



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO Y
SINÉRGICO DE ANTRAQUINONAS SINTÉTICAS SOBRE
BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES A
CIPROFLOXACINA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICAS FARMACEUTAS**

**AUTORAS: CABRERA BERMEO, ANDREA ESTEFANÍA
VÁSQUEZ URGILES, VIVIANA ELIZABETH**

DIRECTOR: CARPIO ARÉVALO, JUAN MARCELO, PhD

**CUENCA - ECUADOR
2023**

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE BIOFARMACIA

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO Y
SINÉRGICO DE ANTRAQUINONAS SINTÉTICAS SOBRE
BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES A
CIPROFLOXACINA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE QUÍMICAS FARMACEUTAS**

**AUTORAS: CABRERA BERMEO, ANDREA ESTEFANÍA
VÁSQUEZ URGILES, VIVIANA ELIZABETH**

DIRECTOR: CARPIO ARÉVALO, JUAN MARCELO, PhD

CUENCA - ECUADOR

2023

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Andrea Estefanía Cabrera Bermeo portadora de la cédula de ciudadanía N° **0107599532**. Declaro ser el autor de la obra: “**Evaluación del potencial antibacteriano y sinérgico de antraquinonas sintéticas sobre bacterias Gram-negativas resistentes a ciprofloxacina**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **08 de febrero de 2023**

Andrea Estefanía Cabrera Bermeo

C.I. 0107599532



Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Viviana Elizabeth Vásquez Urgiles portadora de la cédula de ciudadanía N° **0107135543**. Declaro ser el autor de la obra: “**Evaluación del potencial antibacteriano y sinérgico de antraquinonas sintéticas sobre bacterias Gram-negativas resistentes a ciprofloxacina**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **08 de febrero de 2023**

.....
Viviana Elizabeth Vásquez Urgiles

C.I. 0107135543

CERTIFICACIÓN:

Certifico que el presente trabajo de titulación denominado “**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIBACTERIANO Y SINÉRGICO DE ANTRAQUINONAS SINTÉTICAS SOBRE BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS RESISTENTES A CIPROFLOXACINA**”, realizado por **CABRERA BERMEO, ANDREA ESTEFANÍA Y VÁSQUEZ URGILES, VIVIANA ELIZABETH**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución bajo el asesoramiento permanente de mi persona en calidad de Tutor, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros del método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que está expedito para su sustentación.

Cuenca,



Firma

Dr. Juan Marcelo Carpio Arévalo, PhD.
Bioquímica y Farmacia
Universidad Católica de Cuenca

RESUMEN

Los antibióticos son tratamientos de enfermedades por bacterias, sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes se ha convertido en un problema de salud mundial. Las antraquinonas son moléculas naturales con efectos terapéuticos. No obstante, los derivados sintéticos han sido poco estudiados.

Objetivo: Evaluar los efectos antibacterianos de antraquinonas sintéticas cloradas, hidroxiladas y nitradas solas y en combinación con ciprofloxacina.

Métodos: La evaluación fue realizada sobre cepas resistentes a la ciprofloxacina de bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La sensibilidad frente a las antraquinonas se evaluó por el método de Kirby-Bauer empleando discos de papel. Para determinar las CMI se empleó el método de macrodilución en agar. Por último, se expuso las bacterias a las antraquinonas y se comparó sus efectos con los del antibiótico sin combinación.

Resultados: Se aportó información sobre la capacidad antibacteriana y sinérgica de antraquinonas sintéticas sobre bacterias resistentes a ciprofloxacina, revelando que las antraquinonas no presentan efecto antibacteriano ni sinérgico sobre *K. pneumoniae* y *E. coli* resistentes a ciprofloxacina. Sin embargo, la 1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona presentó la capacidad de aumentar el efecto de la ampicilina en *E. coli*.

Conclusión: Se amplió el conocimiento sobre el potencial antibacteriano de este grupo de antraquinonas sintéticas. También se resaltó los grupos funcionales hidroxilo, nitro y cloruro, por lo que, ninguno de los grupos funcionales de las antraquinonas generan efecto antibacteriano directo, sin embargo, la combinación de los grupos hidroxilos y nitro presentes en la 1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona tiene la capacidad de aumentar el efecto de la ampicilina sobre *E. coli*.

Palabras clave: Antraquinonas, ciprofloxacina, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, antibacteriano.

Abstract

Antibiotics are used to treat bacterial diseases, but the emergence of resistant strains has become a global health problem. Anthraquinones are natural molecules with therapeutic effects. However, synthetic derivatives have been little studied.

Objective: To evaluate the antibacterial effects of synthetic chlorinated, hydroxylated, and nitrated anthraquinones alone and combined with ciprofloxacin.

Methods: The evaluation was performed on ciprofloxacin-resistant bacterial strains such as *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Sensitivity to anthraquinones was evaluated by the Kirby-Bauer method using paper platelets. The macrodilution method in agar was used to determine MICs. Finally, bacteria were exposed to anthraquinones, and their effect was compared with the antibiotic without combination.

Results: Information was provided on synthetic anthraquinones' antibacterial and synergistic capacity on ciprofloxacin-resistant bacteria, showing that anthraquinones had no antibacterial or synergistic effect on ciprofloxacin-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. However, 1,8-dihydroxy-4,5-dinitroanthraquinone showed the ability to increase the effect of ampicillin on *Escherichia coli*.

Conclusion: This group of synthetic anthraquinones has expanded knowledge of the antibacterial potential. The hydroxyl, nitro, and chloride functional groups were also highlighted, indicating that none of the functional groups of anthraquinones have direct antibacterial activity. However, the combination of hydroxyl and nitro groups present in 1,8-dihydroxy-4,5-dinitroanthraquinone can increase the effect of ampicillin on *Escherichia coli*.

Keywords: Anthraquinones, ciprofloxacin, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, antibacterial

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I.....	4
Planteamiento teórico.....	4
I.1.- Planteamiento de la investigación.....	5
I.2.- Justificación.....	7
I.2.1.- Pregunta científica:.....	8
i.3.- Objetivos.....	8
I.3.1.-Objetivo General:.....	8
I.3.2.-Objetivos Específicos:.....	8
I.4.- Marco teórico.....	9
I.4.1.- Antecedentes:.....	9
I.4.2.- Marco referencial:.....	12
CAPÍTULO II.....	8
Metodología.....	8
II.1.- Diseño de investigación.....	34
II.2.- Población y muestra.....	34
II.2.1. Universo - Población:.....	34
II.2.2 Muestreo y muestra:.....	34
II.4.- Definición y clasificación de las variables.....	35
II.5.- Procedimientos, técnicas e instrumentos para la obtención de datos.....	36
II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos.....	39
II.6.- Aspectos éticos.....	40
CAPÍTULO III.....	11
Resultados y discusión.....	11

III. Resultados	42
III. Discusión.....	52
CAPÍTULO IV	42
Conclusiones y recomendaciones	42
IV.1.- Conclusiones	58
IV.2.- Recomendaciones	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS.....	76

DEDICATORIA:

A Dios por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida, por guiar mis pasos y por iluminarme siempre.

A mis abuelitos, por aconsejarme y contarme varias anécdotas que me ayudaron a sobrellevar varias etapas de mi vida.

A mis padres, por el apoyo incondicional, el amor infinito y dedicación en cada momento. Por enseñarme que todo requiere su esfuerzo y que a pesar de los momentos difíciles me han guiado con sus valores por el buen camino de la superación.

A mis hermanos por apoyarme y cuidarme siempre, por sus gratos momentos y por su confianza depositada en mí.

A mis amigos quienes con sus consejos y momentos divertidos mi caminar fue más grato.

A Viviana, mi compañera de tesis quien, a lo largo de este camino de formación profesional, fue partícipe de esta gran meta cumplida.

A toda mi familia por estar pendiente de mí, en especial a mis tíos Antonio, Sabina y Mercedes.

Andrea.

DEDICATORIA:

A Dios por haberme guiado en las decisiones que he tomado y por ser luz especialmente en situaciones difíciles.

A mi mamá Rosa por ser un apoyo incondicional y un pilar para mi vida, el amor que me ha demostrado cada día y el impulso brindado para cumplir mis metas.

También por no rendirse, enseñarme buenos valores y que se requiere de esfuerzo para cualquier situación que se presente.

A mi hermana Lizbeth quien cambió todo para bien desde el momento que llegó a formar parte de mi día a día, por su sentido del humor que ha sido significativo para sobrellevar situaciones difíciles y por la confianza que ha puesto en mí.

A mis abuelitos, César y Alcira por ser un ejemplo a seguir y por formar parte importante en mi crecimiento como persona.

A mi papá por haberme apoyado en el proceso de mi carrera y haberme permitido llegar hasta el final.

A Andrea, mi amiga y compañera de tesis quien a lo largo del camino de formación profesional ha sido parte primordial de los objetivos cumplidos.

A mis amigos quienes han brindado momentos alegres, divertidos y me han apoyado.

A toda mi familia, la cual siempre ha confiado en mi y me ha apoyado en todo momento, especialmente a mis tíos Ángel, Remigio, Lourdes, Estuardo y Gloria.

Viviana.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por iluminar mi vida y permitirme disfrutar de las mejores etapas de mi vida profesional.

A mis padres por impulsarme a seguir adelante y por el sacrificio en todos estos años.

A mis docentes por su conocimiento, dedicación y perseverancia en cada momento.

A mis amigos por ser un pilar fundamental de apoyo moral en este camino.

A la Universidad y a todas las autoridades, por permitirme concluir con una etapa de mi vida, en especial a Dianita y Andreita por el apoyo en el proceso de investigación.

A la Dra. Maritza Martínez quien nos ayudó con sus habilidades para el desarrollo de la investigación.

Agradecimiento especial al Dr. Juan Marcelo Carpio Arévalo, director de nuestra investigación, por el aporte de sus grandes conocimientos, por su paciencia y dedicación en todo este trayecto.

Andrea.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por guiarme y haberme permitido disfrutar de momentos agradables a lo largo de mi vida.

A mi mamá por siempre estar para mí, por ser un buen ejemplo y por haberme apoyado en el transcurso de mi formación profesional.

A mi hermana quien ha depositado su fe y confianza en mí, quien es razón principal de haber llegado hasta aquí.

A mis abuelitos por creer en mí y confiar en que lograría mis metas.

A mi papá por haberme permitido llegar al final de mi carrera.

A los docentes por su dedicación y enseñanzas que a lo largo de los años han brindando incondicionalmente.

A mis amigos por su apoyo dentro y fuera del ámbito académico.

A Dianita y Andreita quienes fueron de gran ayuda en el desarrollo de la práctica de nuestro trabajo.

A la Dra. Maritza Martínez quien también aportó sus conocimientos y habilidades en el transcurso de la investigación.

En especial al Dr. Juan Carpio, director de nuestra investigación por la contribución significativa en el desarrollo de la tesis, por su paciencia, esmero y haber brindado sus conocimientos para concluir esta investigación.

Viviana.

I.

II.

III. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por bacterias a lo largo de los años han representado una de las amenazas más serias para la salud de la población en el mundo, siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad. En la actualidad por el uso excesivo de antibióticos existe la presencia de resistencia antibiótica considerándose un problema mundial grave. Es por ello la importancia del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos que puedan tolerar los mecanismos de resistencia bacteriana (1).

Según el artículo publicado en Perú por M. Jorge et al. titulado “*La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio*” 2019, indicó la importancia del uso racional de los antibióticos, debido a que es necesario proporcionar a los pacientes una dosis adecuada de un medicamento para tratar patologías por microorganismos, esto con el fin de que se pueda evitar un incremento acelerado en la resistencia de las bacterias (2).

Varias cepas de enterobacterias se han tornado multirresistentes ocasionando un problema a nivel de salud pública. Entre los antibióticos a los que se han tornado resistentes *K. pneumoniae* (3) y *E. coli* (4) se encuentra la ciprofloxacina. Por lo mismo, es necesario buscar alternativas, entre las que destacan compuestos naturales, como las antraquinonas, que son compuestos con reconocidos efectos terapéuticos e incluso actividades antibacterianas (5).

Las antraquinonas son un grupo de moléculas con amplia capacidad de aplicación así como otros productos de origen natural o sintético ampliamente estudiados (6). Por ejemplo, las chalconas al ser metabolitos vegetales han sido estudiadas para efectos citotóxicos frente a HeLa (células tumorales) y NIH/3T3, por lo que, la chalcona sintética 4-nitrocalcona (4NC) y su forma encapsulada en nanocápsulas de ácido fólico-poli (metacrilato de metilo) (PMMA) proporciona varios efectos citotóxicos selectivos en las células tumorales el cual puede ser una pauta prometedora para la quimioterapia (7).

Así también, el antioxidante lauril galato libre ha presentado efectos citotóxicos significativos sobre L929 y los glóbulos rojos humanos. La existencia de ácido fólico incrementó la citotoxicidad del galato de laurilo cargado en nanopartículas en las células HeLa a causa de una mayor captación celular cuando las células HeLa se incubaron a 37°C. Pese a ello, se considera que el sistema de transporte puede ser necesario en la administración de fármacos por el receptor de folato (8).

Por otro lado, las nanopartículas de poli (tioéter-éster) (PTEe) obtenidas por polimerización de tiol-eno son una fuente de investigación debido a la biodegradabilidad y biocompatibilidad que adquieren. Pese a esto, se ha administrado en ratones dosis de 40 mg/kg para la evaluación de parámetros bioquímicos, conductuales y nociceptivos en órganos diferentes. Los resultados señalan que ninguna de las nanopartículas ocasionó una toxicidad aguda en los órganos probados debido a que no hubo alteraciones en las respuestas conductuales, bioquímicas y nociceptivas. Por lo mismo, estas investigaciones refuerzan la biocompatibilidad de las nanopartículas de poli (tioéter-éster) (PTEe) sintetizadas por polimerización de tiol-eno (9).

De manera general estas moléculas y sus derivados se encuentran de manera amplia en la naturaleza, con distintas propiedades ya sea de acción inflamatoria, antioxidante, antitumoral, etc (6). Así mismo, se ha demostrado que derivados de antraquinona dihidroxi, la 1,8-dihidroxi-antraquinona (DAN) posee una gran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (10). También se señala que 1,5,7-trihidroxi-3-hidroximetilantraquinona presentó importantes efectos antibacterianos, tras inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (11). Sin embargo, varias antraquinonas que se utilizó en el presente trabajo no han sido probadas.

Para el cumplimiento de los objetivos la presente investigación se divide en tres capítulos, el cual el primero corresponde al planteamiento de la investigación, la justificación, preguntas y objetivos, así como el marco teórico el cual se evidencia los antecedentes y el marco referencial.

En lo que respecta al segundo capítulo se describe el tipo de metodología empleada en la investigación, el universo, la población, muestra y el procedimiento realizado para la recolección de datos, en este caso para la evaluación de sensibilidad de las bacterias frente a las antraquinonas.

Por último, el capítulo tres señala los principales resultados obtenidos en base a los objetivos planteados, también se evidencia la discusión entre los distintos autores, para generar conclusiones y recomendaciones óptimas.

CAPÍTULO I
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.

I.1.- PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.

Los fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias son los antibióticos que durante varios años ha permitido disminuir, de manera significativa, la mortalidad y morbilidad a nivel mundial (12). Sin embargo, pese al gran número de antibióticos aprobados, la aparición de la resistencia bacteriana resulta ser una gran amenaza creciente en la eficacia de estos fármacos (13). Por ese motivo, es necesario el descubrimiento de nuevos antibacterianos capaces de hacer frente a varias de estas cepas resistentes (14).

Un ejemplo de una enfermedad de gran problema mundial es la tuberculosis debido a la selección de cepas que cada vez se hacen más resistentes a *Mycobacterium tuberculosis*. Una de las principales dianas para el proceso de nuevos antibióticos es la ADN girasa encargada de la regulación de la topología del ADN siendo elemental en las bacterias. Pese a ello se ha explorado un grupo de productos naturales, el cual el derivado de pirrolo [1,2-a] quinazolina muestra una gran energía para la unión con la enzima resultando prometedor en la inhibición de la ADN girasa B de *M. tuberculosis* (15).

Además, las infecciones nosocomiales también son una amenaza persistente a nivel mundial así mismo por la resistencia a antibióticos como *Enterococcus faecalis*. Pese a este problema se ha estudiado la acción de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos utilizando flavonas para la obtención de posibles adyuvantes de aminoglucósidos interactuando con el bolsillo de unión de nucleótidos de Ef APH(3')-IIIa, el cual se obtuvo un buen resultado de la alfa-naftoflavona (16).

Así también para *E. faecalis*, se encuentra los aminoglucósidos, pero combinados con inhibidores de la pared celular bacteriana como por ejemplo los betalactámicos. La respuesta de enzimas modificadoras de aminoglucósidos como la aminoglucósido fosfotransferasa tipo IIIa de *E. faecalis* (EfAPH(3')-IIIa) es uno de sus principales mecanismos de resistencia ya que al necesitar de ATP fosforila los aminoglucósidos existiendo modificaciones en la posición 3' de los grupos hidroxilo de los antibióticos (17).

Por lo mismo, se ha analizado productos naturales para la selección de moléculas que tengan una mayor afinidad por el bolsillo de unión a nucleótidos de EfAPH(3')-IIIa, el cual en la base de datos ZINC22 se mostró que ZINC000000952700 (BS-1), ZINC000014793040 (BS-2) y ZINC000015498603 (BS-3) siendo los más favorables para BS-2, un derivado de la flavona por el perfil de estabilidad que adquiere mejorando un perfil toxicológico ya que existe una menor probabilidad de efectos cancerígenos, hepatotóxicos, mutagénicos, citotóxicos e inmunotóxicos en comparación con BS-1 y BS-3. Estos resultados muestran que un derivado de flavona puede actuar como adyuvante de los aminoglucósidos en el tratamiento de *E. faecalis* (17).

Entre los microorganismos con un elevado potencial de patogenicidad se destacan *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, con un creciente número de cepas resistentes a antibióticos como la ciprofloxacina (18). Es por ello que se ha generado la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana o que sean capaces de sinergizar el efecto de los antibióticos convencionales (19).

Existen estudios de ciertos tipos de antraquinonas que han presentado efectos positivos contra algunas bacterias. Por ejemplo, la emodina (1,3,8-trihidroxi-4-cloro-6-metil- antraquinona) presentó la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas en especial de cepas resistentes a medicamentos como son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecium* (20). Así mismo, la 2,3 dihidroxi-9,10- antraquinona que se ha aislado de *Streptomyces galbus* presentó una actividad antibacterial interesante frente a *K. pneumoniae* (21). De hecho, varias antraquinonas hidroxiladas, las mismas que se encuentran libres en algunas plantas, han demostrado su efectividad sobre las bacterias mencionadas (22).

