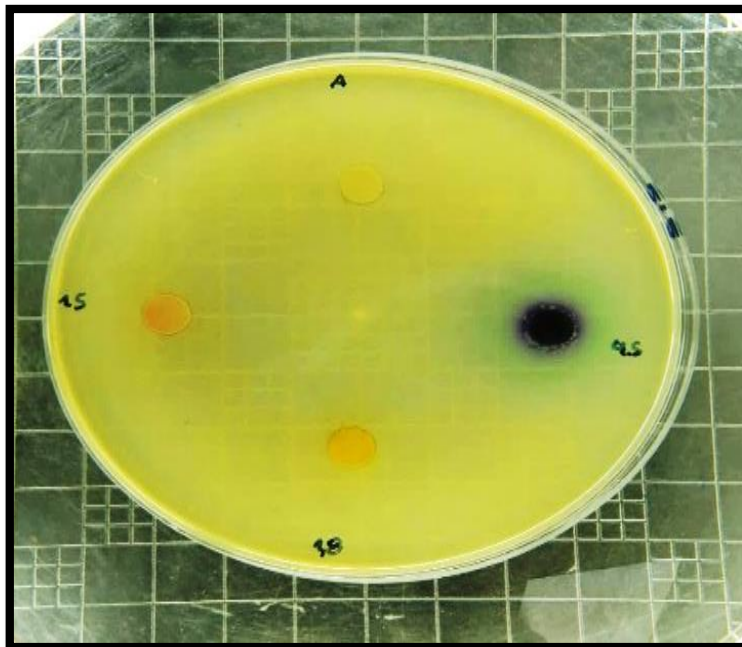
Anexo 20. Medición de los halos producidos por ciprofloxacina. Muestra 10.



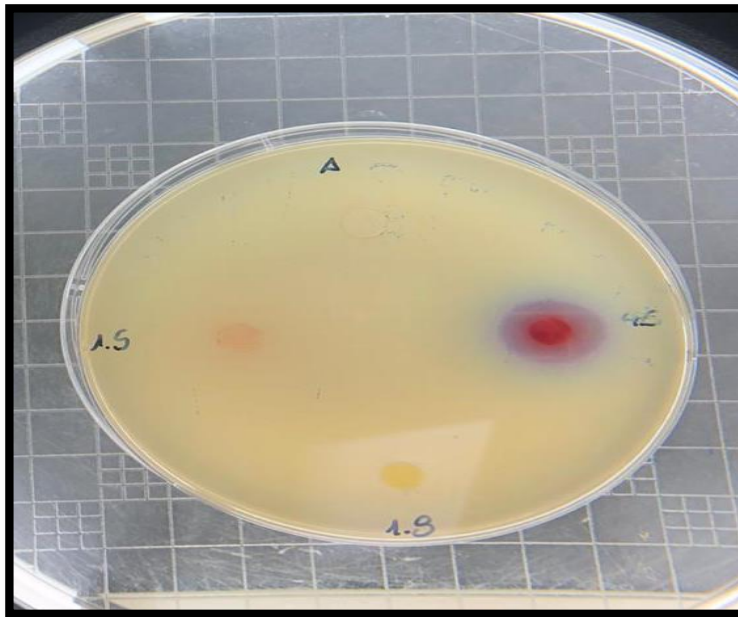
Anexo 21. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 1.



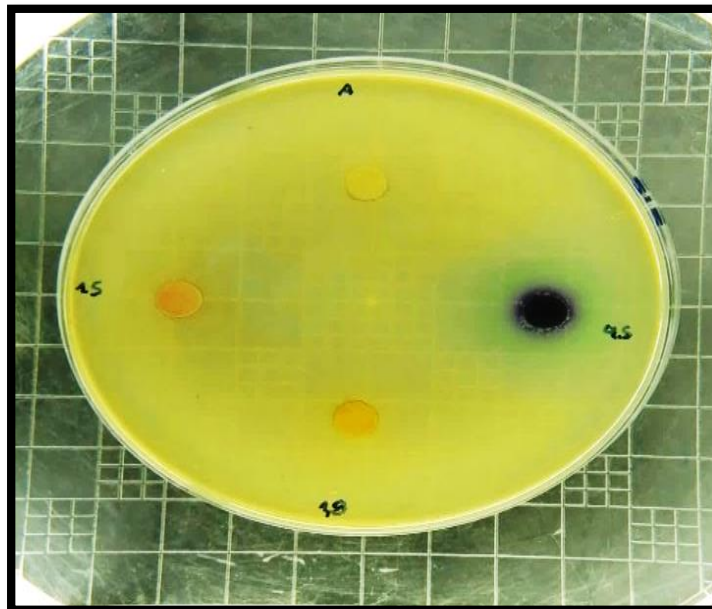
Anexo 22. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 2.



