

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA *Cordia dentata* Y *Malachra alceifolia* DE ORIGEN
CARIBEÑO SOBRE *Pseudomonas aeruginosa***

Integrantes: Alejandra Fernández
 Katherine Sandoval
 Maritza Trujillo

Dirección del trabajo:

Dr. Orlando Torres G.

Dra. Yuly Bernal R.

Universidad Antonio Nariño

Trabajo de Grado III

Cundinamarca

Bogotá DC.

2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestros padres por el esfuerzo que hacen a diario para que podamos salir adelante. Damos nuestro más sincero agradecimiento a nuestros tutores, el Doctor Orlando Torres y la doctora Yuly Bernal, por habernos brindado su conocimiento, paciencia, comprensión, apoyo y dedicación, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A la doctora Nelitza Linárez quien nos brindó su apoyo incondicional desde el principio y nos facilitó las herramientas para iniciar con la realización de la tesis.

A la universidad Antonio Nariño por el financiamiento de nuestro estudio y a la facultad de medicina veterinaria que nos prestaron las instalaciones y materiales necesarios.

Por último, agradecemos a nuestro compañero Cristian Acevedo, a los demás docentes y colaboradores que contribuyeron con la realización del proyecto.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación lo dedicamos especialmente a nuestros padres, ya que por su amor, trabajo diario y sacrificio en todos estos años, hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido siempre un orgullo y un privilegio ser sus hijos (as), son las personas mas importantes durante todo este tiempo ya que han estado desde el comienzo con nosotros, tanto en los días buenos como en los días malos, nunca se dieron por vencidos y nunca se rindieron frente a las adversidades durante todo este proceso.

A nuestros docentes que desde el inicio del proyecto estuvieron con nosotros, en especial nuestros tutores, quienes nos han aportado parte de su conocimiento para continuar en este proceso en los momentos más difíciles de nuestra investigación.

Y damos gracias a todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

CONTENIDO

RESÚMEN	10
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Fitoterapia	12
2.2. Resistencia de los antimicrobianos de las bacterias.	13
2.3. Mecanismos de resistencia.	16
2.3.1. Tipos de resistencia	18
2.3.1.1. Natural o intrínseca.	18
2.3.1.2. Adquirida.	18
2.3.2. Resistencia bacteriana a los aminoglucósidos.	19
2.4. <i>Pseudomona Aeruginosa</i> .	20
2.4.1. Factor de agresión de la <i>pseudomona aeruginosa</i> .	21
2.4.2. Ramnolípidos.	22
2.4.3. Resistencia a los antibióticos.	23
2.5. Mecanismo de acción de los antibacterianos empleados en la experimentación.	24
2.6. Experimentación in vitro evaluando la concentración mínima inhibitoria.	27

2.7. Investigación realizada del género <i>Cordia Dentata</i> .	30
2.7.1. Características.	31
2.8. <i>Malachra Alceifolia</i> .	32
2.9. Características.	33
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
4. JUSTIFICACIÓN	35
5. OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo generales	36
5.2 Objetivo específicos	36
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1. Materiales.	37
6.1.1 Muestras.	37
6.1.2. Cepa bacteriana.	38
6.1.3. Equipos.	38
6.1.4. Otros.	38
6.2. METODOLOGÍA.	40
6.2.1 Característica de la investigación	40
6.2.2. Estudio fotoquímico.	40
6.2.2.1. Recolección de la muestra.	40
6.2.2.2. Tratamiento del material vegetal.	40

6.2.2.3. Preparación del extracto total.	41
6.2.3. Estudio bacteriólogo.	41
6.2.3.1. Reactivación de la <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	41
6.2.3.2 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria con sensidiscos.	41
6.2.3.3. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos.	42
6.2.3.4. Preparación de las diluciones.	42
6.2.4. Procedimientos.	42
6.2.4.1 Control de calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.	44
7. RESULTADOS.	45
7.1. Evaluación de la curva de crecimiento de la <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	45
7.2. Resultado de la cinética de la <i>Pseudomona aeruginosa</i> con los extractos.	46
8. DISCUSIÓN.	47
9. CONCLUSIONES	49
10. RECOMENDACIONES	50
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de las muestras de los extractos de las plantas obtenidas	37
Tabla 2. Microplaca de las diluciones de los extractos con la <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Tabla 3. Resultados de la cinética de la <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con los extractos	46