No obstante, existen pocos estudios sobre su capacidad para mejorar el efecto de los antibióticos a los que las bacterias ya son resistentes. Así también, existe limitada información sobre antraquinonas funcionalizadas con el grupo nitro o cloruro (23).

En la presente investigación se evaluó comparativamente el efecto de antraquinonas hidroxiladas, cloradas y nitradas en cepas Gram-negativas de bacterias con resistencia a la ciprofloxacina. También, se estudió la capacidad que estos compuestos poseen para actuar sinérgicamente con ciprofloxacina, con la finalidad de que los resultados obtenidos puedan contribuir al desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.

I.2.- JUSTIFICACIÓN.

Debido a la aparición de nuevas cepas bacterianas resistentes a antibióticos, su eficacia se ve afectada, por lo que es indispensable el descubrimiento de nuevos antibacterianos o moléculas con la capacidad de mejorar la eficacia de los fármacos ya utilizados (24). Incluso, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015 aclaró la gran importancia sobre el desarrollo de nuevos fármacos, es por ello que aprueba un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antibióticos, con la finalidad de tratar enfermedades infecciosas (25).

Se consideran que *K. pneumoniae* y *E. coli* en la actualidad presentan un potencial patógeno elevado, ya que su capacidad de generar resistencia a los antibióticos es preocupante, categorizando a las enfermedades producidas por estas bacterias como riesgosas. En efecto, la ciprofloxacina se encuentra dentro de los ejemplos de fármacos que en el transcurso de los años ha presentado una disminución de su eficacia en cepas de las bacterias mencionadas (26), (27).

En la actualidad, existen investigaciones en las que se han confirmado efectos terapéuticos de las antraquinonas, entre los cuales se destaca su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-negativas. Es por ello que, según estudios realizados, se conoce que las antraquinonas hidroxiladas han sido más estudiadas en comparación a las antraquinonas nitradas y cloradas que presentan escasa información con respecto a este tema (28). A pesar del número reducido de publicaciones sobre las antraquinonas, la información que se dispone demuestra que el sinergismo podría ser una característica de estas moléculas u otras antraquinonas en combinación con diferentes antibióticos (22).

Considerando lo antes expuesto, el presente trabajo evaluó el potencial antibacteriano de nueve antraquinonas sintéticas, con el fin de identificar nuevas moléculas con potencial antibacteriano que puedan ser capaces de actuar frente a las bacterias resistentes a ciprofloxacina, solas o en combinación con el mismo.

Como beneficio educativo es brindar información útil de manera novedosa para futuros proyectos de investigación. En lo que respecta a los beneficiarios directos son los investigadores involucrados respectivamente mientras que los beneficiarios indirectos son alumnos de cursos inferiores de la carrera generado por la consecución de trabajos científicos relevantes. Por lo que, la información generada y experiencia adquirida permite diseñar nuevas propuestas de investigaciones encaminadas a profundizar en el estudio del potencial antibacteriano de este tipo de compuestos, permitiendo que se produzca conocimiento científico de mayor impacto.

I.2.1.- PREGUNTA CIENTÍFICA: ¿Las antraquinonas hidroxiladas, nitradas y cloradas solas o combinadas con ciprofloxacina tienen efectos antibacterianos sobre cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* resistentes a ciprofloxacina?

I.3.- OBJETIVOS.

I.3.1.-Objetivo General:

Evaluar los efectos antibacterianos de nueve antraquinonas sintéticas, solas o combinadas con ciprofloxacina, sobre cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

I.3.2.-Objetivos Específicos:

- Comparar los efectos antibacterianos de las antraquinonas, antraquinona, 1,5- dihidroxiantraquinona, 1,8-dihidroxiantraquinona, 1,5-dinitroantraquinona, 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona, 1-cloroantraquinona, 2- cloroantraquinona, 1,5-dicloroantraquinona y 1,8-

dicloroantraquinona sobre las cepas bacterianas aisladas resistentes a ciprofloxacina.

- Identificar las combinaciones de antraquinonas con ciprofloxacina con mayor actividad sobre las cepas bacterianas resistentes a ciprofloxacina.

I.4.- MARCO TEÓRICO.

I.4.1.- Antecedentes:

Escherichia coli y *Klebsiella pneumoniae* son algunas de las bacterias capaces de generar enfermedades e incluso varias complicaciones a nivel hospitalario (29).

E. coli es un microorganismo comensal el cual se aloja en el tracto gastrointestinal ya sea de humanos o animales (30). Sin embargo, puede causar varias infecciones a nivel intestinal produciendo cuadros clínicos graves. Algunas cepas de *E. coli* son responsables de diarrea y se clasifican en diferentes grupos, una de ellas es la *E. coli* enterohemorrágica conocida como productora de toxina Vero (EHEC) (31).

E. coli, es considerado un microorganismo habitual en el intestino de animales de sangre caliente, presenta patotipos que causan problemas graves en el organismo, como señala un artículo en nuestro país, escrito por B. Darlene *et. al*, titulado “*Distribution of enteroinvasive and enterotoxigenic Escherichia coli across space and time in northwestern Ecuador*” 2016, que indicó que *E. coli* causa enfermedades diarreicas con frecuencia y generalmente se da en comunidades rurales (32).

Otro grupo es la de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), coloniza la mucosa del intestino delgado a través de fimbrias o pilis y es capaz de sintetizar enterotoxinas como la toxina termoestable (ST) y la toxina termolábil (LT). Por otro lado, el mecanismo de patogenicidad de *E. coli* enteropatógena (EPEC) depende de la adherencia entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal por medio de pilis o fimbrias (33).

La *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), invade el epitelio del colon por medio de la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa, por otra parte, la *E. coli* enteroagregativa (EAEC) abarca la bacteria y varias moléculas que ella mismo produce, con la capacidad de incrementar la producción de moco para colonizar el intestino. Por último, la *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) pese a que no existe mucho conocimiento sobre su mecanismo de patogenicidad, se señala el fenómeno de adherencia difusa el cual causan diarrea acuosa sin sangre (33).

K. pneumoniae se considera un agente patógeno causante principalmente de infecciones nosocomiales generando epidemias y brotes alrededor del mundo. Las infecciones suelen ser graves, con una tasa de letalidad de aproximadamente un 35% lo que resulta una amenaza a nivel de salud pública (34).

A nivel hospitalario genera una gran resistencia a ciprofloxacina, amikacina y gentamicina. Un artículo desarrollado en Portugal por D. Paulo et. al, titulado “*Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance*” 2018, explicaron que algunos mecanismos de resistencia se dan al adquirir genes de resistencia exógenos o mutaciones cromosómicas, afectando el costo de aptitud de la resistencia a los antibióticos (35).

Además, existe un gran avance en el descubrimiento de nuevos tratamientos para enfermedades causadas por microorganismos patógenos, pero se requiere de la disposición de tiempo prolongado para la búsqueda de nuevos antibióticos, por ello es primordial concientizar su empleo cuando sea específicamente necesario (36).

Por otra parte, las antraquinonas son compuestos derivados del antraceno, también conocidas como 9,10-dioxoantraceno, se sitúa en numerosas plantas y se les impone efectos terapéuticos importantes. Se encuentra con frecuencia en las antraquinonas de origen natural grupos funcionales como hidroxilo, metoxilo, entre otros (37).

Existen estudios de antraquinonas que han presentado efectos positivos en el tratamiento contra infecciones bacterianas. Un estudio de EE.UU realizado por D. Fexia et al. titulado “*Chlorinated emodin as a natural antibacterial agent against drug-resistant bacteria through dual influence on bacterial cell membranes and DNA*” 2017, mencionó que la emodina 1,3,8-trihidroxi-4-cloro-6-metil- antraquinona presenta la capacidad de inhibir el crecimiento de cepas resistentes de bacterianas Gram-positivas y Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus* (16 $\mu\text{g/mL}$), *Escherichia coli* (> 256 $\mu\text{g/mL}$) y *Enterococcus faecium* (256 $\mu\text{g/mL}$). Por ese motivo, se destaca la importancia del análisis de las antraquinonas con su efecto terapéutico como antibacteriano (20).

Otro estudio realizado por C. Balachandran et. al, en un artículo de EE.UU titulado “*Antimicrobial and cytotoxicity properties of 2,3-dihydroxy-9,10- anthraquinone isolated from Streptomyces galbus (ERINLG-127)*” 2014, indicó que la 2,3 dihidroxi-9,10- antraquinona aislada de *Streptomyces galbus* sobre *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, presentó una actividad antibacterial interesante de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ frente los microorganismos mencionados (21).

Existen otros estudios en los que han empleado antraquinonas y han demostrado efectos antibacterianos, como es el caso de un estudio en China realizado por Lin. J et.al, titulado “*Antibacterial anthraquinone dimers from marine derived fungus Aspergillus sp*” 2019, en el cual explicaron su investigación con dos nuevos dímeros de antraquinona, a los que se le suman tres antraquinonas y dos xantonas de las cuales se tiene conocimiento previo, los resultados obtenidos indicaron que los dímeros de antraquinona mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (38).

De igual manera, existen experimentos en los cuales, en la mayoría se hace énfasis en las bacterias que comúnmente causan infecciones a nivel mundial. Un estudio en Tailandia realizado por Wisetsai. A et al, titulado “*New anthracene and anthraquinone metabolites from Prismaticomeris filamentosa and their antibacterial activities*” 2019, se conoció un nuevo producto de antraceno y dos nuevos derivados

de antraquinona, aislados del árbol *Prismatomeris filamentosa*, de los 16 compuestos utilizados, 12 presentaron actividades antimicrobianas en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, como es el caso de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (39).

Estos estudios indican la importancia de las antraquinonas, ya se las conocía por adquirir propiedades significativas, en la actualidad se enfocan en su actividad antimicrobiana y anticancerígena (40). A nivel nacional, no existen estudios en donde se empleen antraquinonas como antibióticos, por ese motivo es importante evaluar su potencial efecto terapéutico como antibacteriano.

I.4.2.- Marco referencial:

Evaluación del potencial antibacteriano y sinérgico de antraquinonas sintéticas sobre bacterias Gram-negativas resistentes a ciprofloxacina.

4.2.1 Epidemiología de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Las enfermedades bacterianas son consideradas una de las principales causas de mortalidad en el mundo, de 57 millones de muertes anuales el 26% (15 millones) son producto de infecciones bacterianas. Por otra parte, también se considera que las infecciones adquiridas en el medio hospitalario son un problema importante, según la OMS más de 1,4 millones de personas en el mundo han adquirido este tipo de enfermedades (41).

A nivel mundial *Escherichia coli* es una de las principales causas de infecciones en el torrente sanguíneo y presenta una importante mortalidad, morbilidad y gastos sanitarios en pacientes, en especial en países que se encuentran en desarrollo, los cuales se encuentran más afectados por enfermedades diarreicas debido a las malas condiciones de vida (42).

En cuanto a la morbilidad y mortalidad, se conoce que un patotipo denominado *E. coli* enterohemorrágica productora de la toxina Shiga (EHEC/STEC), desarrolla síndrome hemolítico urémico (SHU) el cual presenta una tasa de mortalidad de 3% - 5% en el mundo, especialmente en niños. Es por ello que la OMS ante brotes de *E. coli* registrados en Europa en 2012, intercambia información y colabora con el Reglamento Sanitario Internacional y la Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) a nivel mundial, compartiendo con las autoridades asociadas con las investigaciones recientes de brotes (43).

Existen estudios epidemiológicos en países en vía de desarrollo que indican que *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) son los principales causantes de diarrea infantil (44). En el caso de ETEC es responsable de numerosas muertes en niños menores de cinco años, se ha identificado que del 10 al 30% de niños con diarrea es debido a este patotipo, en cuanto a la diarrea del viajero se da generalmente en los adultos aproximadamente de 3 a 7% (45) (46). Mientras que EPEC se presenta endémicamente en un 6% en la población de los países en desarrollo (44).

Con respecto a *E. coli* enteroagregante (EAEC) se encuentra relacionada con inflamación y desnutrición, también está asociada con diarrea aguda en niños menores de dos años en Sinaloa. Existe prevalencia de esta infección en Asia y África, por lo que explican que la epidemiología varía según la población y condiciones que presenten (46).

E. coli enteroinvasiva (EIEC) tiene una prevalencia del 4 al 7% en países como China, Tailandia y otros países asiáticos, mientras que en Brasil varía del 0,5% y el 15%, esto depende del lugar en el que se realice el análisis, demostrando que la incidencia es elevada en barrios pobres (47). Por otra parte, en nuestro país se demuestra que *E. coli* con frecuencia causa enfermedades diarreicas, en especial en comunidades rurales, lo cual genera problemas dentro de la salud de los individuos del país (48).

Otra enterobacteria con potencial patógeno es el bacilo Gram-negativo *Klebsiella pneumoniae* (49). Así mismo, es destacada por causar un amplio espectro de infecciones (50). A nivel mundial su prevalencia en la mayoría de casos se da por infecciones nosocomiales entre el 7.5 y el 44%. La tasa de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) ha sido del 44 % en Latinoamérica, del 22,4% en Asia/Pacífico Oeste, del 13,3% en Europa, y del 7,5% en los Estados Unidos (51). Su prevalencia viene en constante aumento en el mundo. En Argentina en el año 2019, la mortalidad indica que aumenta aproximadamente un 50% en pacientes con bacteriemia (52).

En el país el primer aislamiento de *K. pneumoniae* se presenta en el año 2010, en la provincia de Cañar en un paciente sometido a cirugía. Posteriormente, se notifican casos en hospitales de Azogues, Cuenca, Guayaquil y Quito (53). Hasta la actualidad, es uno de los microorganismos con mayor grado de patogenicidad a nivel nosocomial causando brotes y epidemias en todo el mundo (51).

4.2.2. Morfología de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas se caracterizan por presentar una capa de peptidoglicano que tiene diferentes funciones, entre ellas se encuentra resistir la presión osmótica interna de la bacteria. De esa manera, las bacterias Gram-negativas están conformadas por una delgada capa de peptidoglicano mientras que, las Gram-positivas presentan una capa gruesa sin la presencia de una membrana lipídica externa, lo cual destaca la importancia para poder identificarlas mediante la tinción de Gram (54) .

Por lo tanto, por medio de la tinción de Gram, las bacterias Gram-positivas al observarse al microscopio presentan una coloración púrpura-violeta, debido a que la capa de peptidoglicano retiene el cristal violeta, mientras que, las bacterias Gram-negativas presentan una coloración rosada por la safranina ya que, su pared celular no tiene la capacidad de retener el cristal violeta (54).

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, con un tamaño de 2 a 4 μm de diámetro, es integrante de la microbiota intestinal de humanos y otros mamíferos. Es considerado como un microorganismo patógeno que puede actuar como una bacteria oportunista, produciendo una gran cantidad de patologías humanas, en las cuales se incluyen enfermedades gastrointestinales e infecciones extraintestinales (55).

Es una de las bacterias que mejor se ha estudiado, se conoce que puede crecer aceleradamente en condiciones óptimas (56). Tiene una estructura genética que se ha adaptado a diversos factores tanto ambientales como hostiles, es decir, puede evolucionar y convertirse en una cepa patógena provocando enfermedades en los seres humanos. En este punto es relevante considerar que las cepas patógenas de *E. coli* son las causantes tanto de enfermedades como de mortalidad en el mundo siendo un problema en la salud pública (57).

Por otro lado, *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria Gram-negativa de forma de bacilo, inmóvil anaerobia facultativa, con un tamaño entre 0.5 μm y 2.0 μm . Normalmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en el grado de virulencia. Cabe recalcar que *K. pneumoniae* es la principal enterobacteria productora de la enzima carbapenemasa KPC la cual es asociada con la resistencia a los antimicrobianos carbapenémicos representando un problema emergente (49).

4.2.3. Metabolismo de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

La capacidad de las bacterias de adquirir resistencia frente a diferentes grupos de antibióticos es debido a varios factores, principalmente que los microorganismos evolucionan y esas características van a ser adquiridas para la supervivencia de los mismos, por lo general, es debido a la transferencia de genes de una bacteria a otra. Para que las bacterias puedan adquirir nuevos mecanismos de resistencia va a depender principalmente del metabolismo de las mismas (58).

Escherichia coli productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se ha propagado rápidamente en el mundo, estas enzimas tienen la capacidad de inactivar los antibióticos betalactámicos como las penicilinas, cefalosporinas (primera y segunda generación), aztreonam y oximino-cefalosporinas (59).

Puede producir enzimas betalactamasas cromosómicas o extracromosómicas, por lo que los plásmidos de estas bacterias presentan genes de resistencia en sus transposones a antibióticos (60).

Esta bacteria productora de BLEE tienen tres grupos de enzimas, SHC, TEM y CTX-M, el último es el que más prevalece en los últimos años (61). La enzima CTX-M no se originó por mutaciones con plásmidos anteriores, si no que mediante la movilización de genes *bla* cromosómicos de *Kluyvera* spp. se encargan de disminuir la actividad de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (62).

En lo que se refiere a *Klebsiella pneumoniae* tiene la capacidad de producir betalactamasas frente a distintos betalactámicos, como el BLEE, lo que conlleva una resistencia a cefalosporinas de tercera generación. KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasa*) es una clase de betalactamasas detectada por primera vez en el año 1996 denominándose KPC-1 codificada en el gen *bla_{kpc}*. Debido a esto, a nivel mundial se han detectado variantes de esta enzima (KPC-1/2 a KPC-11) (63).

Esta propagación es resultado del elemento genético codificador de KPC Tn4401, que se encuentra en plásmidos mismos que dan como resultado resistencia antimicrobiana. Cabe recalcar que en un único aislamiento de *K. pneumoniae* se encontró varios tipos de betalactamasas asociados con *bla_{KPC}* (63). Incluso una elevada mortalidad a nivel mundial está asociada por la bacteriemia causada por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC (64). Por ende, el metabolismo de *K. pneumoniae* consiste en producir enzimas que hidrolizan antibióticos carbapenémicos (65).

4.2.4. Enfermedades causadas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Se considera que las infecciones bacterianas son la principal causa de enfermedades que afecta a gran parte de la población en el mundo ya que, pueden afectar a partes específicas del organismo. Generalmente infecciones por enterobacterias provocan infecciones de tracto urinario (ITU) que comúnmente se da en las mujeres. De igual manera, existen otras enfermedades como infección a vías respiratorias que son causadas por *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas*. Por otra parte, también se encuentra infecciones por *Staphylococcus aureus*, la cual puede producir una contaminación de las heridas debido a que la bacteria mencionada se encuentra generalmente en la piel (66).

Escherichia coli causa diferentes enfermedades dependiendo las cepas, entre las más comunes se encuentran, diarreicas, disentería e infecciones a las vías urinarias. Los episodios de diarrea se consideran un importante problema en la salud, especialmente en niños menores de cinco años en países en desarrollo (47). Se ha reportado un gran número de brotes asociado al consumo de frutas y verduras, las cuales previamente han sido contaminadas con heces de animales. Por otra parte, también existe el contacto de persona a persona por vía fecal-oral (42).