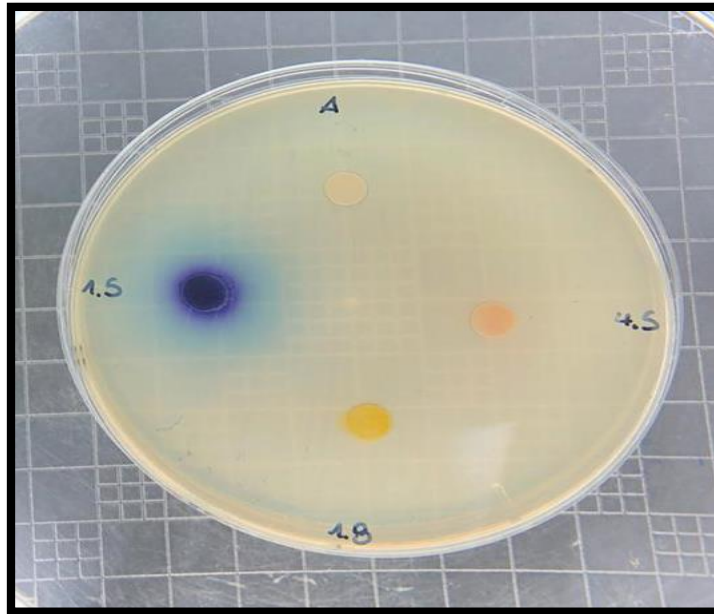
Anexo 23. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 3.



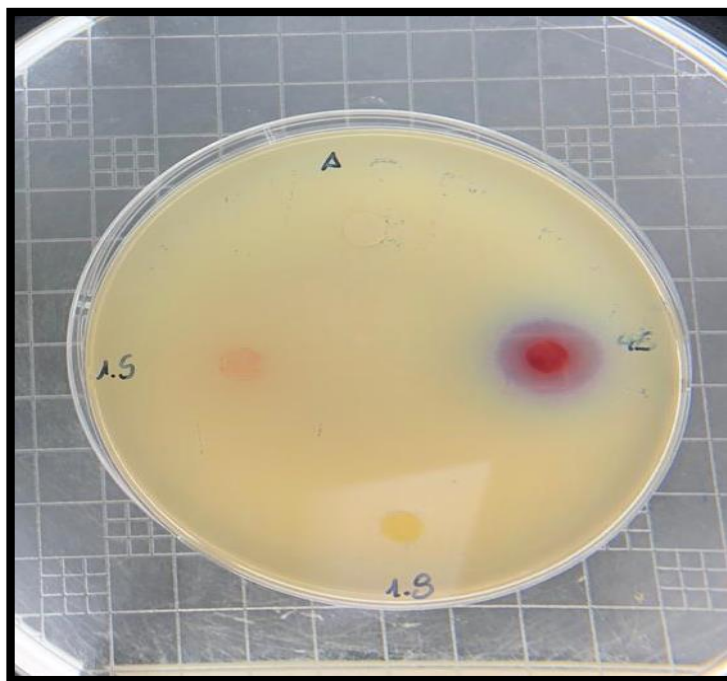
Anexo 24. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 4.