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Mecanismo de resistencia bacteriana (Soto L., 2003)	17
Ilustración 2. Mecanismos de resistencia intrínseca celular (Valenzuela P., Ortiz C., 2016) .	18
Ilustración 3. Mecanismos de transferencia de resistencia (Valenzuela P., Ortiz C.,2016) ...	19
Ilustración 4. Mecanismo de acción de los antibióticos	24
Ilustración 5. Antibióticos empleados en Gram negativos.....	25
Ilustración 6. Escala de McFarland grado 0.5 de turbidez	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cinética de crecimiento en 48 h de <i>la Pseudomona aeruginosa</i>	45
---	----

RESÚMEN

La existencia de bacterias multirresistentes a los antibióticos se ha convertido en un verdadero problema para el sector salud en todo el mundo. En la búsqueda de soluciones para estos eventos, ha surgido la opción de retornar a la implementación de la fitoterapia como alternativa antimicrobiana. En este sentido, evaluamos el efecto de extractos naturales de dos tipos de plantas, la *Cordia dentata* y la *Malachra alceifolia*, sobre cultivos de la *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a diversos tipos de antibióticos. Una vez lograda la obtención de una bacteria completamente aislada y con crecimiento óptimo, se procedió a las lecturas con los extractos, esperando que el efecto inhibitorio de éstos sea similar al de los antibióticos que se usan frecuentemente para este tipo de bacteria multiresistente. Los resultados de la cinética evaluada para el caso de cada extracto muestran su ausencia de actividad sobre el crecimiento de cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente, se pudo evidenciar que el efecto de la *Malachra alceifolia* y la *Cordia dentata* es ineficiente frente a la *Pseudomonas aeruginosa*.

1. INTRODUCCIÓN

La fitoterapia es una alternativa medicinal que busca prevenir y tratar enfermedades utilizando plantas con propiedades medicinales (Mojica et al.2015).

Colombia es un país rico en biodiversidad, y desde tiempos ancestrales, se usan plantas con fines medicinales, tales como las que se estudiarán y analizarán en este trabajo.

Particularmente, estudiaremos la *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia* pertenecientes a la familia *Boraginaceae* abundantes en la costa norte colombiana y conocidas como “Uvito” y “Malva” respectivamente, con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, emolientes, entre otras (Álvarez C, Castro A, González M, Jiménez M., 2005).

Con el fin de explorar nuevas alternativas terapéuticas antimicrobianas, el presente trabajo tiene como objetivo determinar si los extractos clorofórmicos de *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia* presentan capacidad bacteriostática o bactericida sobre cultivos multirresistentes de *Pseudomona aeruginosa*, bacteria que, debido al rápido crecimiento y adaptabilidad a condiciones ambientales versátiles como estrés oxidativo, nutricional, entre otras; se consideran como uno de los grupos más diversos que por sus factores de virulencia son capaces de evadir los mecanismos de acción de antibióticos de amplio espectro como β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos (Fagner. et al., 2005).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Fitoterapia.

Se define a la Fitoterapia como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con fines terapéuticos, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Si bien, la humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal en la terapéutica, ha variado a lo largo del tiempo, según con los avances del conocimiento científico, tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas (Benavides E., Hernández G., Romero A., Castro H., Rodríguez J., 2001).

La base de los medicamentos fitoterapéuticos son las drogas vegetales y los diferentes tipos de productos que de ellas se obtienen. El término droga vegetal no debe confundirse con el de planta medicinal. En este sentido, la OMS (1978) definió estos conceptos de la siguiente manera: (a) Planta medicinal es cualquier planta que en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (b) Droga vegetal es la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica, y sus principios activos son las sustancias responsables de la acción farmacológica. Así, para la OMS (1978), la fitoterapia utiliza drogas vegetales y preparaciones de dichas drogas, en la forma farmacéutica más adecuada para su administración.