Por lo tanto, las cepas de *E. coli* han evolucionado y es por ello que presentan diferentes patotipos que se conocen en la actualidad, a los cuales generalmente se les da el nombre de *E. coli* diarreico (DEC), clasificándose en varios tipos según el sitio de colonización. En 1995 se empleó a *E. coli* enteropatógena (EPEC) para definir brotes de diarrea infantil, en la actualidad causan diarrea infecciosa humana que posee un plásmido de factor de adherencia (47).

Se estima que un 10% de pacientes con infección por un patotipo denominado, *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 productora de toxina Shiga (EHEC/STEC) es capaz de desarrollar síndrome hemolítico urémico (SHU), en el mundo es una de las causas más comunes de insuficiencia renal aguda en niños, así también, pueden

aparecer complicaciones neurológicas en el 25% y secuelas renales crónicas de un 50% de pacientes supervivientes con dicha patología (43).

En cuanto a *E. coli* enteroagregante (EAEC) produce una diarrea acuosa que presenta moco, dolor abdominal, fiebre baja y vómitos, suele ser de poco tiempo, pero en algunos casos puede durar más de 14 días. Por otra parte, se encuentra *E. coli* enterotoxígena (ETEC) siendo la principal causa de diarrea en niños en los países en desarrollo así como en los viajeros. Por último, *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) causa disentería especialmente en países en desarrollo, invade el colon y produce una infección similar a la de *Shigella* sp (47).

Klebsiella pneumoniae es considerado un agente causante de neumonía adquirida en la comunidad. A comienzos de los años 70, la epidemiología de las infecciones cambia debido a que se encuentra en el ambiente hospitalario siendo la principal causa de infecciones nosocomiales. También es considerado un patógeno oportunista ya que coloniza las mucosas y la piel de pacientes hospitalizados siendo causa de infecciones invasoras como septicemias o bacteriemias (67).

Es por ello que causa infecciones como neumonía en los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos y en los recién nacidos (51). Se estima que está presente de 1 a 6% en la nasofaringe y en un 5 a 38% de las deposiciones de la población general (53).

Se ha señalado que en la fibrosis quística entre los principales gérmenes aislados en los estudios microbiológicos de pacientes se encuentra *Klebsiella pneumoniae* el cual existe una infección y obstrucción en las vías respiratorias (68).

Por su genoma accesorio se divide las cepas de *K. pneumoniae* en grupos hipervirulentos, multirresistentes y oportunistas por lo que se separa a *K. pneumoniae* de dos especies relacionadas, *Klebsiella quasipneumoniae* y *Klebsiella variicola*. Estas especies causan infecciones del torrente sanguíneo y del tracto urinario (ITU). También otras cepas de *K. pneumoniae* son hipervirulentas, las cuales causan infecciones graves como endoftalmitis, meningitis y absceso hepático (69).

4.2.5. Resistencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* a antibióticos

Se define como un fenómeno que se caracteriza por la resistencia parcial o total de los microorganismos al efecto que producen los antibióticos, generalmente es ocasionado por el uso irracional de los mismos en el tratamiento terapéutico. La resistencia adquirida es la más preocupante, debido a que su dispersión genera la disminución del efecto a antibióticos que se han empleado, incrementando los casos de enfermedades por diferentes microorganismos patógenos (47).

E. coli a lo largo del tiempo ha presentado resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Existen estudios que señalan una multiresistencia, es decir, la bacteria es resistente a varios antibióticos de familias diferentes, como son la ampicilina, tetraciclinas, betalactámicos y macrólidos, lo que indica que un tratamiento no sería beneficioso. También es resistente a trimetoprim/sulfametoxazol y fluroquinolonas (70). De igual manera *E. coli* que produce β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) presenta resistencia a cefalosporinas y monobactámicos de tercera y cuarta generación (71).

En Ecuador entre los años 2014 y 2018, varios estudios indican que, existe resistencia de hasta en un 50% en área hospitalaria a las cefalosporinas y carbapenémicos, también presenta resistencia a la colistina que es considerado un antibiótico de última línea, es por ello que han sido descartados como tratamiento en infecciones por *E. coli* (72).

Por otro lado, en el año 2017, la OMS publicó una lista global de las bacterias resistentes a los antibióticos que necesitan prioridad en la investigación de nuevos fármacos. En esta lista, las bacterias clasificadas como críticamente prioritarias se encuentran *K. pneumoniae* siendo una de las bacterias multidrogorresistentes de alta prioridad de investigación (73).

Se conoce que hace más de 20 años esta bacteria tiene la capacidad de resistencia frente a la acción de cefalosporinas, esto como resultado de la producción de enzimas como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (74).

En un estudio transversal, analítico y observacional realizado en un hospital general se aislaron 234 cepas de *K. pneumoniae* en 205 pacientes hospitalizados, por lo que, los resultados obtenidos señalan que un 67% de esta bacteria fueron productoras de BLEE y un 44% fueron resistentes a ciprofloxacina (74).

Entre los betalactámicos se encuentra con mayor porcentaje de resistencia la ampicilina seguida de ampicilina-sulbactam y amoxicilina-clavulánico. Frente a cefalosporinas la de mayor grado de resistencia se encuentra la cefotaxima, seguida de ceftriaxona, ceftazidima y cefoperazona (75).

Así también, existe resistencia con fluoroquinolonas como la ciprofloxacina y aminoglucósidos como la gentamicina y amikacina (3).

La resistencia de *K. pneumoniae* frente al tratamiento de los antibióticos carbapenémicos se ha propagado en todas las regiones del mundo. En varios países, los antibióticos carbapenémicos ya no son eficientes en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae*, debido a la resistencia que se desarrolla (51).

4.2.6. Tratamientos actuales de las enfermedades causadas por *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Gracias al uso de antimicrobianos las enfermedades potencialmente mortales han sido tratadas; sin embargo, el aumento global de la resistencia antimicrobiana ha afectado la capacidad de tratar una amplia gama de infecciones, debido al uso excesivo de los mismos en los últimos años (76).

En lo que respecta a una infección para *E. coli* se consideran antibióticos a los cuales presente sensibilidad la bacteria, se conoce que los fármacos pueden destruir el equilibrio de la microbiota intestinal. Hay que tener en consideración que al emplear antibióticos como tratamiento también puede generar un riesgo en los síntomas, como es el caso de la ampicilina, cotrimoxazol, trimetoprim, gentamicina y azitromicina que tiene la capacidad de actuar en contra de *E. coli*, provocando la liberación de la toxina Shiga (Stx) (76).

Sin embargo, frente a enfermedades producidas por *E. coli* patógena el tratamiento principal son los antibióticos, por lo que se requiere nuevos fármacos con un modo de acción que puedan combatir cepas resistentes (77).

Por otra parte, *K. pneumoniae* al producir betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son capaces de crear resistencia frente a grupos de antibióticos betalactámicos. Así mismo, otro mecanismo de resistencia es el cambio de su permeabilidad frente al antibiótico, ya sea frente a la amikacina y a otros aminoglucósidos, lo que explica un cambio en la membrana externa que puede llegar a alterar el transporte activo de la célula (78).

4.2.7. Mecanismos de resistencia bacteriana de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* frente a los antibióticos

Para que las bacterias puedan ser resistentes a los antibióticos depende de los mecanismos que presente, la resistencia adquirida es la más común en las bacterias. Un gran problema se debe a aquellas bacterias que presentan multiresistencia a diferentes antibióticos lo que es un desafío buscar un tratamiento efectivo. Es importante mencionar que alrededor del 80% de resistencia bacteriana es debido a la información genética exógena (79).

Existen genes que codifican la resistencia de *Escherichia coli* frente a los antibióticos, estos se encuentran asociados generalmente a los elementos genéticos móviles como son los plásmidos y transposones, estos están encargados de intercambiar linajes filogenéticos entre bacterias lo que les ha permitido adquirir multiresistencia (80).

Entre el principal mecanismo de resistencia que *E. coli* ha adquirido es a los betalactámicos (ampicilina), esto debido a la hidrólisis enzimática, ya que la bacteria presenta enzimas denominadas betalactamasas que son capaces de hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, lo que lleva a la inactivación del antibiótico previo a su efecto (81).

Existen diferentes grupos en base a las betalactamasas, en el caso de *bla*TEM y *bla*SHV son penicilasas inhibidas por el ácido clavulánico pero en algunas ocasiones presenta acción frente a las cefalosporinas de tercera generación. Así también, *bla*OXA-1 se caracteriza por ser penicilasas que hidrolizan la oxacilina, mientras que, *bla*CARB tiene acción hidrolítica frente a a la carbenicilina (81).

El mecanismo de acción de las quinolonas se caracterizan principalmente por inhibir la acción de las topoisomerasas tipo II (ADN girasa y topoisomerasa IV), en el caso de las bacterias Gram-negativas el principal objetivo es la ADN girasa y la topoisomerasa IV sería considerada como diana secundaria (81).

La enzima ADN girasa es un heterotéramero que se encuentra conformado por dos subunidades A y dos B, en donde la subunidad A tiene relación en la unión y división del ADN, mientras que la subunidad B presenta un sitio con la actividad de la ATPasa. Por lo tanto, es importante mencionar que las fluoroquinolonas son encargadas de inhibir la subunidad A y para la subunidad B están ciclotoialidinas y aminocumarinas (novobiocina) (82).

De igual manera, entre los principales mecanismos de resistencia en este caso también se encuentra la alteración de los blancos de quinolonas, bombas de expulsión activa y transferencia de genes de resistencia plasmídicos. Existe un mecanismo principal de una mutación puntual que da un cambio en el codón 83 y codifica otro aminoácido por lo que la enzima blanco se modifica, generando una resistencia a las quinolonas (ácido nalidíxico), mientras que, la resistencia por fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina) se debe a la variante cr de la acetiltransferasa 6' ya que se da un cambio en los aminoácidos de los codones 102 y 179 que tiene la capacidad de acetilar a aminoglucósidos y fluoroquinolonas (80), (81).

En cuanto a las sulfonamidas y trimetropim-sulfametoxazol, su mecanismo de resistencia se encuentra vinculado al desarrollar genes mutantes mediante elementos móviles. También las sulfonamidas presentan genes que se encuentran relacionados con los integrones, como *sul1*, *sul2* y *sul3* estos se encargan de codificar formas mutantes de la enzima dihidropteroato sintasa a la cual el antibiótico

no tiene la capacidad de atacar, de igual manera en el trimetropim-sulfametametoxazol que tienen genes *df*r con resistencia antibiótica (81), (83).

El mecanismo de resistencia de *K. pneumoniae* es la producción de las enzimas betalactamasas, mismas que tienen la capacidad de hidrolizar los antibióticos betalactámicos por lo que desafortunadamente se vuelve un problema de salud a nivel mundial. Es preocupante debido a que esta bacteria adquiere varios mecanismos de diseminación uno de ellos es la obtención de genes nuevos de resistencia ya sea por plásmidos, transposones e integrones y la transmisión de cepas multirresistentes causadas por mutación de genes ya existentes (84).

Otro mecanismo de resistencia que desarrolla es la producción de enzimas carbapenemasas las cuales son eficientes en causar resistencia frente los betalactámicos, además de las cefalosporinas, penicilinas, carbapenémicos y monobactámicos (85).

Las carbapenemasas del tipo KPC, son las más comunes por su actividad hidrolítica frente a los betalactámicos esto por su gran movilidad genética en plásmidos (86). Se caracterizan por tener enzimas codificadas genéticamente, las cuales confieren una gran resistencia a varios antibióticos incluyendo los carbapenems. Estas carbapenemasas llegan a ser codificadas por el gen bla KPC localizado en plásmidos, lo que resulta que las bacterias que lo portan adquieran la capacidad de intercambiar información genética con otro tipo de bacterias, facilitando su propagación clonal y geográfica (87).

4.2.8. Mecanismos de acción de los antibióticos frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Las bacterias tienen una pared celular que se encarga de protegerla, por lo tanto su ausencia provoca la destrucción de la misma, lo que va a producir un elevado gradiente de osmolaridad que generalmente se encuentra entre el citoplasma bacteriano y el medio. Por lo tanto, los antibióticos se encargan de inhibir la síntesis de la pared y para poder realizar esa acción se requiere que la bacteria se encuentre en medio isotónico o hipotónico favoreciendo la destrucción celular (80).

En la actualidad existen diversos grupos de antibióticos, en su mayoría han sido efectivos desde su descubrimiento, desafortunadamente la resistencia a los mismos ha sido un problema desafiante.

Mecanismo de acción de los betalactámicos

Es un grupo de antibióticos que se ha considerado una de las familias más numerosas que presentan como mecanismo de acción la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo que, son los más empleados en diversos tratamientos por infecciones. Tienen una acción bactericida lenta y actividad dependiente del tiempo, a pesar de que presenta gran resistencia la penicilina todavía se considera como el tratamiento de elección para infecciones por microorganismos (88).

Mecanismo de acción de los macrólidos

Este grupo se unen de manera reversible al dominio V del ARN ribosómico 23S presentando una actividad bacteriana lenta y se considera bacteriostática en la mayoría de microorganismos. La telitromicina tiene una afinidad por el ribosoma 10 veces mayor que la eritromicina y 6 veces mayor que la claritromicina, en general los macrólidos se encargan de inhibir el orificio de entrada al canal mediante el cual la proteína del ribosoma sale (89).

Mecanismo de acción de los aminoglucósidos

En cuanto a los aminoglucósidos estos atraviesan la membrana interna y se unen a la subunidad 30S ribosomal, se encargan de inhibir la síntesis proteica de la bacteria originando su muerte. Presenta un efecto bactericida, es importante destacar para que el efecto sea adecuado y exista disminución de la resistencia va a depender principalmente de utilizar las dosis adecuadas en el tratamiento de las diferentes infecciones (90).

Mecanismo de acción de las sulfonamidas

Las sulfonamidas tienen como mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos bacterianos, con efecto bacteriostático de espectro amplio y actúan frente a Gram-positivos y Gram-negativos. Este grupo de antibióticos puede

actuar sinérgicamente con antibióticos de la familia diaminopirimidinas (pirimetamina y trimetoprima) frente a algunas bacterias, generalmente la combinación mas empleada es el cotrimoxazol junto con trimetoprima y sulfametoxazol (91).

Mecanismo de acción de las tetraciclinas

Las tetraciclinas corresponden a los antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro, mismas que inhiben la síntesis de proteínas. Por medio de un proceso de transporte activo dependiente de energía o difusión pasiva entran a los microorganismos. Al estar dentro de la célula, las tetraciclinas de forma reversible se unen a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, el cual ocasiona un bloqueo de la unión de aminoacil-tRNA al sitio receptor en el complejo de ribosoma-mRNA. Este proceso impide la adición de aminoácidos al péptido en desarrollo (92).

Mecanismo de acción de las quinolonas

Las quinolonas constituyen el grupo de antibióticos bactericidas, en el cual ha existido un avance en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Su mecanismo de acción se basa en la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN el cual funciona bloqueando completamente el proceso del sistema enzimático de replicación del ADN. Como consecuencia del daño que se produce sobre el ADN bacteriano ocasiona la muerte celular tras cada replicación (93).

Mecanismo de acción del cloranfenicol

El cloranfenicol es un bacteriostático contra la mayoría de los organismos susceptibles e inhibe la síntesis de proteínas microbianas. Actúa por medio de la unión reversible a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano e inhibe la formación del enlace peptídico. Tiene actividad frente a las rickettsias pero no con las clamidias (92).

Mecanismo de acción de la nitrofurantoína

La nitrofurantoína es un antibiótico perteneciente al grupo de los nitrofuranos con actividad bactericida. El mecanismo de acción consiste en bloquear la síntesis

proteica en el ribosoma, así también, rompe las cadenas de ADN y por último, llega a bloquear la actividad de la acetil-coenzima A (94).

En lo que respecta a *E. coli* y *K. pneumoniae* los carbapenémicos tienen un mejor efecto en la familia de los betalactámicos, en el caso de doripenem presenta una actividad amplia en patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, en esto se incluyen las Enterobacteriaceae que son productoras de BLEE. Se conoce que las bacterias Gram-negativas están adquiriendo un incremento de resistencias a ciprofloxacina y levofloxacino, por lo que es recomendable no emplear fluoroquinolonas en el tratamiento de infecciones por *E. coli* (95).

La tigeciclina es un derivado de la minociclina, presenta un efecto antimicrobiano amplio en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo el CMI menor en el primer grupo en comparación del segundo. Los datos realizados *in vitro* demuestran que este fármaco tiene una actividad antimicrobiana favorable frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, especialmente en aquellas productoras de BLEE (95).

La cefepima es un antibiótico perteneciente al grupo de cefalosporinas de cuarta generación, tiene una gran acción frente a organismos causantes de neumonía como es *K. pneumoniae*. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, son capaces de penetrar las porinas que se encuentran en la membrana externa de la bacteria e incluso es la mejor opción ya que actúan con mayor rapidez en comparación con las cefalosporinas de tercera generación (96).

Reacciones adversas de los antibióticos

Se ha considerado según la OMS que las reacciones adversas a los medicamentos están dentro de las diez principales causas de muerte a nivel mundial, por lo que implican un incremento en los costos hospitalarios. En América Latina existe un 10.5% de pacientes hospitalizados que presentan reacciones adversas a medicamentos (97).

Reacciones adversas de los betalactámicos

Los betalactámicos son considerados los principales antibióticos empleados en tratamientos por infecciones, por lo que presenta como principales reacciones adversas alergias sistémicas, anafilaxia, alergias dermatológicas, neurológicas, gastrointestinales, hematológicas, hepáticas y renales. La amoxicilina es el fármaco que se emplea con mayor frecuencia en los niños y por lo tanto tiene un riesgo de toxicidad por inmadurez en los sistemas de excreción, puede producir ansiedad, convulsiones, confusiones, hiperactividad y cambios en el comportamiento. La piperacilina y el tazobactam son los betalactámicos más asociados a reacciones adversas en el sistema nervioso central (SNC) (97).

Reacciones adversas de los macrólidos

Los macrólidos tienen como principales reacciones adversas los problemas gastrointestinales tales como náuseas, vómitos y diarreas, también presenta hepatotoxicidad, ototoxicidad, superinfección, flebitis y alergias. Las reacciones ototóxicas se encuentran relacionadas con dosis elevadas o al emplear los macrólidos en pacientes con insuficiencia hepática o renal. La eritromicina al ser administrada por vía intravenosa puede producir flebitis, existen también casos de pancreatitis por el uso de este antibiótico. Por otra parte, al administrar dosis altas de claritromicina y azitromicina producen casos de ototoxicidad en tratamiento de *Mycobacterium avium* en pacientes con SIDA (89).