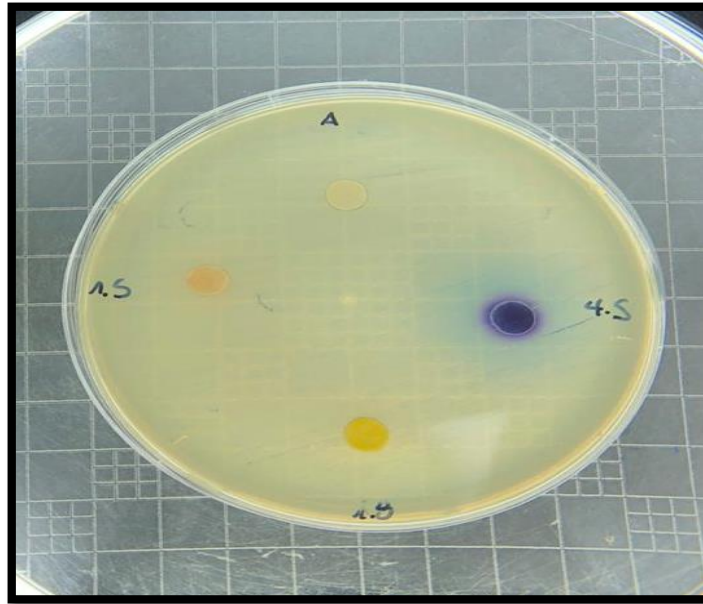
Anexo 25. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 5.



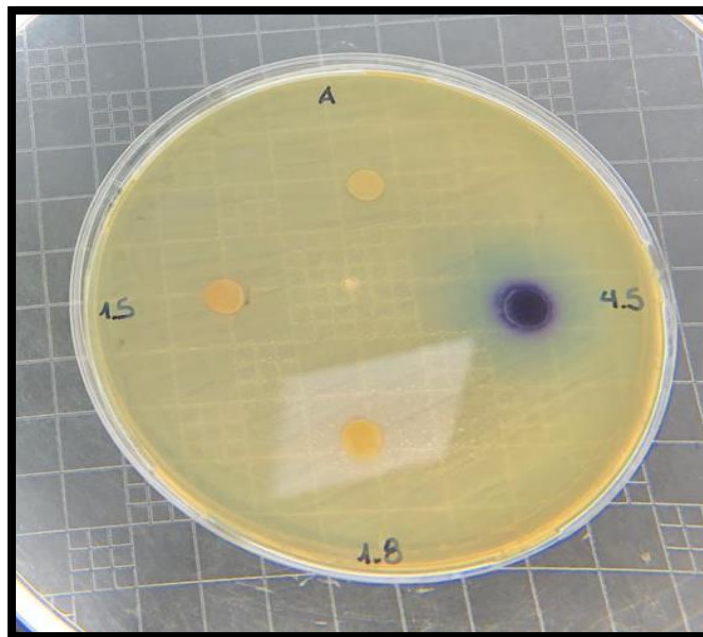
Anexo 26. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 6.



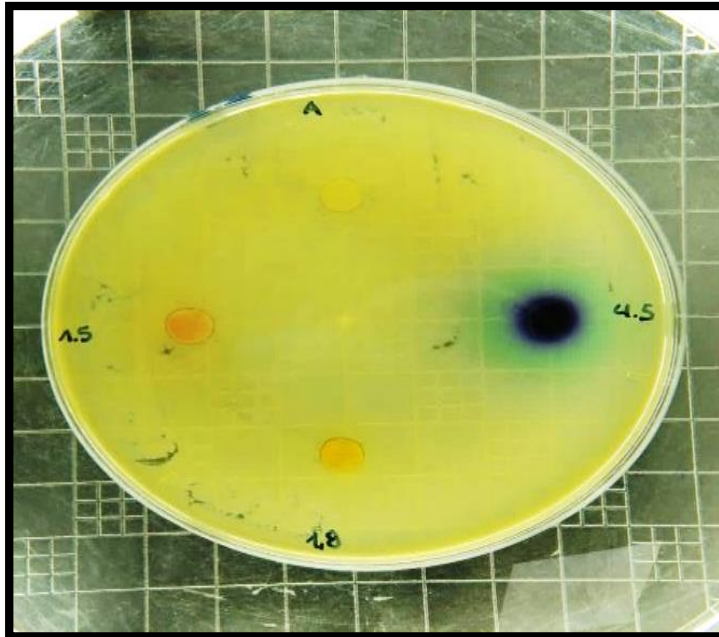
Anexo 27. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 7.