Para situar los límites de la Fitoterapia en la Terapéutica actual, y por lo tanto precisar el concepto moderno de la misma, se debe partir de varias premisas. Si bien los productos fitoterapéuticos suelen tener márgenes de seguridad terapéutica más amplios y generar menos

efectos adversos que los fármacos sintéticos, cabe recordar que, natural no es sinónimo de inocuo. Actualmente existe una base científica que puede sustentar la efectividad de muchos productos fitoterapéuticos para determinadas indicaciones. Constituyen alternativas fuertemente deseables para muchas patologías menores, enfermedades crónicas y prácticas profilácticas (Benavides et al., 2001).

2.2 Resistencia antimicrobiana de las bacterias

La resistencia bacteriana se define como la capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos, es decir, es la aparición de cepas refractarias al efecto bactericida o bacteriostático. De esta forma, los microorganismos pueden clasificarse en “resistentes” o “susceptibles” en función de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que presenten frente a cada antibiótico, una medida cuantitativa del grado de resistencia. En algunos casos aparecen bacterias que no son susceptibles a varios antibióticos, por lo que se denominan multirresistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR) (Ros L., 2018).

La resistencia a los antibióticos es uno de los grandes problemas para la salud pública a nivel mundial, un fenómeno que, a través de los años, aumenta debido a el uso de antimicrobianos de forma indiscriminada e inapropiada (Calderon G., Ulate L., 2017).

La resistencia a los antimicrobianos amenaza actualmente la capacidad existente de solucionar con eficacia diferentes afecciones como: las infecciones respiratorias agudas (neumonía), las enfermedades diarreicas, el paludismo y la tuberculosis. En algunas regiones del planeta, más de la mitad de todos los casos de neumonía estreptocócica son resistentes a la penicilina. La eficacia de la cloroquina, considerada como la piedra angular del tratamiento del paludismo, hoy día es discutida en muchos países (Cires M., 2002).

La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma especie (transmisión horizontal) o diferente especie (transmisión vertical). Los fenómenos de resistencia antimicrobiana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales: enzimas hidrolíticas, modificación del sitio activo, disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano, y bombas de flujo (Moreno C; González R; Beltrán C. 2009).

El número de nuevos antimicrobianos en la clínica asistencial ha descendido de forma gradual y significativa en los últimos 15 años. Paralelamente se ha producido un incremento en la aparición de microorganismos con resistencia a los antibióticos convencionales, sobre todo en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). Dentro de este grupo, el *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente (SARM) y *Streptococcus* coagulasa negativos resistentes a la meticilina, enterococos resistentes a la vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos y enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son las más destacables (Cires M.,2002). Estos patógenos con frecuencia son además resistentes a otros grupos de antibióticos, como aminoglucósidos, fluorquinolonas y macrólidos (Gómez A. et al., 2005).

Para hacer frente a estas resistencias disponemos de nuevos antimicrobianos de reciente introducción. Éstos son activos principalmente frente a cepas resistentes de bacterias grampositivas, y de manera más puntual frente a gramnegativos o a ambos. Entre los primeros destacan: daptomicina (lipopéptido bactericida de uso parenteral) y linezolid (oxazolidinona bacteriostática de uso parenteral y oral). Por su parte, el ertapenem

(carbapenem bactericida parenteral) y la tigeciclina (tetraciclina bacteriostática parenteral) son activos frente a enterobacterias BLEE, siendo la tigeciclina activa frente a gram positivos y gramnegativos no fermentadores, excepto *P. aeruginosa*. Posiblemente la introducción de estos nuevos compuestos y otros futuros pendientes por salir, aparte de mejorar la diversificación antimicrobiana, sirva para limitar la dispersión de estos microorganismos (Barcenilla F. et al., 2008).

El problema de la resistencia antibiótica aumenta año a año. La incidencia de microorganismos multirresistentes (MMR) está creciendo tanto en el medio comunitario como en el hospitalario. En las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) las tasas pueden llegar a ser el doble. Existen pocas dudas en que la infección por MMR se asocia a fracaso terapéutico, prolongación de la estancia hospitalaria, incremento en los costes hospitalarios y aumento en la mortalidad, sobre todo en pacientes críticos (Barcenilla et. al., 2008).