Reacciones adversas de los aminoglucósidos

En cuanto a los aminoglucósidos pueden provocar nefrotoxicidad, ototoxicidad y bloqueo neuromuscular, de este grupo de fármacos la espectomicina es la única que no tiene los efectos mencionados anteriormente. Así también, existen efectos adversos que no son muy frecuentes pero que son importantes como es el bloqueo de placa neuromuscular y reacciones de hipersensibilidad. Generalmente cuando existe una mala administración de gentamicina y amikacina existe un mayor riesgo de generar nefrotocidad y bloqueo de la placa neuromuscular (98).

Reacciones adversas de las sulfonamidas

En las sulfonamidas existe mayor riesgo de presentar reacciones adversas en comparación con otros antibióticos, entre las cuales principalmente se encuentra hipersensibilidad como el exantema, dermatitis necrosante, anafilaxia, fiebre y eritema multiforme. Además, produce trastornos digestivos tales como náuseas, vómitos y diarrea, y alteraciones hematológicas como la anemia megaloblástica (91).

Reacciones adversas de las tetraciclinas

La doxiciclina perteneciente al grupo de las tetraciclinas presenta varias reacciones adversas, siendo las más comunes las molestias gastrointestinales como vómitos, náuseas y dolor a nivel del epigástrico afectando casi al 40% de los pacientes, toxicidad a nivel del sistema nervioso central ya sea mareos o vértigos, decoloración de los dientes y fotosensibilidad. En lo que respecta a un tratamiento a largo plazo existe mayor probabilidad de reacciones adversas hematológicas como trombocitopenia, eosinofilia o anemia hemolítica (99).

Reacciones adversas de las quinolonas

En lo que respecta a las fluorquinolonas de segunda generación se encuentra ciprofloxacino el cual algunos estudios indican artralgias del 1,5 – 3,8%, sin embargo, se señala que fueron leves o moderadas y desaparecen al suspender el tratamiento. Así mismo, levofloxacino algunos autores indican complicaciones a nivel musculoesquelético ocasionado dolor articular (93).

Reacciones adversas del cloranfenicol

Las reacciones adversas del cloranfenicol más frecuentes son las alteraciones hematológicas (100). A nivel del sistema endócrino causa psicosis tóxica y alucinaciones. Puede existir la Reacción de Herxheimer en el tratamiento de la fiebre tifoidea (101).

Reacciones adversas de la nitrofurantoína

El uso de nitrofurantoína se ha asociado las reacciones adversas en tratamientos prolongados con la aparición de problemas pulmonares graves como la fibrosis y neumonitis intersticial, a nivel hepático grave ya sea cirrosis, hepatitis colestásica, hepatitis citolítica, hepatitis crónica y algunos síntomas de hipersensibilidad (102).

4.2.9. Efecto terapéutico de las antraquinonas

Las antraquinonas (9,10-dioxoantracenos) forman parte de compuestos naturales y sintéticos con varias aplicaciones ya sea como agentes antimicrobianos, laxantes y antiinflamatorios (37). Por medio de la base de datos PubChem se ha probado la capacidad de antraquinonas para actuar como inhibidores competitivos a través de la interacción con el bolsillo de unión a ATP de la ADN girasa B de *Mycobacterium tuberculosis*. En el cribado virtual se identificó a 7122772 (N-(2-hidroxietil)-9,10-dioxoantraceno-2-sulfonamida) ligando de mejor puntuación (103).

En base a esta antraquinona se diseñó un nuevo derivado con un resto de aminotriazol, que presentó ser estable en complejo con la enzima y con un perfil farmacocinético aceptable. Por lo que, los resultados presentados en general señalan una antraquinona nueva sintéticamente accesible y con un gran potencial para inhibir la GyrB de *M. tuberculosis* (103).

Es necesario destacar que en la actualidad se indica para tratar estreñimiento, esclerosis múltiple, artritis, e incluso el cáncer. Además, las antraquinonas biológicamente activas derivadas de Reactive Blue 2 son compuestos esenciales para estudios farmacológicos y bioquímicos ya que pueden servir para el desarrollo de futuros fármacos (37).

La clasificación de las antraquinonas depende de sus estructuras químicas, comúnmente se encuentra en las antraquinonas de origen natural grupos funcionales como hidroxilo, metilo, metóxilo, entre otros (37). Existen algunos estudios realizados con antraquinonas, por ejemplo, Phycion 8-O- β -D-glucopiranosido (PG) son antraquinonas naturales bioactivas que ejercen propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas (104).

Incluso 3-metil-1,6,8-trihidroxiantraquinona ha sido empleado varios años para tratar enfermedades neoplásicas e inflamaciones (105).

Una investigación con 1,5,7-trihidroxi-3-hidroximetilantraquinona presentó efectos antimicrobianos importantes, inhibiendo el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* a 62,5 µg/mL, *Staphylococcus epidermidis* a 15,62 µg/mL y *Bacillus subtilis* a 62,5 µg/mL, también fue efectiva frente a hongos (11). De igual manera, existe un estudio en el que la antraquinona cisrabelomicina aislada de la fermentación del arroz del *Streptomyces* sp presentó actividades antimicrobianas frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, teniendo en cuenta que inhiben tanto a bacterias como hongos, indicando un efecto importante para el descubrimiento de nuevos antibióticos (106).

Otra investigación sobre derivados de 1,8-dihidroxiantraquinonas existentes (1, 8-DAD) aislados de plantas medicinales indicó que poseen actividades antimicrobianas y plaguicidas. Incluso puede tratarse enfermedades dermatológicas. Según el estudio realizado 1,8-DAD fue capaz de inhibir la proliferación celular, prevenir metástasis e inducir la apoptosis (107). Otro estudio también señaló que derivados de antraquinona dihidroxi, 1,8-dihidroxi-antraquinona (Dan) aislado por primera vez de *Porphyra haitanensis* presentó una fuerte actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (10).

Así también un estudio sobre la emodina (1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona) señaló que posee un amplio espectro de propiedades farmacológicas, además de actividades antimicrobianas, hepatoprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias (108). De la misma manera en otro estudio, se indicó que la emodina presenta un efecto antibacteriostático contra *Staphylococcus aureus* (109).

Existe otra investigación en donde obtuvieron cuatro derivados de antraquinonas a partir de *Streptomyces* spp. en donde se obtuvo que los compuestos uno y cuatro tenían actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (110).

En otro estudio, emplearon cuatro hidroxiantraquinonas (pseudopurina, purpurina, munjistina y xantopurpurina) que se encuentran de manera natural en *Rubia* spp. De las cuales, dos de ellas (pseudopurina y munjistina) presentaron una actividad inhibitoria en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (111).

Además, en un experimento con un derivado de la tetrahidroantraquinona, con el nombre de (2R,3S)-7-etil-1,2,3,4-tetrahidro-2,3,8-trihidroxi-6-metoxi-3metil-9,10-antracenediona, en combinación con otras cinco antraquinonas de las que se tiene conocimiento previo, presentó actividad antibacteriana frente cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (112).

Por otra parte, se realizó un estudio *in vitro* con derivados de antraquinonas, lo que se evidenció es que varios de los derivados tenían inhibición de *E. coli* multirresistente (113).

Hasta el momento, en la literatura científica no existen reportes de la evaluación del efecto de las antraquinonas, cloradas y nitradas sobre las bacterias incluidas en este estudio (37).

4.2.10. Efecto terapéutico de antraquinonas extraídas de plantas

Se han realizado investigaciones con extractos naturales de plantas que pueden tener capacidad antifúngica y antimicrobiana. Se tiene conocimiento previo de que *Morinda royoc* L. son ricas en antraquinonas, estos metabolitos como ya se conoce tienen actividad antibacteriana, anticancerígena, etc (114) .

En un trabajo realizaron un experimento para analizar la capacidad farmacológica del extracto diclorometánico de las raíces de *Morinda royoc* L. en la evaluación antifúngica y antibacteriana emplearon el método de microdilución en placa obteniendo resultados con actividad antimicrobiana frente a cepas de bacterias Gram-positivas, como es el caso de *S. aureus* (resistente a oxacilina), y *E. faecalis* que se obtuvieron valores de CMI que oscilan entre 31,25 y 62,5 µg/mL (114).

Por otro lado, la aloe-emodina posee un efecto laxante y es ampliamente usado. Su estructura indica la presencia de grupos hidroxilo en la posición 1 y 8 de anillos aromáticos lo es elemental para la acción purgante. Así también, el efecto de aloe-emodina en los radicales hidroxilo aporta a su actividad antioxidante (112).

CAPÍTULO II
METODOLOGÍA

II.1.- Diseño de investigación

La presente investigación es de carácter básico con paradigma empírico y enfoque cuantitativo, ya que busca relaciones causales entre la estructura de los compuestos y sus efectos sobre las bacterias. Cabe recalcar, que es una investigación interdisciplinaria que involucra bacteriología y farmacología (115). Es también una investigación explicativa, de tipo experimental de carácter correlacional, esto debido a que se manipula las variables de estudio (116).

Hasta donde se conoce no existe en la literatura científica reportes sobre la evaluación comparativa del efecto de antraquinonas hidroxiladas, cloradas y nitradas sobre las bacterias seleccionadas, de igual manera, no se han encontrado investigaciones de sus efectos en combinación con ciprofloxacina. Por lo cual, el trabajo permitió generar información que es útil para diseños de nuevas investigaciones dirigidas a profundizar en el conocimiento del potencial antibacteriano de este tipo de compuestos.

II.2.- Población y muestra

II.2.1. Universo - Población:

La población de estudio fue finita y fueron colonias de bacterias de las dos especies seleccionadas para la presente investigación siendo *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* lo cual se pretendieron aislar en un periodo de tiempo de dos meses. Fueron obtenidas de muestras ambientales de agua o suelo que presentaron gran probabilidad de contaminación microbiana.

II.2.2 Muestreo y muestra:

El muestreo es no probabilístico por conveniencia, en el cual, se pretendió aislar nueve colonias de cada una de las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* de aguas residuales de parroquias rurales de Cuenca, seleccionando puntos que son altamente contaminados.

Criterios de selección: Para la formalización de la población se tuvo en cuenta los siguientes criterios de selección:

- **Criterios de inclusión:** Se incluyeron en el presente estudio muestras de aguas residuales con gran contaminación en el que se encuentren microorganismos patógenos.
- **Criterios de exclusión:** Se excluyeron aguas que estaban en buen estado o no tenían mucha contaminación, ya que los resultados aparentemente serían negativos frente a lo que se requería.

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

1. Concentración de antraquinona: cuantitativa continua.

Definición: Cantidad empleada de antraquinona por volumen (mL).

Escala de medición:

- Mayor a 5 μg .
- Menor a 5 μg .

2. Tipo de antraquinona: cualitativa normal.

Definición: Tipos de antraquinonas que se encuentran naturalmente en algunas plantas.

Escala de medición:

- Hidroxiladas.
- Cloradas.
- Nitradas.

3. Tipo de bacteria: cualitativa normal.

Definición: Tipos de bacterias Gram-negativas seleccionadas para el experimento.

Escala de medición:

- *Klebsiella pneumoniae*.
- *Escherichia coli*.

4. Tiempo de exposición de las bacterias a los compuestos: cuantitativa.

Definición: Tiempo en que las bacterias se encuentran expuestas a los compuestos, para un análisis de su reacción frente a los mismos.

Escala de medición:

- 16 horas.
- 18 horas.
- 24 horas.

5. Resistencia de las bacterias aisladas frente a ciprofloxacina: cualitativa.

Definición: Respuesta de las bacterias aisladas frente a ciprofloxacina.

Escala de medición:

- Resistente.
- Relativamente resistente.

6. Sensibilidad de las bacterias frente a ciprofloxacina: cualitativa.

Definición: Respuesta inhibitoria de la ciprofloxacina frente a las bacterias aisladas anteriormente.

Escala de medición:

- Sensible.
- Relativamente sensible.

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

Materiales

Los materiales que se emplearon en el proceso experimental fueron la estufa (Memmert), la balanza analítica (BOECO germany) y la cabina de flujo (Euroclone).

En lo que respecta a los medios, Müller – Hinton, CHROMagar y caldo nutritivo BHI fueron de la marca (Himedia).

Para la tinción de Gram los colorantes usados fueron Gram alcohol acetona, Gram violeta cristal, Gram fucsina (safranina) y Gram Lugol de la marca (Quimical) al igual que el Glicerol. Todas las distintas antraquinonas correspondieron a la marca (Sigma-Aldrich chemistry). Por último, todos los discos de antibióticos pertenecieron a la marca (Bioanalyse).

Métodos

1. Identificación y aislamiento de las bacterias

En el presente estudio en su primera fase se realizó la confirmación de la identidad de las bacterias con un estudio de su morfología microscópica, características del crecimiento en CHROMagar seguido de su análisis microscópico de las muestras teñidas con los colorantes de Gram.

2. Evaluación de la sensibilidad a las antraquinonas

La sensibilidad de las bacterias frente a las diferentes antraquinonas fue realizada por el método de Kirby-Bauer, para lo cual se emplearon discos de papel con concentraciones crecientes de estos compuestos que fueron colocados sobre las bacterias previamente sembradas en agar Müller-Hinton, con los discos de ciprofloxacina como control positivo y con DMSO (solvente para las antraquinonas) como control negativo.

3. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de las antraquinonas

Para determinar la CMI de cada antraquinona se empleó el protocolo de macrodilución, para lo cual, cada compuesto fue disuelto con concentraciones crecientes, en agar. Posteriormente, se sembró en estos medios un inóculo estandarizado de cada una de las cepas de bacterias y se incubó para determinar la CMI, la misma que se define como la mínima concentración de un compuesto que inhibe el crecimiento bacteriano detectable a simple vista.

4. Evaluación de la capacidad de antraquinonas para recuperar el efecto de ciprofloxacina

Para incrementar el efecto de la ciprofloxacina, se empleó el mismo procedimiento de macrodilución con las antraquinonas, el cual se colocó en el medio de Müller-Hinton, posteriormente se realizó un antibiograma con las bacterias que se van a estudiar y un disco de ciprofloxacina, con el fin de observar si existe un incremento del efecto del antibiótico.

Métodos

Evaluación del efecto antimicrobiano con antraquinonas por Kirby-Bauer

Las antraquinonas se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) usando 5 mg de cada antraquinona en 1 mL del solvente. En cada disco de papel filtro previamente esterilizado se colocó 5 μ L de la solución de cada una de las antraquinonas, con el fin de que se encuentren en cada uno 25 μ g de estas moléculas.

Evaluación por macrodilución en agar

La solución madre de cada antraquinona se preparó usando 5 mg disueltos en 1 mL de DMSO y adicionándolo a 19 mL de agar MH, por lo tanto, se obtuvo 250 μ g /mL en cada agar. Se estandarizó un inóculo de las bacterias, usando el factor de McFarland 0.5, posteriormente, se tomó 5 μ L de esta suspensión y se diluyó 10.000 veces usando de solución salina. Finalmente, se colocó 10 μ L de esta dilución en cada placa con agar combinado con las nueve antraquinonas. Por último, se incubó por 24 horas a 37°C para finalmente contar el número de colonias.

Evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas combinadas con ciprofloxacina

Se prepararon placas con agar con las nueve antraquinonas de la misma manera que se realizó por el método de macrodilución, con el fin de realizar un antibiograma incluyendo un disco de ciprofloxacina de 5 μ g. Para la siembra se preparó una dilución de las bacterias, utilizando un hisopo con la muestra recargada y se procedió a sembrar por la técnica de aislamiento.

Evaluación del efecto sinérgico de antraquinonas sintéticas en combinación con antibióticos tradicionales

Se prepararon placas con las nueve antraquinonas de la misma manera que se realizó por el método de macrodilución, con el fin de realizar un antibiograma con antraquinonas disueltas en agar junto con los diferentes antibióticos tradicionales para cada bacteria las cuales fueron sembradas de la misma manera indicada en la evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas combinadas con ciprofloxacina.

Para los experimentos con *E. coli* se emplearon nueve antibióticos los cuales fueron moxifloxacina (MXF), cefuroxima (CXM), amoxicilina (AM), claritromicina (CLR), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), cloranfenicol (C), amikacina (AK), ampicilina (AM) y gentamicina (CN). Así mismo, se realizó un experimento con mayores concentraciones de la antraquinona 1,8-dihidroxi-4,5-dinitro antraquinona en agar (200, 500, 750 y 1000 µg) e incluyendo un disco con ampicilina 10 µg para evaluar efectos sinérgicos entre estos compuestos.

Por otra parte, en *K. pneumoniae* se efectuó el mismo procedimiento del antibiograma con antraquinonas disueltas en agar junto con los diferentes antibióticos tradicionales, los cuales fueron moxifloxacina (MXF), cefuroxima (CXM), amoxicilina (AM), claritromicina (CLR), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), cloranfenicol (C), amikacina (AK), ampicilina (AM) y gentamicina (CN).

II.5.1.- Procedimientos estadísticos y análisis de datos

Los datos serán presentados a manera por gráficos en donde se indique los resultados obtenidos durante la realización del proyecto, en el cual se evidenciarán las imágenes de cada prueba que se vaya a efectuar hasta llegar al objetivo esperado. En cuanto al análisis estadístico, se empleará el paquete GraphPad Prism 6 para los análisis.

II.6.- Aspectos éticos

Los autores de la presente investigación declaran que no transgrede ninguna norma ética, en donde los datos serán redactados sin manipulación alguna, sin ocultar o modificar procedimientos, la investigación estará disponible para ser consultado por los individuos que lo requieran. Además, se comprometen a emplear las bacterias con fines declarados en el proyecto, empleando las buenas prácticas del laboratorio, utilizando el equipo de protección necesario y requerido dentro del mismo; así también, manejar las muestras biológicas con precaución para evitar la contaminación ya sea dentro o fuera del laboratorio, realizando un adecuado deshecho de las mismas con el fin de cuidar y preservar el medio ambiente.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. RESULTADOS

Evaluación del efecto antimicrobiano de antraquinonas por el método de Kirby-Bauer

El primer experimento que se realizó para evaluar el efecto antimicrobiano con antraquinonas fue empleando el método de Kirby-Bauer. Como muestra la figura 1, en *E. coli* y *K. pneumoniae* los resultados obtenidos revelan que ninguna de las antraquinonas presentó efecto usando discos con 25 µg de cada una de ellas. Los experimentos fueron realizados por triplicado y de esta manera confirmados.