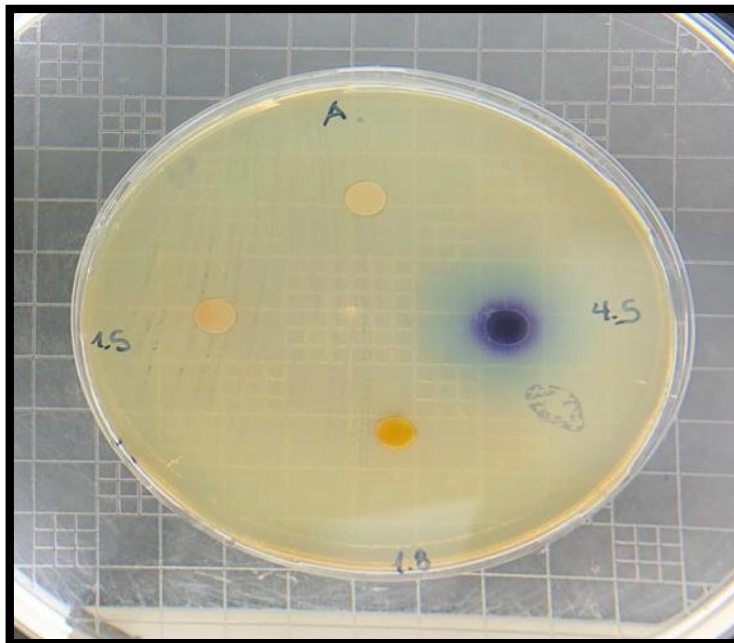
Anexo 28. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 8.



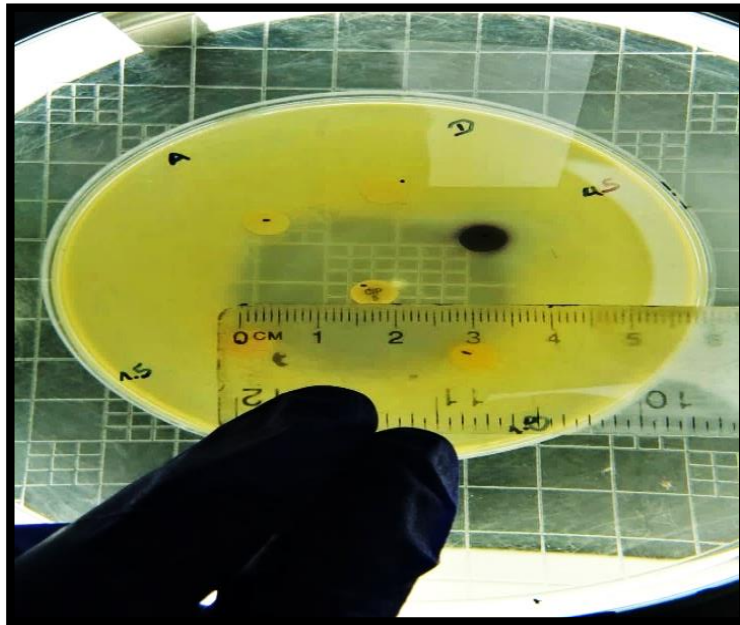
Anexo 29. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 9.



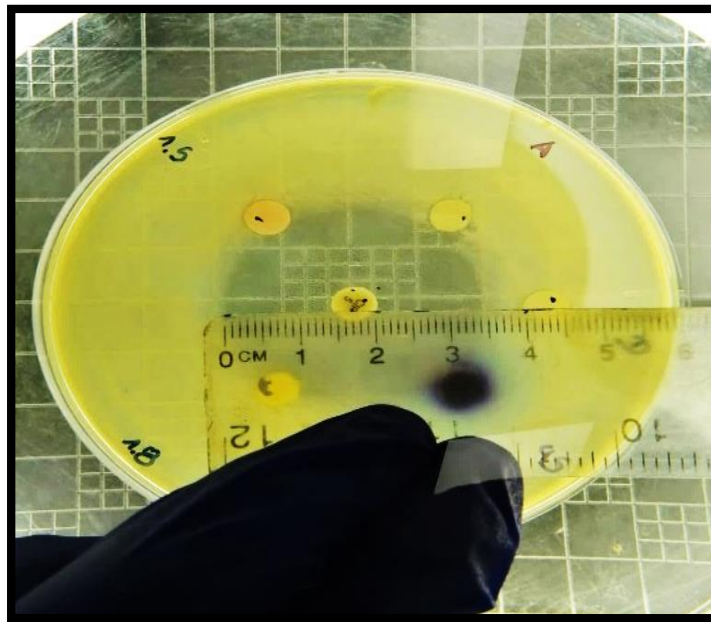
Anexo 30. Medición de los halos producidos por antraquinonas. Muestra 10.