Ciertos antibióticos son productos del metabolismo secundario de diversos microorganismos del suelo que participan en procesos ecológicos de competencia por nichos nutricionales y representan un ejemplo de diferenciación y especialización microbiana. Es obvio que los microorganismos productores de antibióticos también posean mecanismos de resistencia a los mismos antibióticos que producen. Paralelamente, en esta competencia dinámica, otros microorganismos han desarrollado sus propios mecanismos de resistencia o los han adquirido directamente de los microorganismos productores de antibióticos. La capacidad de producir antibióticos y los mecanismos de resistencia por parte de los microorganismos es el resultado de un intenso proceso evolutivo ocurrido durante miles de millones de años en la naturaleza (García F., 2001).

Desde su introducción como drogas hace unos sesenta años, los agentes quimioterapéuticos antimicrobianos, tales como los antibióticos, tanto naturales y semisintéticos, y otros agentes sintéticos entre estos las sulfonamidas y las quinolonas, han jugado un papel esencial, junto con medidas preventivas como la vacunación, en la disminución de la morbilidad y la mortalidad causadas por las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el mal uso y abuso de los antibióticos, no solamente en el tratamiento y la prevención de infecciones bacterianas en el ser humano, sino también en medicina veterinaria, como promotores de crecimiento en la producción animal y en agricultura, han ejercido una inmensa presión de selección para el surgimiento y la diseminación de los mecanismos de resistencia entre diversas poblaciones bacterianas (García F., 2001).

2.3 Mecanismos de resistencia

La resistencia a los antimicrobianos representa una enorme crisis de salud global y una de las amenazas más graves que enfrentan los humanos hoy en día. Algunas cepas bacterianas han adquirido resistencia a casi todos los antibióticos (Breiyeh Z., Jubeth B. and Karaman R., 2020).

El primero de ellos opera por medio de un sistema de bomba de expulsión, tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsando lo al exterior, de esta forma evita que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Tafur J., Torres J., Villegas M., 2008).

El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetiltransferasa, y el caso más típico, el de las beta-lactamasas, para el grupo de los beta-lactámicos. En años recientes la aparición de beta-

lactamasas de amplio espectro que incluye a las anti beta-lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), dificulta el uso de estos antibióticos tan utilizados (Soto L., 2003).

Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce, cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Ilustración 1) (Soto L., 2003).

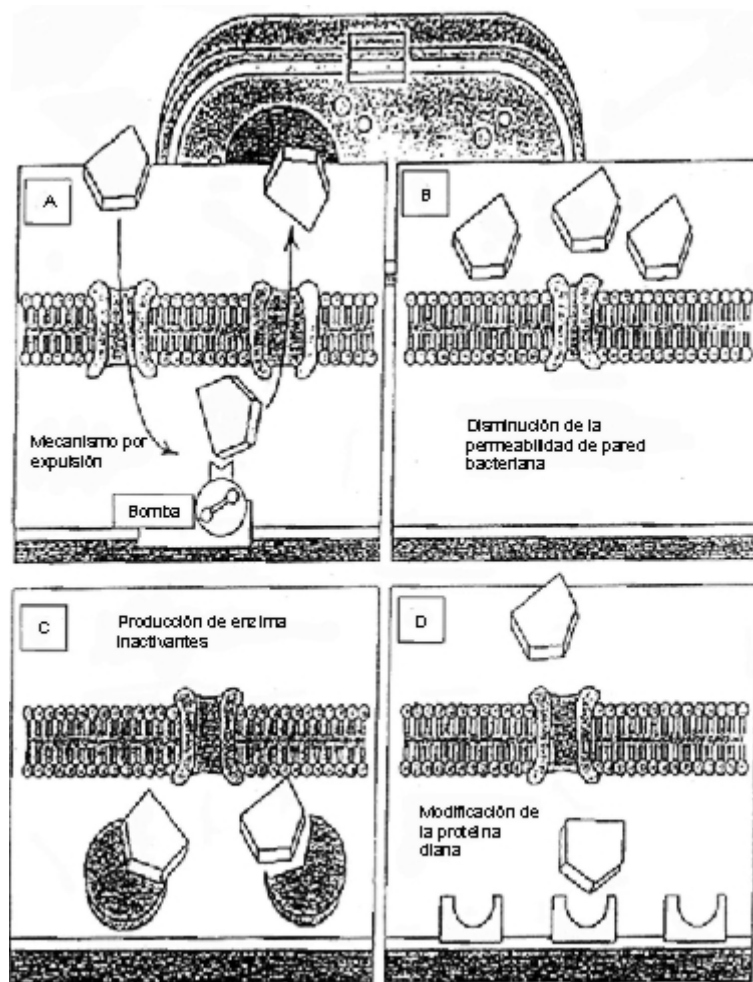


Ilustración 1. Mecanismo de resistencia bacteriana (Soto L., 2003).