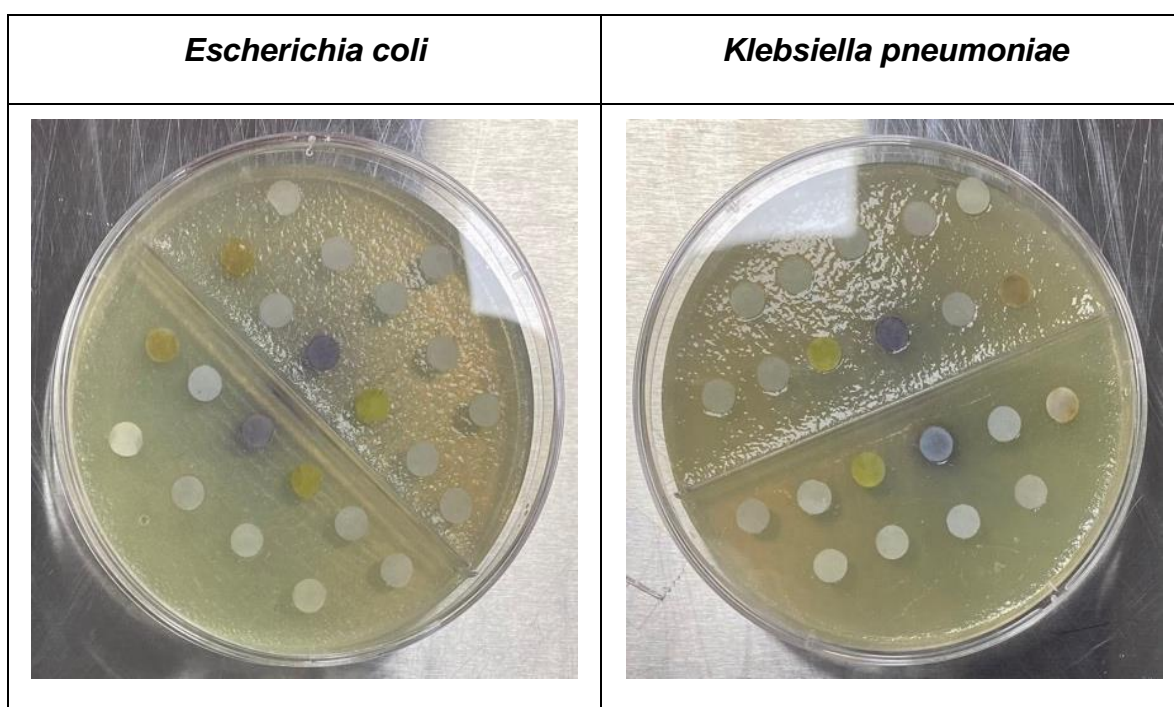


Figura 1: Efecto antimicrobiano con discos de antraquinonas. Cada antraquinona fue colocada en un disco y además se incluyó un disco control con DMSO.

Evaluación del efecto antibacteriano de antraquinonas por macrodilución en agar.

Debido a que en el experimento anterior utilizando 25 µg de cada antraquinona los resultados fueron negativos, el siguiente paso fue emplear antraquinonas por el método de macrodilución para alcanzar concentraciones más altas de las mismas.

Como indican las figuras 2 y 3, tanto para *E. coli* y *K. pneumoniae* las concentraciones empleadas no presentaron efecto antimicrobiano lo que se evidencia por igual número de colonias en las placas con antraquinonas comparadas con las placas control con y sin DMSO. Estos experimentos fueron comprobados al realizarse por triplicado para las dos bacterias.

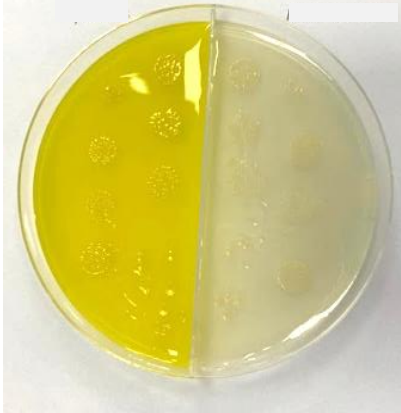
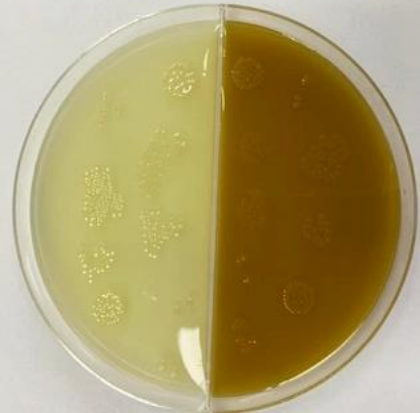
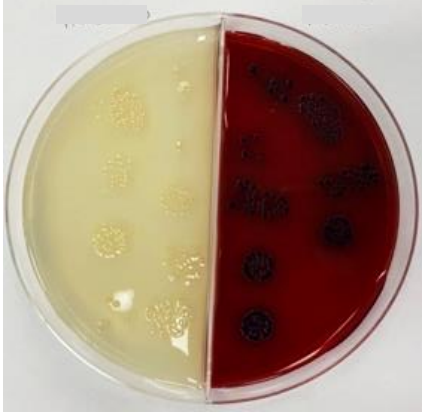
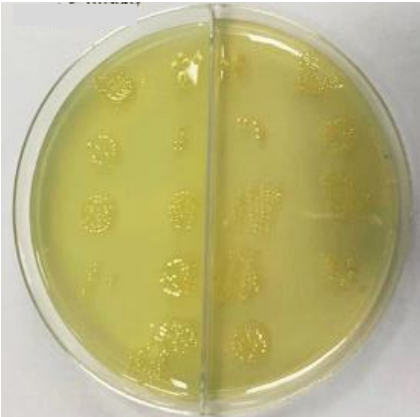
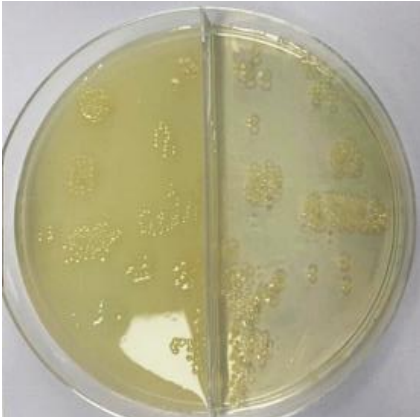
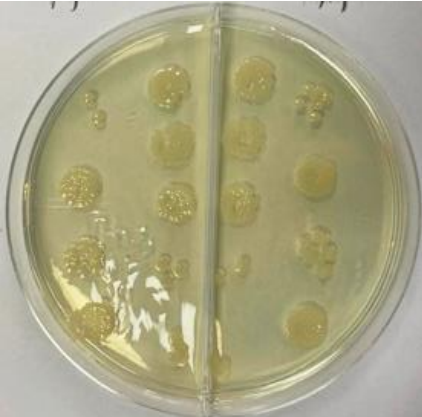
<i>Escherichia coli</i>		
		
1.8 Dihidroxi antraquinona Antraquinona	1 Cloro antraquinona 1.5 Dihidroxi antraquinona	1.5 Dinitro antraquinona 1.8-dihidroxi- 4.5- dinitroantraquinona
		
1.5 Diclora antraquinona 2 Cloro antraquinona	1.8 Diclora antraquinona DMSO	Agar

Figura 2: Evaluación por macrodilución de las antraquinonas frente a *Escherichia coli*.

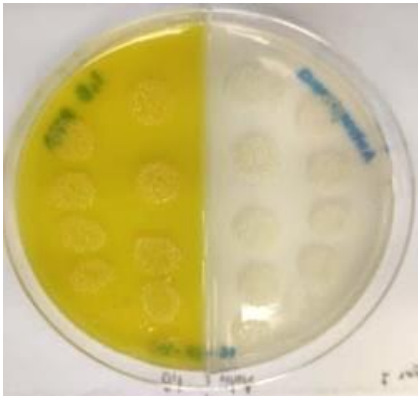
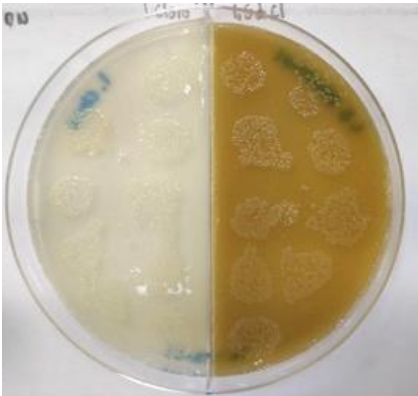
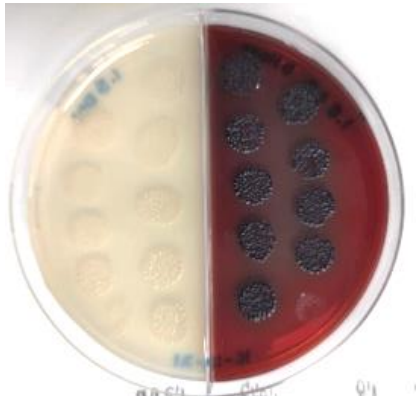
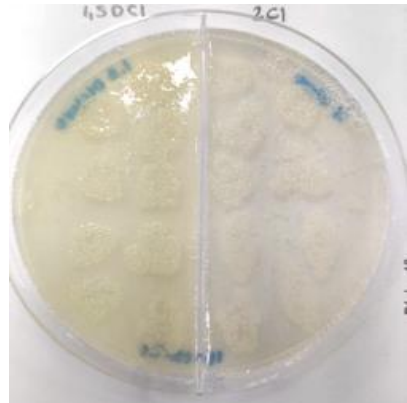
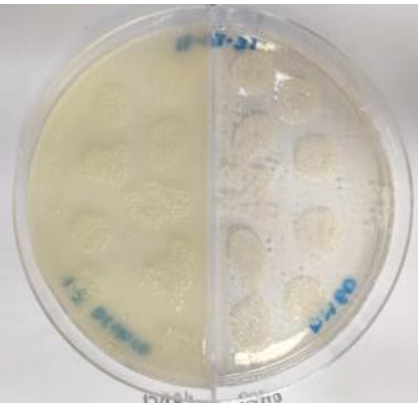
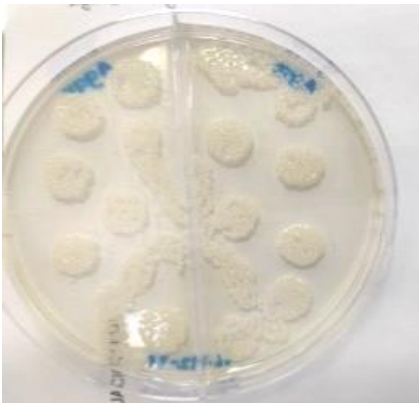
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
		
1.8 Dihidroxi antraquinona Antraquinona	1 Cloro antraquinona 1.5 Dihidroxi antraquinona	1.5 Dinitro antraquinona 1.8-dihidroxi- 4.5-dinitroantraquinona
		
1.5 Dicloro antraquinona 2 Cloro antraquinona	1.8 Dicloro antraquinona DMSO	Agar

Figura 3: Evaluación por macrodilución de las antraquinonas frente a *Klebsiella pneumoniae*.

Evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas combinadas con ciprofloxacina

El siguiente experimento fue realizado con la finalidad de evaluar si la combinación de ciprofloxacina con las antraquinonas puede recuperar el efecto del antibiótico en las bacterias. Como se muestra en la figura 4 y 5, tanto para *E. coli* y *K. pneumoniae*

el resultado fue negativo, indicando que no existe sinergismo de las antraquinonas con la ciprofloxacina a las concentraciones probadas, en combinación con ciprofloxacina. Los experimentos fueron comprobados ya que se realizaron por triplicado para las dos bacterias.

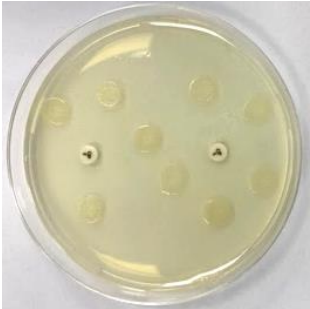
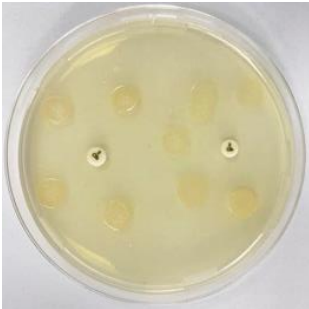
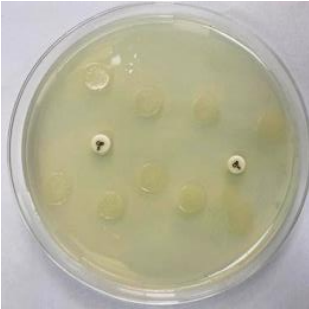
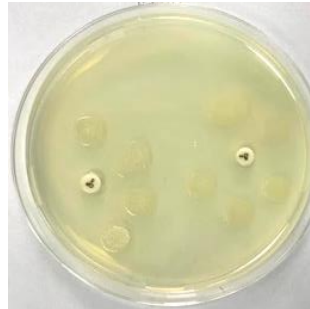
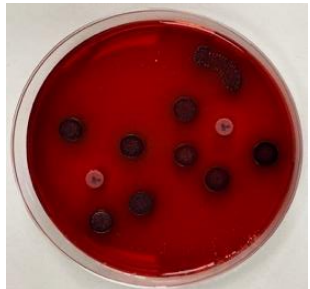
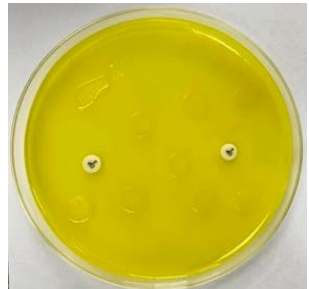


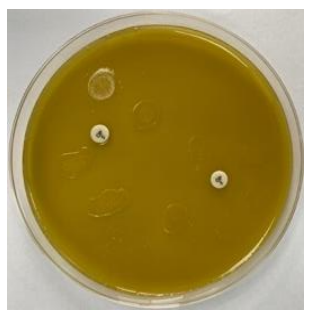
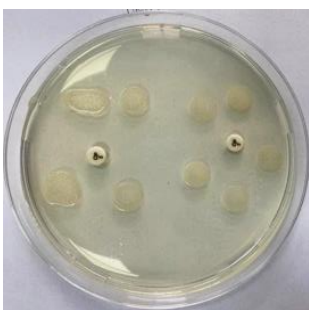
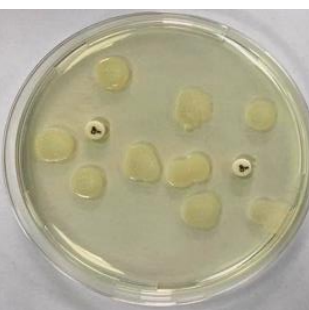
<i>Escherichia coli</i>			
			
Antraquinona	1.5 Dinitro antraquinona	1.8 Dicloro antraquinona	1.5 Dicloro antraquinona
			
1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona	1.8 Dihidroxi antraquinona	1 Cloro antraquinona	2 Cloro antraquinona
			
1.5 Dihidroxi antraquinona	DMSO	Agar	

Figura 3: Evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas con ciprofloxacina en *Escherichia coli*.


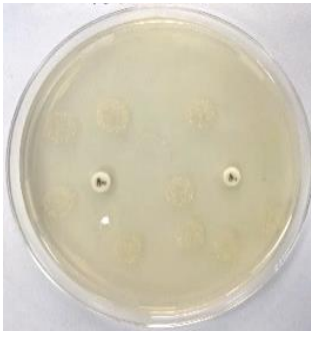
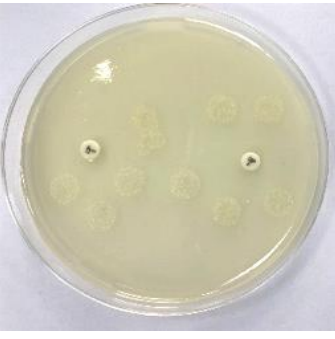
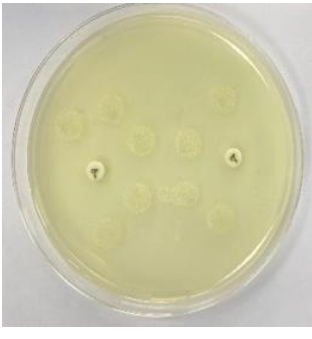
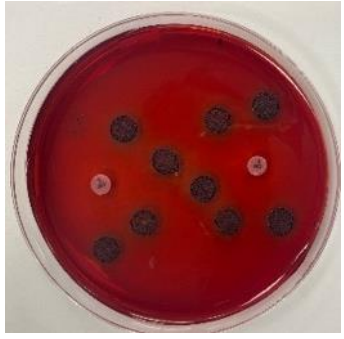

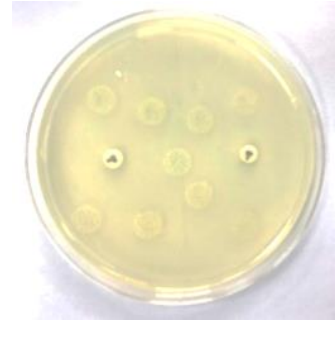


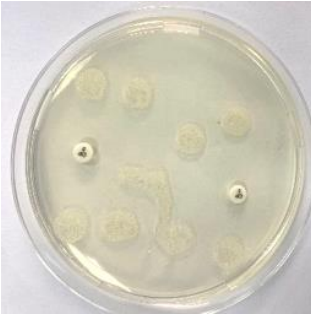
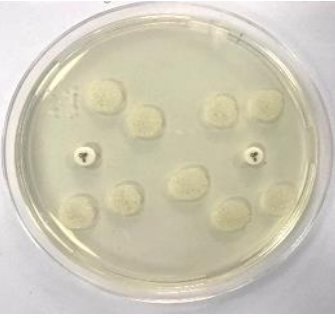
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
			
Antraquinona	1.5 Dinitro antraquinona	1.8 Dicloro antraquinona	1.5 Dicloro antraquinona
			
1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona	1.8 Dihidroxiantraquinona	1 Cloro antraquinona	2 Cloro antraquinona
			
1.5 Dihidroxi antraquinona	DMSO	Agar	

Figura 4: Evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas con ciprofloxacina en *Klebsiella pneumoniae*.

Evaluación del efecto sinérgico de antraquinonas sintéticas en combinación con antibióticos tradicionales

El último experimento se realizó, en vista de que los resultados con ciprofloxacina fueron negativos, se decidió probar si estas antraquinonas podían sensibilizar a estas bacterias frente a otros antibióticos a los que ellas presentaban resistencia. A partir de los resultados del antibiograma previamente mencionado, se decidió seleccionar la colonia número 1 de *E. coli*, que presentaba resistencia a la ampicilina (figura 6).