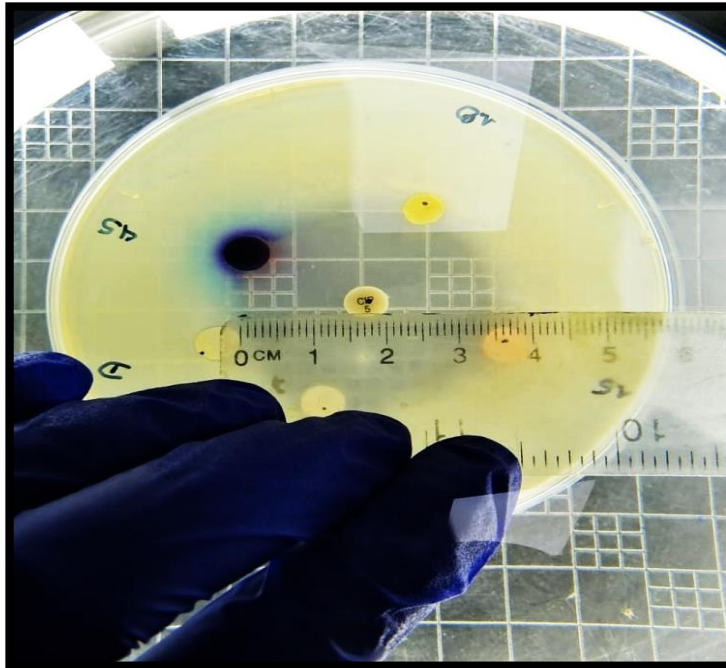
Anexo 31. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 1



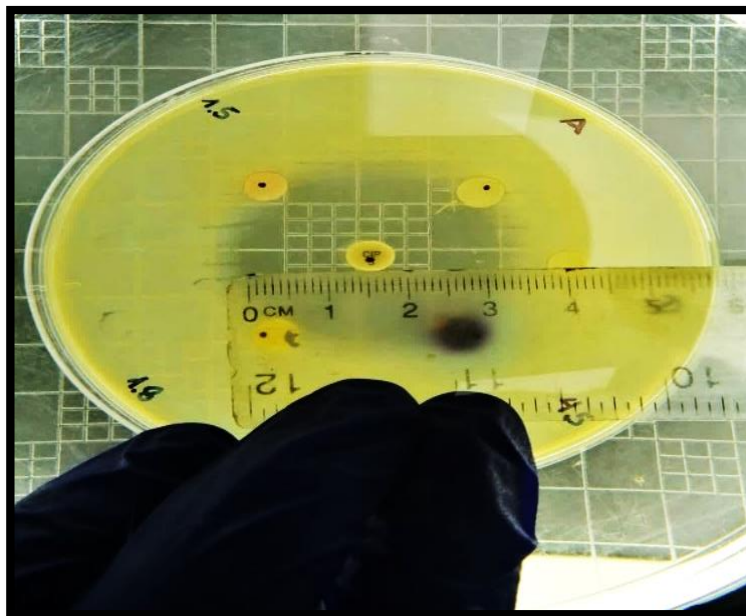
Anexo 32. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 2.



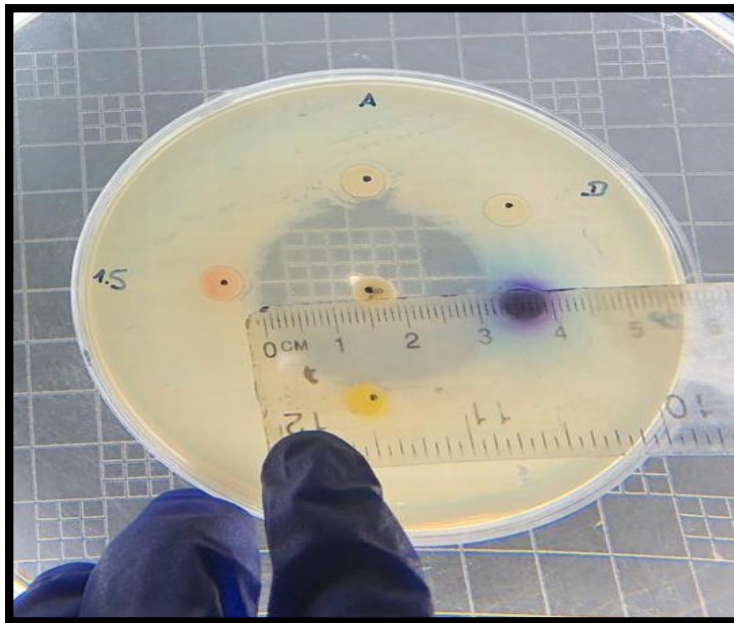
Anexo 33. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 3.