2.3.1 Tipos de resistencia

2.3.1.1 Natural o intrínseca.

Existen mecanismos de defensa intrínseca en las bacterias que se van desarrollando conforme la aparición de nuevos antibióticos. Cox y Wright (2013), definieron a la resistencia intrínseca como todos aquellos mecanismos de defensa presentes en la célula de forma natural; es una condición que se encuentra universalmente en las especies bacterianas y que es independiente de la selectividad de antibióticos (Ilustración 2). Algunas formas de resistencia intrínseca son: la disminución de la permeabilidad de la membrana, la alteración del sitio diana y la inactivación por enzimas, entre otros. El ejemplo clásico de esta condición de resistencia intrínseca es el fenotipo de resistencia a multidrogas (MDR) presente en bacterias Gram negativas (Valenzuela P., Ortiz C., 2016).

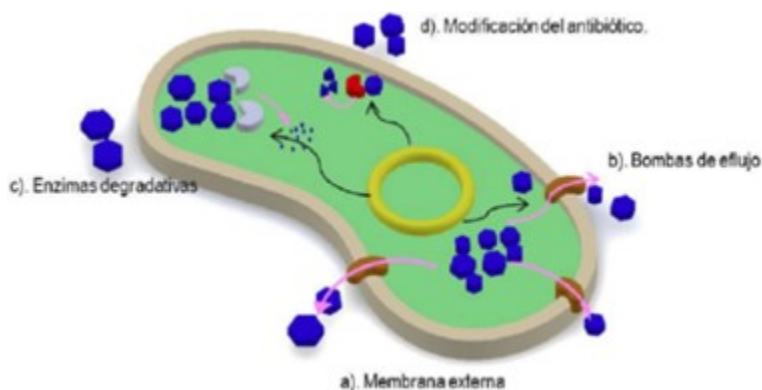


Ilustración 2. Mecanismos de resistencia intrínseca celular (Valenzuela P., Ortiz C., 2016).

2.3.1.2 Adquirida.

Se presenta cuando se produce una mutación cromosómica o la bacteria adquiere un plásmido de resistencia, es decir, un fragmento extracromosómico de ADN portador de genes que

modifican la resistencia al antibiótico. Esto puede darse entre bacterias de la misma o de diferentes especies (León S., 2010).

La resistencia se transmite de dos formas; vertical (de generación en generación) y horizontal (Soto L., 2003). Los mecanismos genéticos involucrados en una transferencia genética horizontal incluyen (Ilustración 3): 1) la conjugación por medio de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones; 2) la transformación de ADN libre en el ambiente y 3) la transducción por medio de bacteriófago (Valenzuela P., Ortiz C., 2016).

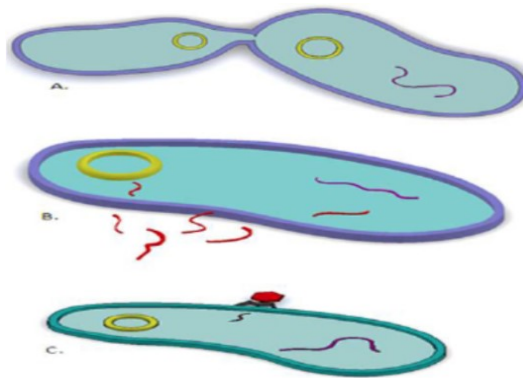


Ilustración 3. Mecanismos de transferencia de resistencia (a) conjugación (b) transformación y (c) transducción (Valenzuela P., Ortiz C., 2016).

2.3.2 Resistencia bacteriana de los aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos cuyo uso es sobre todo hospitalario. Su elevada velocidad de acción bactericida, su sinergia de acción, en especial con los betalactámicos, y su espectro, que incluye bacterias multirresistentes, motivan su prescripción en las infecciones graves y en las nosocomiales (Boussekey, N., Alfandari, S., 2007).