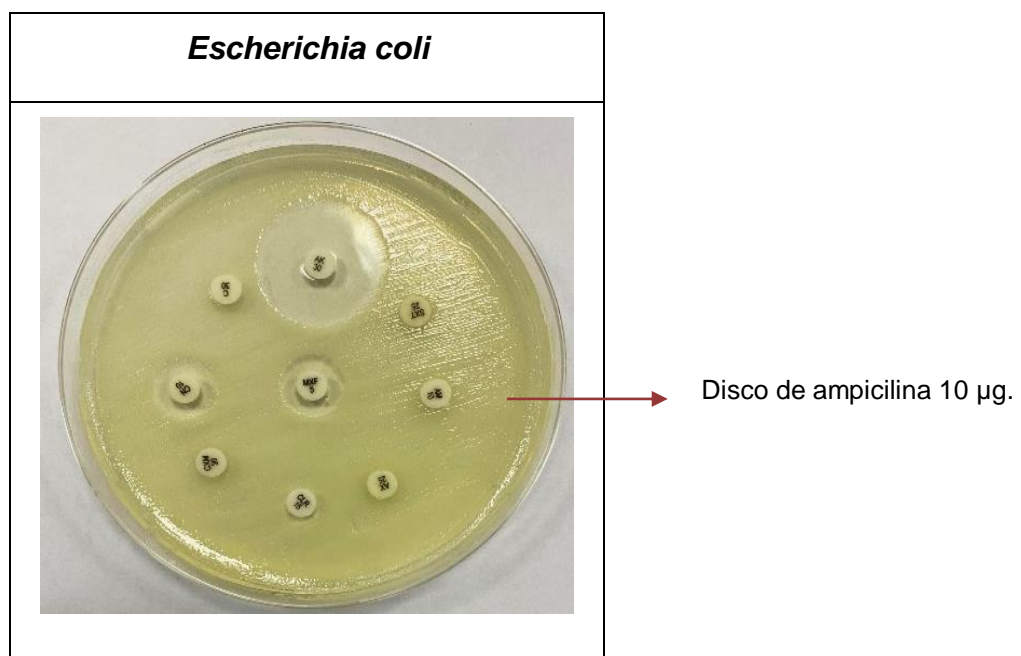


Figura 5: Colonia número 1 seleccionada de *Escherichia coli* con resistencia a ampicilina, en donde la flecha señala el disco de ampicilina. Los discos corresponden a: AM: ampicilina, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, AK: amikacina, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, CXM: cefuroxima, CLR: claritromicina, AX: amoxicilina y MXF: moxifloxacina.

Los resultados que se encuentran en la figura 7, revelan que entre todas las antraquinonas que fueron probadas, la antraquinona 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona (250 µg/mL) permitió generar un halo de inhibición con ampicilina (10 µg), resultado que sugiere que esta antraquinona es capaz de sensibilizar a *E. coli* frente a ampicilina 10 µg. Por otro lado, ninguna de las antraquinonas restantes mostró una actividad similar.

Los experimentos fueron realizados por triplicado para comprobar los resultados obtenidos.

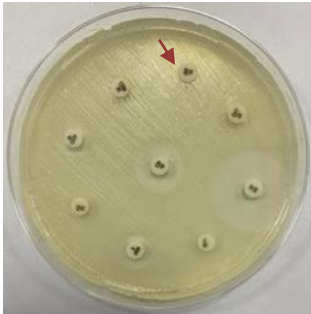
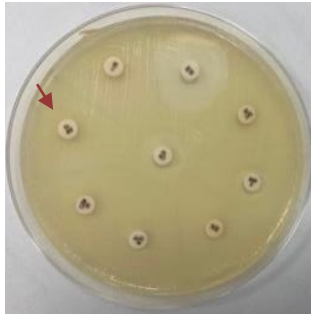
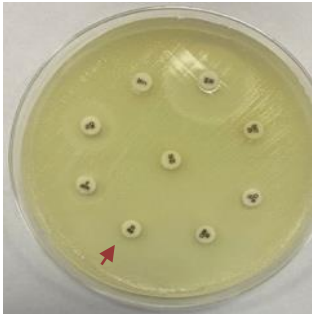
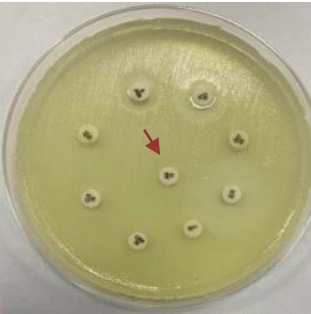
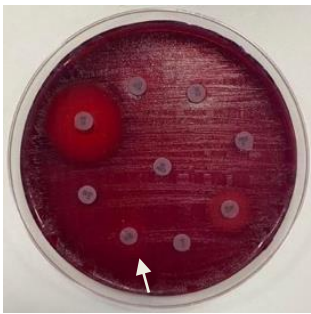
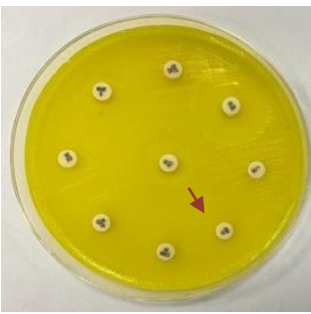
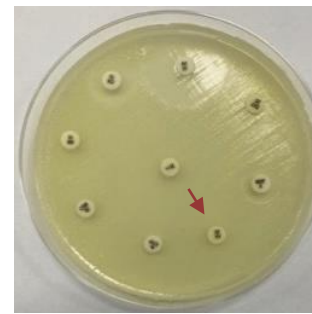
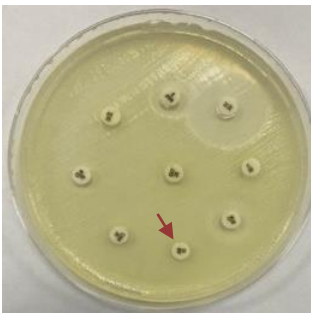
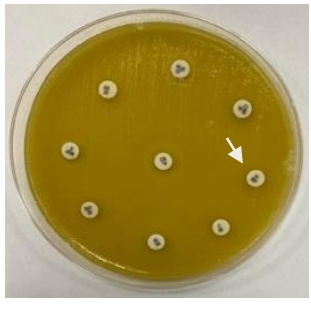
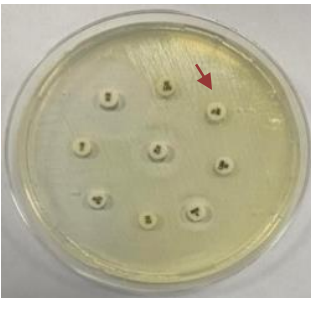

<i>Escherichia coli</i>			
			
Antraquinona	1.5 Dinitro antraquinona	1.8 Dicloro antraquinona	1.5 Dicloro antraquinona
			
1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona	1.8 Dihidroxi antraquinona	1 Cloro antraquinona	2 Cloro antraquinona
			
1.5 Dihidroxi antraquinona	DMSO	Agar	

Figura 6: Evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas con antibióticos tradicionales en *Escherichia coli*, en en el cual las flechas indican donde se encuentra el disco de AM: ampicilina. Los discos corresponden a: SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, AK: amikacina, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, CXM: cefuroxima, CLR: claritromicina, AX: amoxicilina y MXF: moxifloxacina.

A partir del resultado anterior, el siguiente paso fue incrementar la concentración de esta antraquinona, para saber si al incrementar las concentraciones presenta un mayor efecto sensibilizante.

En la figura 8 y en la tabla 1, se observa los resultados de este experimento, los cuales revelan que con 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la antraquinona 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona con ampicilina 10 μg se presenta un halo de inhibición de 11 mm. Interesantemente a concentraciones mayores no se observó efecto sensibilizante.

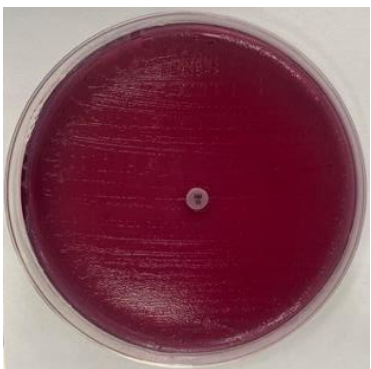
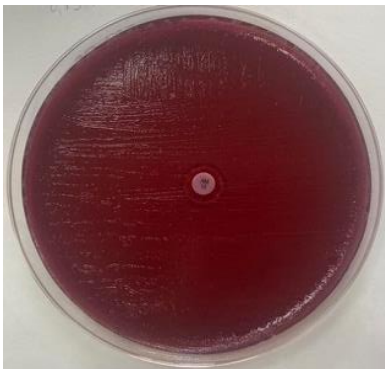
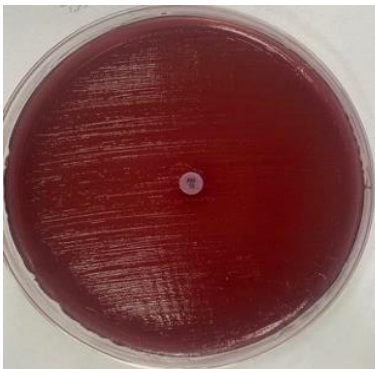
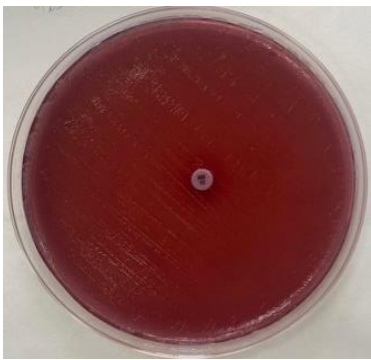
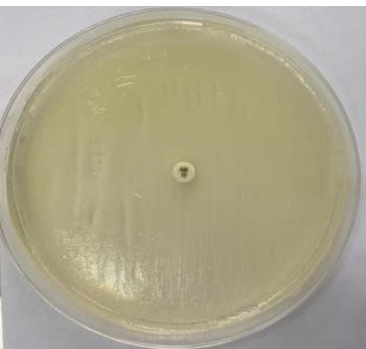
<i>Escherichia coli</i>: 1.8-dihidroxi- 4.5-dinitroantraquinona		
		
1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	750 $\mu\text{g}/\text{mL}$	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
		
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$	DMSO	

Figura 7: Experimento de 1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona a diferentes concentraciones junto con ampicilina frente a Escherichia coli.

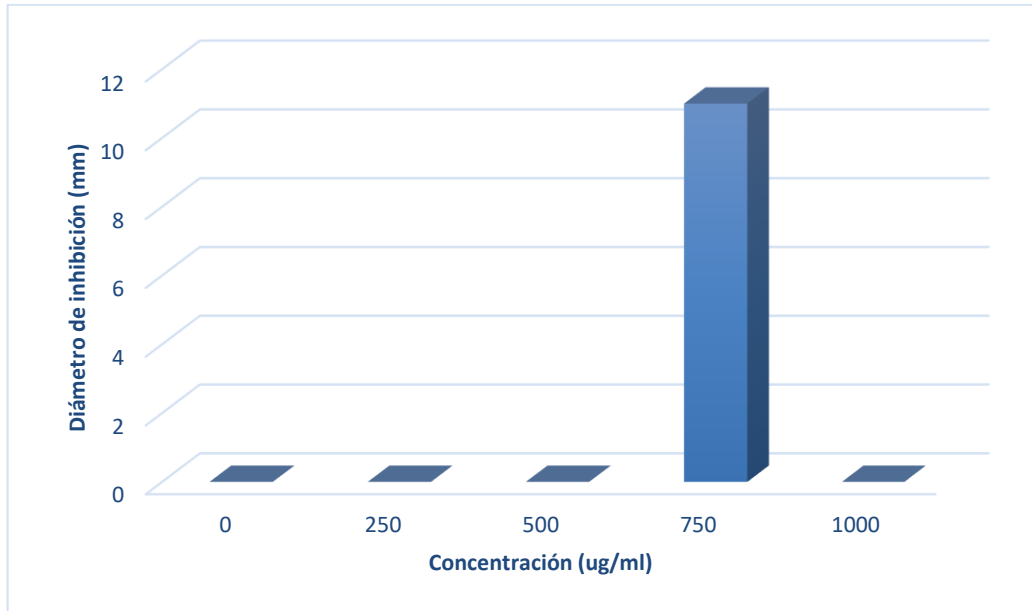


Tabla 1: Diámetro de inhibición del crecimiento de *E. coli* provocado por discos de ampicilina (10 µg) en combinación con 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona. Las barras representan la media de tres experimentos independientes.

Por otra parte, se efectuó el mismo procedimiento con *K. pneumoniae*, se seleccionó la colonia número 10, sin embargo, en este caso no presentó sensibilidad a la ampicilina como se muestra en la figura 9.

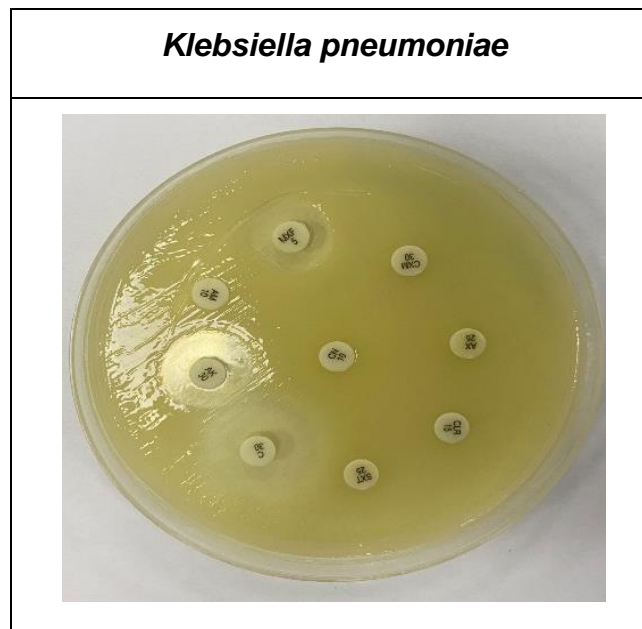
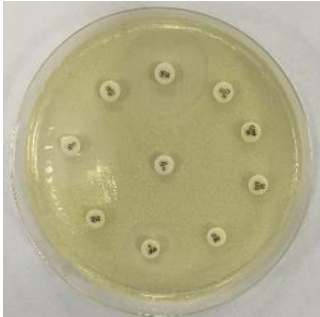
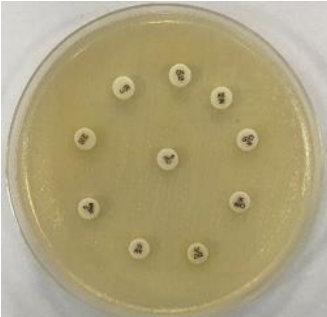
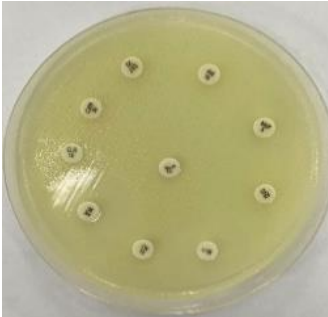
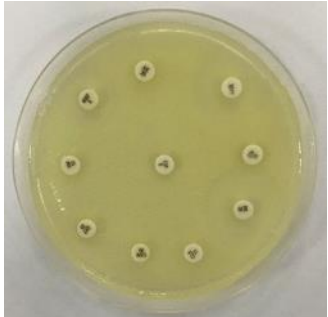
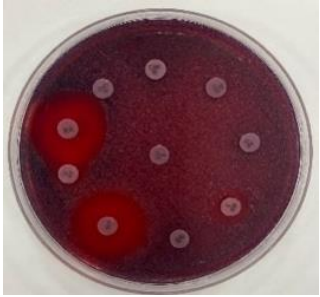
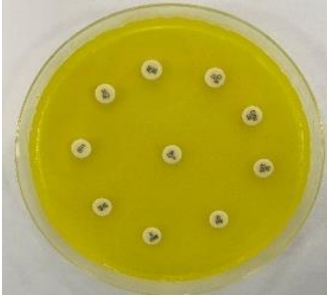
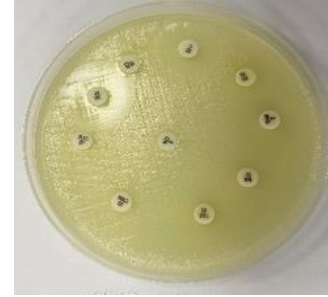
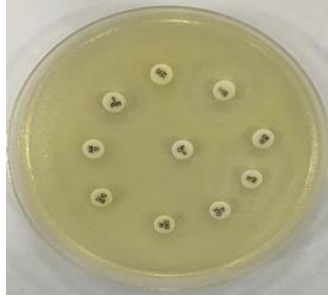


Figura 9: Colonia número 10 seleccionada de *Klebsiella pneumoniae* junto con discos de antibióticos. Los discos corresponden a: AM: ampicilina, SXT: trimetoprima-sulfametoxazol, AK:

amikacina, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, CXM: cefuroxima, CLR: claritromicina, AX: amoxicilina y MXF: moxifloxacina.

Como se observa en la figura 10 los resultados en este caso no presentaron efecto sensibilizante de ninguna antraquinona en combinación con los nueve antibióticos seleccionados.

Experimento que se realizó por triplicado de esta manera comprobando los resultados mencionados.

<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
			
Antraquinona	1.5 Dinitro antraquinona	1.8 Dicloro antraquinona	1.5 Dicloro antraquinona
			
1.8-dihidroxi-4.5-dinitroantraquinona	1.8 Dihidroxiantraquinona	1 Cloro antraquinona	2 Cloro antraquinona

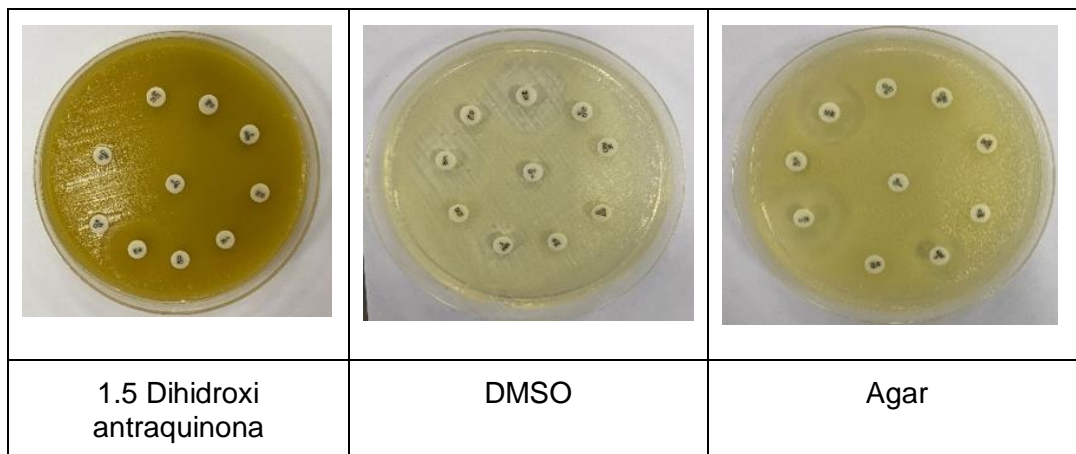


Figura 10: Evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas con antibióticos tradicionales en *Klebsiella pneumoniae*. Los discos corresponden a: AM: ampicilina, SXT: trimetroprima-sulfametoxazol, AK: amikacina, C: cloranfenicol, CN: gentamicina, CXM: cefuroxima, CLR: claritromicina, AX: amoxicilina y MXF: moxifloxacina.