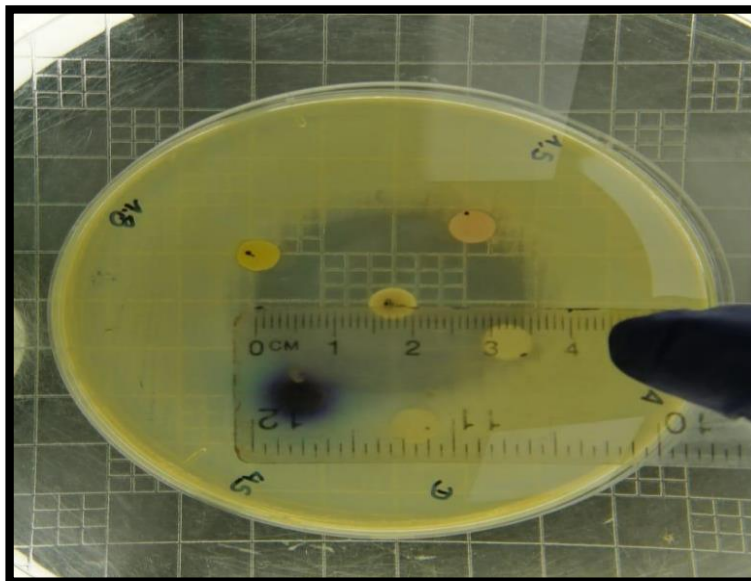
Anexo 34. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 4.



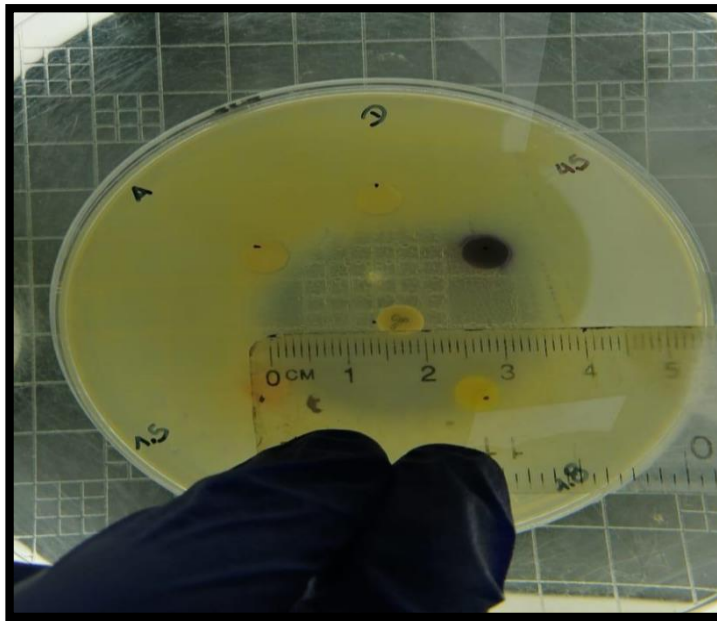
Anexo 35. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 5.