Los aminoglucósidos son ampliamente utilizados debido a la buena eficiencia y al amplio espectro antimicrobiano. Sin embargo, causa algunos efectos inesperados en las características patogénicas de la microbiología durante el tratamiento, como la resistencia a

los medicamentos y la promoción de biopelículas. La resistencia a los medicamentos se debe en parte al abuso de antibióticos (Xu, Z. et al., 2017).

La resistencia bacteriana a los aminoglucósidos puede deberse a tres mecanismos: la inactivación enzimática que es el mecanismo más frecuente, la existencia de diferentes clases de enzimas como Aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC), Aminoglucósido-nucleotidiltransferasas (ANT) y Aminoglucósido-fosfotransferasas (APH) (Mella, S. et al., 2004). Cada una puede inactivar diversos aminoglucósidos y una misma bacteria puede secretar varias enzimas. La alteración del objetivo ribosómico, de origen cromosómico, confiere una resistencia de muy alto nivel. Es infrecuente, por lo que plantea pocos problemas prácticos. Por último, el defecto de permeabilidad celular, también de origen cromosómico, confiere una resistencia cruzada a todos los aminoglucósidos y a otros antibióticos. Se encuentra sobre todo en el *Estafilococo* y en *Pseudomonas* (Boussekey, N. and Alfandari, S., 2007).

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo aeróbico Gram-negativo, no fermentador de azúcares, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae. Es móvil, posee flagelos monótricos polares, produce pigmentos fluorescentes (pioverdina y piocianina). Algunas cepas también producen un pigmento rojo oscuro o negro (piorrubina o piomelanina). Es oxidasa-positivo, emite un característico olor dulzón en el medio de cultivo. Crece fácilmente en una amplia variedad de sustratos, utiliza más de 30 compuestos orgánicos para su desarrollo. Se aísla de suelos, agua, plantas y animales. La epidemiología de *Pseudomonas aeruginosa* refleja su predilección por un medio ambiente húmedo (Brito et al., 2000). La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista, patógeno intrahospitalario en pacientes inmunodeficientes o con brechas en las defensas físicas del cuerpo, como las producidas por heridas, quemaduras o úlceras. Forma

biopelículas en dispositivos médicos, siendo además agente causal de la fibrosis quística, cuyo tratamiento se asocia regularmente al desarrollo de resistencia a ciprofloxacina y a aminoglucósidos (Maguna et al., 2006).

La *Pseudomona aeruginosa* es especialmente problemática debido a una combinación de los siguientes factores: la resistencia inherente de la especie a muchas clases de drogas; su capacidad de adquirir resistencia, a través de mutaciones a todos los tratamientos relevantes; sus altas y crecientes tasas de resistencia a nivel local; y su papel frecuente en infecciones graves (Livermore D., 2002). Algunos aislados de *Pseudomona aeruginosa* son resistentes a todos los antibióticos confiables, y es probable que este problema crezca con la aparición de integras que llevan casetes genéticos que codifican tanto carbapenemasas como amikacina acetiltransferasas (Livermore D., 2002).

2.4.1 Factores de agresión de *Pseudomonas aeruginosa*

Presenta componentes propios de la célula, como el LPS, pili, alginatos y productos extracelulares, como enzimas y toxinas. *Pseudomona aeruginosa*, por conjugación a través de plásmidos R adquiere la habilidad de codificar resistencia a la mayoría de los antibióticos, y ésta se manifiesta unida a la resistencia a metales pesados; característica que le permite sobrevivir en condiciones en que muy pocos microorganismos lo hacen, estos son (Stanchi O., et. al., 2007):

- **Factores de adherencia:** los pili facilitan la adhesión a las células epiteliales, permitiendo la colonización. Las cepas productoras de *slime* forman como una biopelícula, que impide la acción de los anticuerpos.
- **Endotoxina:** el lípido A, componente de la endotoxina de la pared celular, con efectos biológicos en la sepsis bacteriana.