III. DISCUSIÓN

Debido a que la mayoría de infecciones causadas por microorganismos resistentes a antibióticos tienen como principales protagonistas a las bacterias Gram-negativas, especialmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, es que varias investigaciones a nivel mundial buscan nuevos compuestos antibacterianos (117). En este contexto, se ha considerado importante para el presente trabajo evaluar nueve antraquinonas sintéticas frente a 10 cepas aisladas de *E. coli* y *K. pneumoniae*.

En los experimentos realizados para la evaluación del efecto antimicrobiano de las antraquinonas por el método de Kirby-Bauer y macrodilución, no se observó inhibición del crecimiento de ninguna de las antraquinonas sobre las bacterias seleccionadas. Mientras que, Yan-Wen WU. et. al. indican que la 1,8-dihidroxi-antraquinona, emodina y la reína tienen la capacidad de inhibir *S. aureus*, para ello emplearon el método de flujo detenido en la medición microcalorimétrica, la bacteria se colocó en un medio de cultivo con peptona y su crecimiento se visualizó a 37°C (118). Por lo tanto, dan a conocer que la combinación de las dos antraquinonas mencionadas presentaron efecto antibacteriano frente a una bacteria diferente.

En el artículo de Yan-Wen WU. et. al. indican que se inhibió el crecimiento de *S. aureus* a diferentes concentraciones en de los compuestos, con la emodina se empleó 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en la reína 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con 1,8-dihidroxi-antraquinona utilizaron 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (118).

Este resultado es interesante en comparación del presente trabajo que no presentó efecto alguno con la antraquinona mencionada, esto debido a que se utilizó una concentración de 250 μL , por lo tanto, en el trabajo de Yan-Wen WU. et. al. realizaron el experimento con una mayor concentración en comparación del trabajo realizado, por lo que se considera un resultado relevante.

Al igual que, en un artículo de Manal M. et al. explican los derivados de *Rhamus cathartica*, en este caso realizaron cromatografía en columna de gel de sílice repetida para la obtención de una nueva antraquinona denominada 1,8-dihidroxi-2-[(z)-4-metilpenta-1,3-dien-1-il] antraquinona, la cual presentó un efecto inhibitorio frente a *E. coli* y *S. aureus*, al igual que la emodina dio como resultado la misma actividad antibacteriana (119).

Para ese experimento emplearon el método de Kirby-Bauer, en donde utilizaron discos de papel filtro de 0,5 cm de diámetro a los que se le colocó 1 mg del extracto de metanol de la planta y compuestos puros aislados adicionando 100 μg de la muestra, para lo cual se obtuvieron los resultados mencionados (119), lo que da a conocer que otros tipos de antraquinonas tienen efecto antibacteriano frente a una de las bacterias seleccionadas en el experimento.

De igual manera, existen otros estudios que indican efecto de varios tipos de antraquinonas frente a bacterias, como es el caso de un experimento realizado por Mohanlall V y Odhav B, dan a conocer que la 9,10-antracenediona y 1-hidroxi-4-metil-antraquinona presentaron actividad antibacteriana frente a *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para lo cual al igual que el experimento anterior utilizaron el método de Kirby-Bauer, se colocaron 50 μL de los compuestos en discos de papel filtro de 5 mm, posterior estos discos se

colocaron sobre las placas bacterianas incubándolas a 37°C por 24 horas (120), es un resultado relevante para inhibir las bacterias seleccionadas.

Así mismo, existen estudios en los que se ha demostrado que la emodina tiene efectos antibacterianos frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como indican Leonidah K. et al. en su estudio demostraron que la emodina 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona presentó actividad bacteriana mínima frente a cepas multirresistentes de *E. coli* y *K. pneumoniae*, este compuesto natural se aisló de plantas kenianas, para determinar el CMI de las bacterias. Emplearon un ensayo colorimétrico rápido, para lo cual diluyeron las muestras de prueba con el antibiótico de referencia en caldo de dimetilsulfóxido (DMSO) / Müller – Hinton Broth (MHB) (121).

Posteriormente añadieron 100 µL del inóculo preparado en una microplaca de 96 pozos, la mezcla fue agitada e incubada a 37°C por 18 horas y presentó valores de CMI de 128 µg/mL para las dos bacterias (121).

Por otra parte, en la evaluación del efecto sinérgico de las antraquinonas frente a ciprofloxacina, no se evidenció este efecto de ninguna de las antraquinonas combinadas con ciprofloxacina. Hasta donde llega nuestro conocimiento obtenido de la bibliografía no existen estudios de antraquinonas en combinación con ciprofloxacina sobre *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Otros estudios, como el de Young S. et al. encontraron que la emodina 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona con amoxicilina y oxacilina presenta un efecto sinérgico frente a cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina, emplearon el método de difusión de disco de papel, en el cual colocaron 20µL de emodina en el disco de papel filtro, las concentraciones variaban de 10 a 50 µL por disco, la misma que estaba disuelta en DMSO, posterior colocaron el agar Müller – Hinton en cajas petri adicionando 100 µL de la suspensión de bacterias y se incubaron a 37°C por 24 horas (122).

Al evaluar el efecto sinérgico de las antraquinonas con nueve antibióticos tradicionales en las bacterias usadas en el presente estudio, se observó que la 1,8-

dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona sensibiliza a *E. coli* frente a la ampicilina. Estos resultados muestran que los grupos nitro localizados en las posiciones 4 y 5 en la estructura de la 1,8-dihidroxiantraquinona son los responsables de generar este efecto antibacteriano ya que esta antraquinona solo con grupos hidroxilo no presenta este efecto. Por otro lado, los grupos nitro localizados en otras posiciones como en la 1,5 dinitroantraquinona no generan ningún efecto.

Con relación a los grupos cloro en las distintas posiciones de las antraquinonas seleccionadas para este estudio no muestran ningún efecto sobre estas bacterias. Sin embargo, un estudio de Duan F. et al. en un experimento con la emodina y la 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (CE) de cloruro natural de hongos y líquenes, explican que la emodina clorada (CE) presenta más eficacia que la emodina ya que inhibe mejor las bacterias Gram-positivas utilizando menor concentración del compuesto, como es el caso de *S. aureus* que la inhibe en concentraciones de 16 μL en comparación de la emodina que alcanzó hasta 256 μL , de igual manera en *E. faecalis* la primera inhibió a 256 μL mientras que la segunda $>256 \mu\text{L}$, desafortunadamente no tiene un efecto satisfactorio en Gram-negativas. Para este estudio, diluyeron la emodina y la CE en DMSO, mientras que, para determinar el CMI se empleó el método de microdilución de agar, obteniendo mejores resultados de la emodina clorada (20).

El trabajo es relevante en comparación del experimento realizado en esta investigación, en el cual se empleó dos antraquinonas cloradas, como es 1-cloroantraquinona y 2-cloroantraquinona, desafortunadamente no dio algún efecto significativo frente a las bacterias seleccionadas. Pero es importante mencionar que en el estudio de Duan F. et. al. obtuvieron que para *E. coli* se necesitó concentraciones $>256 \mu\text{L}$ de la emodina clorada, en comparación de este experimento que se empleó 250 μL como concentración de las antraquinonas, lo que indica que para que las antraquinonas cloradas tengan la capacidad de inhibir a la bacteria mencionada se requieren de concentraciones mayores a las empleadas.

Interesantemente, no existen reportes en la literatura sobre ningún tipo de efecto antibacteriano o sensibilizador de esta antraquinona. Por otro lado, un estudio de Huang SW. et al. revela que la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona es capaz de interferir con la angiogénesis tumoral, por lo que podría ser una molécula prometedora para el desarrollo de potenciales antitumorales (123) ya que, revela que tiene actividad anticancerígena.

Es importante mencionar, que no existen estudios previos con algunas de las antraquinonas empleadas en este experimento frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, como ya se ha indicado en el caso de la antraquinona 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona, por lo que destaca la importancia del análisis para futuros experimentos.

CAPÍTULO IV
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

IV.1.- CONCLUSIONES

Una vez realizada la respectiva investigación con el objetivo de evaluar los efectos antibacterianos de antraquinonas sintéticas, solas o combinadas con ciprofloxacina sobre cepas aisladas de *K. pneumoniae* y *E. coli* se llega a las siguientes conclusiones:

- Se comparó los efectos antibacterianos de las antraquinonas, antraquinona, 1,5-dihydroxiantraquinona, 1,8-dihydroxiantraquinona, 1,5-dinitroantraquinona, 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona, 1-cloroantraquinona, 2-cloroantraquinona, 1,5-dicloroantraquinona y 1,8-dicloroantraquinona sobre las cepas bacterianas aisladas resistentes a ciprofloxacina el cual no presentaron efecto antimicrobiano a distintas concentraciones.
- Por último, se identificó las combinaciones de antraquinonas con ciprofloxacina con mayor actividad sobre las cepas bacterianas resistentes a ciprofloxacina, por lo que no existió sinergismo de las antraquinonas con ciprofloxacina a las concentraciones probadas.

Pese a los resultados negativos, se evaluó el efecto sinérgico de las antraquinonas en combinación con antibióticos tradicionales por lo que la antraquinona 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona mostró un efecto sensibilizante frente a *E. coli*.

IV.2.- RECOMENDACIONES

Una vez obtenida las conclusiones, se procede a redactar las recomendaciones en base a los experimentos que se realizaron en el presente trabajo:

- Se deberían estudiar otro tipo de antraquinonas frente a *E. coli* y *K. pneumoniae* ya que es posible que puedan inhibir su crecimiento.
- Evaluar en otro tipo de bacterias que sean resistentes a ciprofloxacina, la capacidad de inhibir en combinación con las antraquinonas que se emplearon en este experimento.
- Es importante también tomar en consideración a la 1,8-dihidroxi-4,5-dinitroantraquinona para estudios posteriores en donde se empleen otro tipo de bacterias que presenten relevancia al causar enfermedades en la actualidad.
- También se podrían estudiar antraquinonas similares a las utilizadas en este experimento, con el fin de que al tener diferente estructura química pueda ser la clave de que presenten efectos terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Asadi A, Razavi S, Talebi M, Gholami M. A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection*. febrero de 2019;47(1):13–23.
2. González Mendoza J, Maguiña Vargas C, González Ponce F de M. La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peru*. abril de 2019;36(2):145–51.
3. Díaz Q P, Bello T H, Domínguez Y M, Trabal F N, Mella M S, Zemelman Z R, et al. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Médica Chile*. octubre de 2004;132(10):1173–8.
4. Betrán A, Lavilla MJ, Cebollada R, Calderón JM, Torres L, Betrán A, et al. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016-2018. *Rev Clínica Med Fam*. 2020;13(3):198–202.
5. Greco G, Turrini E, Catanzaro E, Fimognari C. Marine Anthraquinones: Pharmacological and Toxicological Issues. *Mar Drugs*. mayo de 2021;19(5):272.
6. Xin D, Li H, Zhou S, Zhong H, Pu W. Effects of Anthraquinones on Immune Responses and Inflammatory Diseases. *Molecules*. enero de 2022;27(12):3831.
7. Carpio Arévalo JM, Feuser PE, Rossi GR, Trindade ES, da Silva Córneo E, Machado-de-Ávila RA, Sayer C, Cadena SMSC, Noletto GR, Martinez GR, Hermes de Araújo PH, Merlin Rocha ME. Preparation and characterization of 4-nitrochalcone-folic acid-poly(methyl methacrylate) nanocapsules and cytotoxic activity on HeLa and NIH3T3 cells. *J Drug Deliv Sci Technol* 2019; 54: 101300. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101300>.
8. Feuser PE, Arévalo JMC, Junior EL, Rossi GR, da Silva Trindade E, Rocha MEM, Jacques AV, Ricci-Júnior E, Santos-Silva MC, Sayer C, de Araújo PHH. Increased cellular uptake of lauryl gallate loaded in superparamagnetic poly(methyl methacrylate) nanoparticles due to surface modification with folic acid. *J Mater Sci Mater Med* 2016; 27:185. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10856->

016-5796-0.

9. Feuser PE, Jacques AV, Arévalo JMC, Rocha MEM, dos Santos-Silva MC, Sayer C, de Araújo PHH. Superparamagnetic poly(methyl methacrylate) nanoparticles surface modified with folic acid presenting cell uptake mediated by endocytosis. *J Nanoparticle Res* 2016; 18: 1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3406-1>.
10. Wei Y, Liu Q, Yu J, Feng Q, Zhao L, Song H, et al. Antibacterial mode of action of 1,8-dihydroxy-anthraquinone from *Porphyra haitanensis* against *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Res*. 2015;29(10):976–9.
11. Duraipandiyan V, Al-Dhabi NA, Ignacimuthu S. New antimicrobial anthraquinone 6,61-bis (1,5,7-trihydroxy-3-hydroxymethylanthraquinone) isolated from *Streptomyces* sp. isolate ERI-26. *Saudi J Biol Sci*. el 1 de noviembre de 2016;23(6):731–5.
12. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. el 1 de enero de 2019;19(1):56–66.
13. Salles MJC, Zurita J, Mejía C, Villegas MV. Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiol Infect*. diciembre de 2013;141(12):2459–72.
14. Bruzzese E, Giannattasio A, Guarino A. Antibiotic treatment of acute gastroenteritis in children. *F1000Research*. el 15 de febrero de 2018;7:193.
15. Arévalo JMC, Amorim JC. Virtual screening, optimization and molecular dynamics analyses highlighting a pyrrolo[1,2-a]quinazoline derivative as a potential inhibitor of DNA gyrase B of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep* 2022; 12: 1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08359-x>.
16. Carpio Arévalo JM, Amorim JC. The Alpha-Naphthoflavone as a Novel Scaffold for the Design of Potential Inhibitors of APH(3')-IIIa of *Enterococcus*

Faecalis: An In-Silico Study [Internet]. Rochester, NY; 2022 [citado el 17 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4206708>

17. Arévalo JMC, Amorim JC. Natural products as Potential Inhibitors of APH(3')-IIIa of *Enterococcus faecalis*: An In-silico Perspective [Internet]. Preprints; 2022 [citado el 17 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.preprints.org/manuscript/202211.0132/v1>

18. Kaur CP, Vadivelu J, Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *J Dig Dis*. mayo de 2018;19(5):262–71.

19. Dulo B, Phan K, Githaiga J, Raes K, De Meester S. Natural Quinone Dyes: A Review on Structure, Extraction Techniques, Analysis and Application Potential. *Waste Biomass Valorization*. el 1 de diciembre de 2021;12(12):6339–74.

20. Duan F, Xin G, Niu H, Huang W. Chlorinated emodin as a natural antibacterial agent against drug-resistant bacteria through dual influence on bacterial cell membranes and DNA. *Sci Rep*. el 5 de octubre de 2017;7:12721.

21. Balachandran C, Arun Y, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S, Balakrishna K, Al-Dhabi NA. Antimicrobial and cytotoxicity properties of 2,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone isolated from *Streptomyces galbus* (ERINLG-127). *Appl Biochem Biotechnol*. abril de 2014;172(7):3513–28.

22. Hooper DC. New uses for new and old quinolones and the challenge of resistance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. febrero de 2000;30(2):243–54.

23. García-Sosa K, Villarreal-Alvarez N, Lübben P, Peña-Rodríguez LM. Chrysophanol, an Antimicrobial Anthraquinone from the Root Extract of *Colubrina greggii*. *J Mex Chem Soc*. junio de 2006;50(2):76–8.

24. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*. el 23 de marzo de 2022;11(4):427.

25. WHO model list of essential medicines - 22nd list, 2021 [Internet]. [citado el

14 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>

26. Silva F, Lourenço O, Queiroz JA, Domingues FC. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *J Antibiot (Tokyo)*. abril de 2011;64(4):321–5.

27. Belley A, Neesham-Grenon E, Arhin FF, McKay GA, Parr TR, Moeck G. Assessment by Time-Kill Methodology of the Synergistic Effects of Oritavancin in Combination with Other Antimicrobial Agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. octubre de 2008;52(10):3820–2.

28. Song ZM, Zhang JL, Zhou K, Yue LM, Zhang Y, Wang CY, et al. Anthraquinones as Potential Antibiofilm Agents Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol*. 2021;12:709826.

29. Liu J, Du SX, Zhang JN, Liu SH, Zhou YY, Wang XR. Spreading of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 in patients with pneumonia: a molecular epidemiological study. *Chin Med J (Engl)*. el 20 de agosto de 2019;132(16):1894–902.

30. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga: el desafío de adherirse para sobrevivir - ScienceDirect [Internet]. [citado el 27 de septiembre de 2022]. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754122000268#bib0600>

31. Margall N, Domínguez À, Prats G, Salleras L. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Rev Esp Salud Pública*. septiembre de 1997;71(5):437–43.

32. Bhavnani D, Bayas R de los Á, Lopez VK, Zhang L, Trueba G, Foxman B, et al. Distribution of Enteroinvasive and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Across Space and Time in Northwestern Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*. febrero de 2016;94(2):276–84.

33. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*. septiembre de 2002;44(5):464–75.

34. Espino DV, Díaz JS, Díaz RYS. *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de alta prioridad para la fabricación de nuevos antibióticos. *Rev Médica Electrónica*. 2018;40(4):1271–3.
35. Durão P, Balbontín R, Gordo I. Evolutionary Mechanisms Shaping the Maintenance of Antibiotic Resistance. *Trends Microbiol*. agosto de 2018;26(8):677–91.
36. León-Rosales SP de, Arredondo-Hernández R, López-Vidal Y. La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. *Gac Médica México*. el 15 de septiembre de 2015;151(5):681–9.
37. Malik EM, Müller CE. Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs. *Med Res Rev*. julio de 2016;36(4):705–48.
38. Li JL, Jiang X, Liu X, He C, Di Y, Lu S, et al. Antibacterial anthraquinone dimers from marine derived fungus *Aspergillus* sp. *Fitoterapia*. marzo de 2019;133:1–4.
39. Wisetsai A, Lekphrom R, Schevenels FT. New anthracene and anthraquinone metabolites from *Prismatomeris filamentosa* and their antibacterial activities. *Nat Prod Res*. mayo de 2021;35(10):1582–9.
40. da Silva RE, Ribeiro F de OS, de Carvalho AMA, Daboit TC, Marinho-Filho JDB, Matos TS, et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of the benzoquinone oncocalyxone A. *Microb Pathog*. el 1 de diciembre de 2020;149:104513.
41. Ortega González LM, Marrero Martínez O, Valdés Casanova J, Baly Gil A, Verdasquera Corcho D. Infecciones bacterianas y patógenos relacionados en pacientes cubanos con virus de inmunodeficiencia humana, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, 2014-2017. *Rev Cuba Salud Pública*. el 7 de mayo de 2021;46:e2574.
42. OPS/OMS - Síndrome hemolítico urémico e infección por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) [Internet]. [citado el 14 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=list&slug=sindro

- me-hemolitico-uremico-e-infeccion-por-e-col-3627&Itemid=270&lang=fr#gsc.tab=0
43. E. coli [Internet]. [citado el 14 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
 44. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. Salud Pública México. octubre de 2007;49:376–86.
 45. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. Salud Pública México [Internet]. septiembre de 2002 [citado el 24 de noviembre de 2022];44(5). Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 46. Ríos-Muñiz D, Cerna-Cortés JF, Morán-García N, Meza-Segura M, Estrada-García T, Ríos-Muñiz D, et al. Escherichia coli enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. Gac Médica México. agosto de 2019;155(4):410–6.
 47. Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, et al. Diarrheagenic Escherichia coli. Braz J Microbiol. el 1 de diciembre de 2016;47:3–30.
 48. Holland MS, Nobrega D, Peirano G, Naugler C, Church DL, Pitout JDD. Molecular epidemiology of Escherichia coli causing bloodstream infections in a centralized Canadian region: a population-based surveillance study. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. noviembre de 2020;26(11):1554.e1-1554.e8.
 49. Echeverri Toro LM, Cataño Correa JC. Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. Iatreia. septiembre de 2010;23(3):240–9.
 50. Lespada MI, Córdova E, Roca V, Gómez N, Badía M, Rodríguez C. Bacteriemia por Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC. Estudio comparativo y evolución en 7 años. Rev Esp Quimioter. febrero de

2019;32(1):15–21.