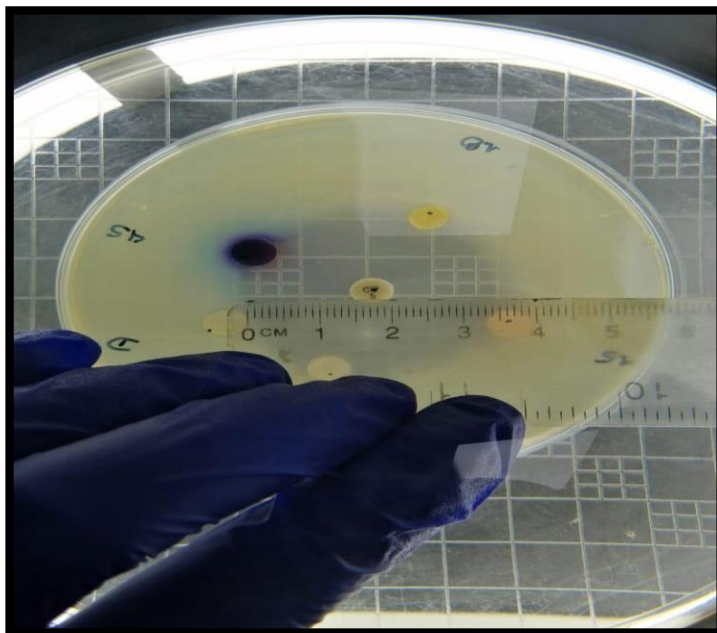
Anexo 36. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 6.



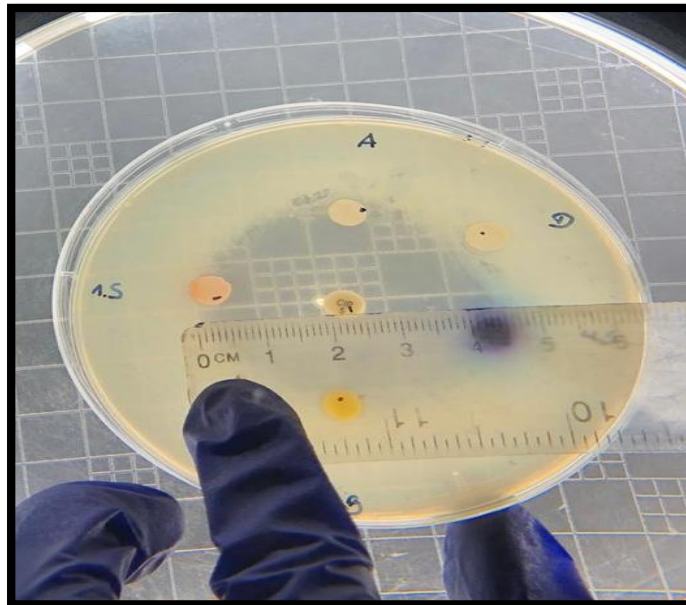
Anexo 37. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 7.



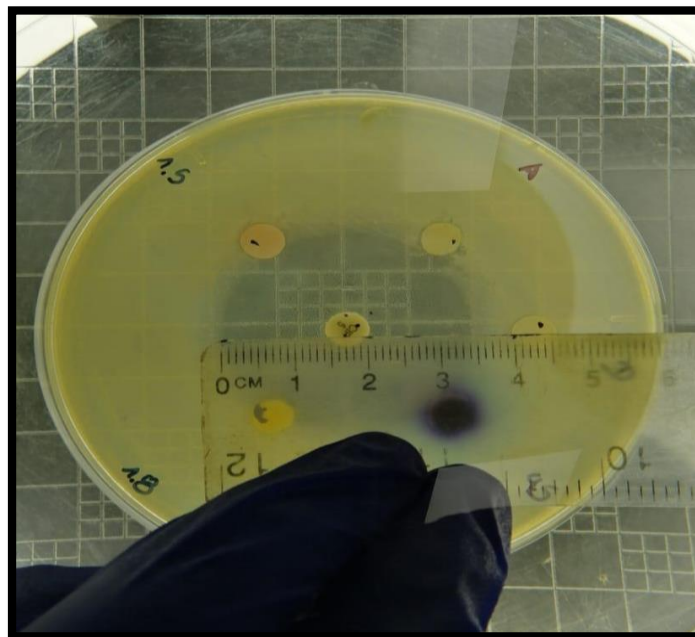
Anexo 38. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 8.



Anexo 39. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 9.



Anexo 40. Medición de los halos producidos por antraquinonas en combinación con ciprofloxacina. Muestra 10.



**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR
CARRERA DE BIOFARMACIA / BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Cuenca, 18 de Junio del 2020

Señor Doctor.

Diego Paul Andrade Campoverde.

Director de la Carrera de Biofarmacia / Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Presente. –

Estimado Doctor Diego Andrade:

Yo, **GRUNAUER PÉREZ SAMUEL GUILLERMO**, con cédula de ciudadanía **0750205932**, solicito ante Ud respetuosamente permiso para realizar la investigación de mi trabajo de tesis en las instalaciones de la facultad de Biofarmacia / Bioquímica y Farmacia de la Universidad Católica de Cuenca.