51. Espino D, Sosa Díaz J, Sosa Díaz RY. *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de alta prioridad para la fabricación de nuevos antibióticos. *Rev Médica Electrónica*. agosto de 2018;40(4):1271–3.

52. Toro LME, Vargas JAL. *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Iatreia*. 2010;23(2):157–65.

53. *gaceta_ram2018.pdf* [Internet]. [citado el 14 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf

54. Ruhai R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res*. el 1 de octubre de 2021;251:126829.

55. Riley LW. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli**. *Microbiol Spectr*. el 31 de diciembre de 2020;8(4):8.4.1.

56. Jang J, Hur HG, Sadowsky M j., Byappanahalli M n., Yan T, Ishii S. Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol*. 2017;123(3):570–81.

57. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. marzo de 2010;8(3):207–17.

58. Metabolismo microbiano | Microbiología médica, 27e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. [citado el 19 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1837§ionid=128956153#1129190510>

59. García M, C M. *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido: resistencia. *Sanid Mil*. diciembre de 2013;69(4):244–8.

60. Chong Y, Shimoda S, Shimono N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol*. el 1 de julio de 2018;61:185–8.

61. Aguilar-Zapata D. E. coli BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Médica Sur.* el 15 de agosto de 2016;22(2):57–63.
62. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol.* el 2 de abril de 2012;3:110.
63. Paciel DD, Seija V, Prieto J, Vignoli R, Medina J. Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). :9.
64. Bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC. Estudio comparativo y evolución en 7 años - PMC [Internet]. [citado el 24 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6372954/>
65. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Rev Chil Infectol.* octubre de 2017;34(5):476–84.
66. Pachay Solórzano JW. Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. *Rev Univ Soc.* diciembre de 2018;10(5):219–23.
67. Espinal PA, Mantilla JR, Saavedra CH, Leal AL, Alpuche C, Valenzuela EM. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica.* septiembre de 2004;24(3):252–61.
68. Tombo CL, Hernández MF, Rodríguez IG, Macías JCY, González DT, Rayas YL. Caracterización de pacientes con fibrosis quística en consulta multidisciplinaria. *Characterization of Patients with Cystic Fibrosis in Multidisciplinary Consultation.* 2020;
69. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:4.
70. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado el 14 de septiembre de

2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

71. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. Escherichia coli in Europe: An Overview. *Int J Environ Res Public Health*. diciembre de 2013;10(12):6235–54.

72. Lee DS, Lee SJ, Choe HS. Community-Acquired Urinary Tract Infection by Escherichia coli in the Era of Antibiotic Resistance. *BioMed Res Int*. 2018;2018:7656752.

73. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [citado el 18 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

74. Bermejo J, Bencomo B, Arnesi N, Lesnaberes P, Borda N, Notario R. Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalencia de Klebsiella pneumoniae productora de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Chil Infectol*. diciembre de 2006;23(4):316–20.

75. De la Parte-Pérez MA, Brito A, Guzmán M, Carmona O. Resistencia de Klebsiella pneumoniae a los antimicrobianos en Venezuela: Análisis de una década. *Rev Soc Venez Microbiol*. julio de 2001;21(2):14–22.

76. Santos Zonta F do N, Roque M da S, Soares da Silva RG, Ritter AG, Jacobsen FT, Santos Zonta F do N, et al. Colonización por ESKAPES y características clínicas de pacientes en estado crítico. *Enferm Glob*. 2020;19(59):214–54.

77. Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang JY. Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol*. el 1 de agosto de 2017;199(6):811–25.

78. De la Parte-Pérez MA, Brito A, Guzmán M, Carmona O. Resistencia de Klebsiella pneumoniae a los antimicrobianos en Venezuela: Análisis de una década. *Rev Soc Venez Microbiol*. julio de 2001;21(2):14–22.

79. Oromí Durich J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Med Integral*. el 1 de diciembre de 2000;36(10):367–70.
80. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. el 1 de enero de 2009;27(1):44–52.
81. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa TJ. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *Escherichia coli* ASOCIADAS A DIARREA. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2011;28(4):648–56.
82. Carpio Arévalo JM, Amorim JC. An in-silico analysis reveals 7,7'-bializarin as a promising DNA gyrase B inhibitor on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Comput Biol Med*. el 1 de agosto de 2021;135:104626. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104626>
83. Pérez N, Pavas N, Rodríguez I. Resistencia a los antibióticos en *Escherichia coli* con beta-lactamasas de espectro extendido en un hospital de la Orinoquia colombiana. *Infectio*. septiembre de 2011;15(3):147–54.
84. Merchán Reyes JJ, Gerardo Ortiz J, Merchán Reyes JJ, Gerardo Ortiz J. Mecanismos de resistencia en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. *Vive Rev Salud*. diciembre de 2021;4(12):9–22.
85. Kennedy-Cuevas CI, Estigarribia-Sanabria GM, Kennedy-Cuevas CI, Estigarribia-Sanabria GM. Perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en una Unidad de Cuidados Intensivos de Paraguay. *Infectio*. junio de 2021;25(2):84–8.
86. Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. :5.
87. Montúfar-Andrade FE, Mesa-Navas M, Aguilar-Londoño C, Saldarriaga-Acevedo C, Quiroga-Echeverr A, Builes-Montaño CE, et al. Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Infectio*. enero de 2016;20(1):17–24.

88. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. el 1 de febrero de 2009;27(2):116–29.
89. Cobos-Trigueros N, Ateka O, Pitart C, Vila J. Macrólidos y cetólidos. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. el 1 de agosto de 2009;27(7):412–8.
90. Aliño Santiago M, López Esquirol J, Navarro Fernández R, Duperval Maletá P. Aminoglucósidos: mirada actual desde su historia. *Rev Cuba Pediatría*. junio de 2007;79(2):0–0.
91. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol | *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. [citado el 17 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-resumen-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-13052338>
92. Tetraciclinas, macrólidos, clindamicina, cloranfenicol, estreptograminas y oxazolidinonas | *Farmacología básica y clínica, 14e* | AccessMedicina | McGraw Hill Medical [Internet]. [citado el 17 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2734§ionid=228358865#1166476517>
93. Arés Álvarez F, Martínez de la Ossa Sáenz-López R, Alfayate Miguélez S, Arés Álvarez F, Martínez de la Ossa Sáenz-López R, Alfayate Miguélez S. Quinolonas en Pediatría. *Pediatría Aten Primaria*. junio de 2017;19(74):e83–92.
94. Baquero-Artigao F, Michavila A, Suárez-Rodríguez Á, Hernandez A, Martínez-Campos L, Calvo C. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica, Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergia Pediátricas, Asociación Española de Pediatría de Atención Primaria y Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria sobre antibioterapia en alergia a penicilina o amoxicilina. *An Pediatría*. febrero de 2017;86(2):99.e1-99.e9.
95. Martín-Aragón S. Antibióticos de última generación. Revisión. *Offarm*. el 1 de diciembre de 2011;30(6):58–63.
96. Chapman TM, Perry CM. Cefepime. *Am J Respir Med*. el 1 de febrero de 2003;2(1):75–107.

97. Morales PAH, Bastos JLG, Marín DG, Londoño LM, Tamayo AH, Cárdenas PAU, et al. Reacciones adversas a betalactámicos: una revisión de tema. *Med UPB*. 2021;40(1):55–64.
98. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachón J. Aminoglucósidos y polimixinas. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. el 1 de marzo de 2009;27(3):178–88.
99. Reacciones adversas causadas por quimioprofilaxis con doxiciclina [Internet]. [citado el 17 de diciembre de 2022]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192018000200006
100. Betancourt YF, Aguilar EC, Cayón RR, Sotomayor DR, Dedieu DM. Utilización de terapéutica antimicrobiana en enfermedades infecciosas. *Rev Inf Científica*. 2015;92(4):930–44.
101. Martín AV, Sendra MV. Reacciones adversas medicamentosas (RAM). *An Real Acad Med Cir Valladolid*. 2018;(55):243–67.
102. Gargantilla Madera P, Belda Bilbao L, García Tobaruela A, Gargantilla Madera P, Belda Bilbao L, García Tobaruela A. Hepatitis aguda medicamentosa. *Rev Clínica Med Fam*. octubre de 2017;10(3):194–6.
103. Amorim JC, Bermeo AEC, Urgilés VEV, León MRM, Carpio Arévalo JM. An in silico evaluation of anthraquinone derivatives as potential inhibitors of DNA gyrase B of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microorganisms* 2022; 10: 2434. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122434>.
104. Adnan M, Rasul A, Hussain G, Shah MA, Sarfraz I, Nageen B, et al. Physcion and Physcion 8-O-β-D-glucopyranoside: Natural Anthraquinones with Potential Anticancer Activities. *Curr Drug Targets*. 2021;22(5):488–504.
105. Moliner ED, Moro S, Sarno S, Zagotto G, Zanotti G, Pinna LA, et al. Inhibition of Protein Kinase CK2 by Anthraquinone-related Compounds: A STRUCTURAL INSIGHT *. *J Biol Chem*. el 17 de enero de 2003;278(3):1831–6.
106. Zhou B, Ji YY, Zhang HJ, Shen L. Gephyyamycin and cysrabelomycin, two new angucyclinone derivatives from the *Streptomyces* sp. HN-A124. *Nat Prod Res*.

el 3 de julio de 2021;35(13):2117–22.

107. Abu-darwish SM, Ateyyat AM. The Pharmacological and Pesticidal Actions of Naturally Occurring 1,8-dihydroxyanthraquinones Derivatives.

108. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics - Dong - 2016 - Phytotherapy Research - Wiley Online Library [Internet]. [citado el 27 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.5631>

109. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis* - ScienceDirect [Internet]. [citado el 27 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462990500044X?via%3Dihub>

110. Zhang L, Song T, Wu J, Zhang S, Yin C, Huang F, et al. Antibacterial and cytotoxic metabolites of termite-associated *Streptomyces* sp. BYF63. *J Antibiot* (Tokyo). noviembre de 2020;73(11):766–71.

111. Alov P, Al Sharif M, Najdenski H, Pencheva T, Tsakovska I, Zaharieva MM, et al. New Potential Pharmacological Targets of Plant-Derived Hydroxyanthraquinones from *Rubia* spp. *Molecules*. enero de 2022;27(10):3274.

112. Fouillaud M, Venkatachalam M, Girard-Valenciennes E, Caro Y, Dufossé L. Anthraquinones and Derivatives from Marine-Derived Fungi: Structural Diversity and Selected Biological Activities. *Mar Drugs*. abril de 2016;14(4):64.

113. Alhadrami HA, Abdulaal WH, Hassan HM, Alhakamy NA, Sayed AM. In Silico-Based Discovery of Natural Anthraquinones with Potential against Multidrug-Resistant *E. coli*. *Pharmaceuticals*. enero de 2022;15(1):86.

114. Borroto J, Trujillo R, Torre YC de la, Waksman N, Hernández M, Salazar R. Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L. *Rev Cuba Plantas Med*. 2011;34–42.

115. Tapia JM. Tipos de Investigación. *Divulg Bol Científico Esc Super Actopan* [Internet]. el 5 de enero de 2014 [citado el 14 de septiembre de 2022];1(1).

Disponible en:

<https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/divulgare/article/view/1580>

116. Ramos-Galarza C. Editorial: Diseños de investigación experimental. *CienciAmérica*. el 24 de febrero de 2021;10(1):1–7.

117. Zabawa TP, Pucci MJ, Parr TR, Lister T. Treatment of Gram-negative bacterial infections by potentiation of antibiotics. *Curr Opin Microbiol*. el 1 de octubre de 2016;33:7–12.

118. Wu YW, Ouyang J, Xiao XH, Gao WY, Liu Y. Antimicrobial Properties and Toxicity of Anthraquinones by Microcalorimetric Bioassay. *Chin J Chem*. 2006;24(1):45–50.

119. Hamed MM, Refahy LA, Abdel-Aziz MS. Evaluation of Antimicrobial Activity of Some Compounds Isolated from *Rhamnus cathartica* L. *Orient J Chem*. el 20 de junio de 2015;31(2):1133–40.

120. 1C731A722744.pdf [Internet]. [citado el 27 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/1C731A722744>

121. Omosa LK, Midiwo JO, Mbaveng AT, Tankeo SB, Seukep JA, Voukeng IK, et al. Antibacterial activities and structure–activity relationships of a panel of 48 compounds from Kenyan plants against multidrug resistant phenotypes. *SpringerPlus*. el 27 de junio de 2016;5(1):901.

122. Lee YS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Keum JH, Kim SB, et al. Synergistic effect of emodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm Biol*. el 1 de noviembre de 2010;48(11):1285–90.

123. Huang SW, Lien JC, Kuo SC, Huang TF. PPemd26, an anthraquinone derivative, suppresses angiogenesis via inhibiting VEGFR2 signalling. *Br J Pharmacol*. 2014;171(24):5728–42.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ATP: Adenosín trifosfato.

BLEE: Betalactamasa de espectro extendido.

CE: Emodina clorada.

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DAEC: *Escherichia coli* de adherencia difusa.

DEC: *Escherichia coli* diarreica.

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa.

E. coli: *Escherichia coli*.

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica.

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasiva.

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*.

EPEC: *Escherichia coli* enteropatógena.

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigénica.

INFOSAN: La Red Internacional de Autoridades de Inocuidad de los Alimentos.

ITU: Infección del tracto urinario.

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*.

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa.

LT: Toxina termolábil.

mL: Mililitros.

MH: Müeller – Hinton.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

SHU: Síndrome hemolítico urémico.

SNC: Sistema nervioso central.

ST: Toxina termoestable.

STX: Toxina Shiga

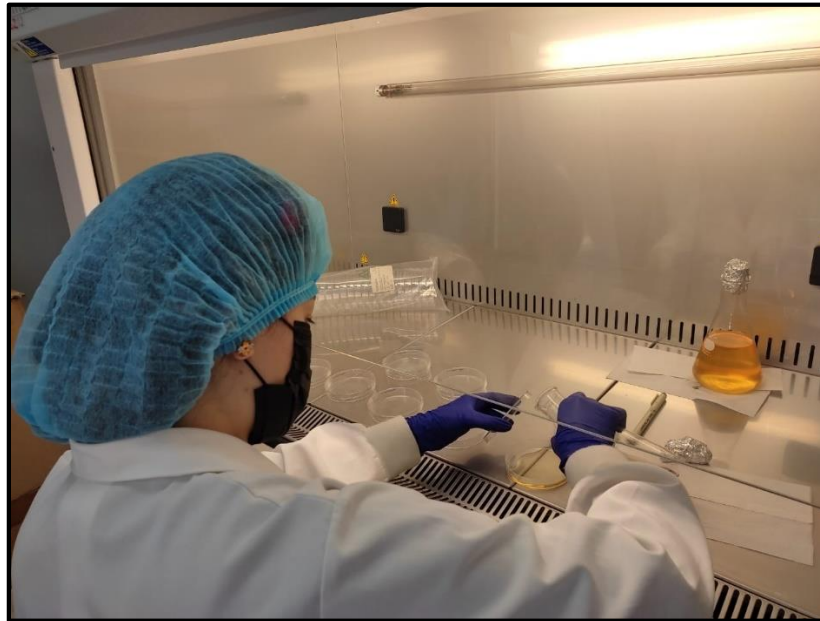
M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*.

µg: Microgramos.

µg/mL: Microgramos/ mililitros.

ANEXOS

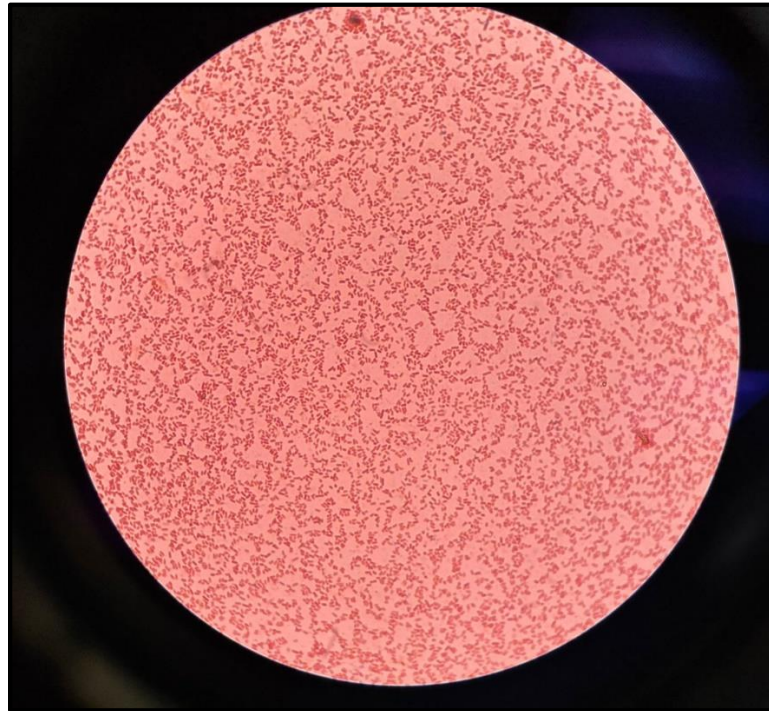
Anexo 1. Preparación de agar Müller-Hinton.



Anexo 2. Preparación de CHROMagar.



Anexo 3. Tinción de Gram de *Escherichia coli*.



Anexo 3. Tinción de Gram de *Klebsiella pneumoniae*.