Es importante señalar que esta actividad no conlleva ningún gasto para la institución y que se tomarán los resguardos necesarios para no interferir con el normal funcionamiento de las actividades propias de la facultad.

Con sentimientos de respeto y consideración.

Atentamente,

**DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO
“AÑO JUBILAR, QUINCUAGÉSIMO ANIVERSARIO FUNDACIONAL”**



Dr. Diego Andrade, MSc.
**Director de la Carrera de
Biofarmacia / Bioquímica y
Farmacia**

Q.F. Karla Pacheco MSc.
**Docente responsable de Unidad
de Titulación de la Carrera de
Biofarmacia**

Grunauer Pérez Samuel Guillermo
**Estudiante de la Carrera de
Biofarmacia**

**UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR
CARRERA DE BIOFARMACIA / BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Cuenca, 18 de Junio del 2020

Señor Doctor.

Diego Paul Andrade Campoverde.

Director de la Carrera de Biofarmacia / Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Presente. –

Estimado Doctor Diego Andrade:

Yo, **OLIVO AGUILAR RONNY PATRICIO**, con cédula de ciudadanía **0706627726**, solicito ante Ud respetuosamente permiso para realizar la investigación de mi trabajo de tesis en las instalaciones de la facultad de Biofarmacia / Bioquímica y Farmacia de la Universidad Católica de Cuenca.

Es importante señalar que esta actividad no conlleva ningún gasto para la institución y que se tomarán los resguardos necesarios para no interferir con el normal funcionamiento de las actividades propias de la facultad.

Con sentimientos de respeto y consideración.

Atentamente,

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

“AÑO JUBILAR, QUINCUAGÉSIMO ANIVERSARIO FUNDACIONAL”



Dr. Diego Andrade, MSc.

**Director de la Carrera de
Biofarmacia / Bioquímica y
Farmacia**

Q.F. Karla Pacheco MSc.

**Docente responsable de Unidad
de Titulación de la Carrera de
Biofarmacia**

Olivo Aguilar Ronny Patricio

**Estudiante de la Carrera de
Biofarmacia**

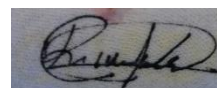
PERMISO DEL AUTOR DE TESIS PARA SUBIR AL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Nosotros, **GRUNAUER PEREZ SAMUEL GUILLERMO** y **OLIVO AGUILAR RONNY PATRICIO** portadores de las cédulas de ciudadanía N° **0750205932** y **0706627726**, en calidad de autores y titulares de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANTRAQUINONAS SINTÉTICAS COMBINADAS CON CIPROFLOXACINA SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Así mismo; autorizo a la Universidad para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 27 de Noviembre del 2020



F: _____
C.I: 0750205932



F: _____
C.I: 0706627726

Cuenca, 13 de noviembre de 2020

Abogada

Stephanie Alexandra Amaya Pardo.

SECRETARIA AUXILIAR DE LA CARRERA DE BIOFARMACIA

Su despacho.

De mi consideración.

Luego de expresarle un cordial y atento saludo, por medio del presente informo que, llevado a cabo el proceso de titulación, los estudiantes entregaron sus trabajos a la Unidad de Titulación e Investigación - Carrera de Biofarmacia, mismas que se encargaron de verificar el contenido de originalidad mediante la herramienta antiplagio Turnitin, entregando los resultados acordes a las exigencias de la Universidad.

Así, **GRUNAUER PÉREZ SAMUEL GUILLERMO** y **OLIVO AGUILAR RONNY PATRICIO**, con su trabajo titulado, “**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE ANTRAQUINONAS SINTÉTICAS COMBINADAS CON CIPROFLOXACINA SOBRE CEPAS DE *Escherichia coli* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS**”, obteniendo en el informe de originalidad un 10% lo cual les permite continuar con los trámites correspondientes a su titulación.

Por la favorable acogida que se digne dar al presente anticipo mis agradecimientos.

Atentamente,

Q.F. Karla Pacheco C. MSc.
**RESPONSABLE DE LA UNIDAD DE TITULACIÓN
CARRERA DE BIOFARMACIA / BIOQUÍMICA Y FARMACIA**