- **Exotoxina:** es uno de los factores de virulencia más importantes. La toxina es inmunosupresora y tóxica para los monocitos y la médula ósea de los animales y humanos.
- **Exoenzimas S y T:** producen un daño en las células epiteliales, lo que facilita la diseminación de las bacterias, la invasión tisular y la necrosis.
- **Enzimas proteolíticas:** la mayoría de las cepas producen enzimas proteolíticas capaces de degradar una amplia variedad de sustratos, como elastina, caseína, colágeno, gelatina, fibrina. Proteasas extracelulares: elastasa y proteasa alcalina.
- **Elastasas:** la A (serina proteasa) y las B (metaloproteasa de zinc) actúan de manera sinérgica para degradar la elastina y destruir los tejidos. Actúan también inhibiendo a la quimiotaxis y la función de neutrófilos, favoreciendo la diseminación bacteriana.
- **Proteasa alcalina:** al igual que las elastasas, contribuye a la destrucción tisular y a la diseminación de *Pseudomona aeruginosa*, inactiva el complemento e interfiere con la respuesta inmune del hospedador.
- **Fosfolipasa C:** es una hemolisina termolábil que rompe los lípidos y la lecitina, facilitando la destrucción tisular y la diseminación.
- **Ramrólípido:** hemolisina termoestable que altera los tejidos que contienen lecitina. Se asocia con la inhibición de la actividad ciliar del tracto respiratorio.
- **Enterotoxina:** causa diarrea durante la infección intestinal.
- **Piocianina:** colabora en la transformación del oxígeno en superóxido y peróxido de hidrógeno. El hierro unido al sideróforo de *Pseudomona aeruginosa* denominado pioquelina puede catalizar la producción del radical hidroxilo. Además, posee actividad antimicrobiana.

2.4.2 Ramnolípidos

Son un grupo de biotensioactivos de naturaleza glicolípida, producidos por la *Pseudomona aeruginosa*, que dan lugar a la solubilización de sustratos en el interior de las estructuras micelares que forman. Además, producen un aumento de la hidrofobicidad de la superficie de la *Pseudomona aeruginosa* al liberar el lipopolisacárido, lo cual provoca un aumento de la internalización de sustratos apolares y octadecano e induce la formación de agregados multicelulares (Marina S., 2010).

Estos glicolípidos son solubles en agua y en disolventes polares como metanol, cloroformo y éter etílico y en disoluciones alcalinas, estabilizan las emulsiones de compuestos hidrofóbicos en agua como aceites, alcanos, compuestos aromáticos, petróleo o queroseno (Marina S., 2010).

2.4.3 Resistencia a los antibióticos

La *Pseudomona aeruginosa* es una bacteria resistente y puede mutar a cepas multirresistentes durante el tratamiento. Se han identificado numerosos mecanismos de resistencia.

Los mecanismos de resistencia son:

1. Resistencia natural o intrínseca: codificada en el cromosoma de todas las especies.

Dentro de este tipo de resistencia también se engloba la familia de transportadores de la división de células de nodulación-resistencia (RND): las bombas de eflujo (Mex).

Estos sistemas son capaces de expulsar los antibióticos administrados, provocando así su resistencia, principalmente a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim, antibióticos beta-lactámicos, inhibidores de beta-lactamasa, detergentes, aminoglucósidos, eritromicina y cefalosporinas. El regulador transcripcional NFκB es el encargado de reprimir la mayoría de las bombas de eflujo. En cepas con mutaciones cromosómicas en el factor NF-κB y lo inhiben, las bombas están sobreexpresadas por

lo que hay mayor expulsión de los antibióticos y por tanto mayor resistencia (González, C., 2017).

2. Resistencia mutacional, la impermeabilidad y el eflujo en betalactámicos, la depresión de B-lactamasas cromosómicas, el eflujo y la alteración de la DNA girasa que inactivan a las quinolonas fluoradas.
3. Adquirida: mediante plásmidos por conjugación de enzimas inactivantes de aminoglucósidos y B-lactamasas plasmídicas transferibles (Stanchi O. et al., 2007).

Por último, existe un mecanismo de resistencia adaptativo, que hace que el efecto de los antimicrobianos se vea reducido en cepas que originalmente eran susceptibles a un antibiótico en concreto. Una de las causas de este fenómeno es la presencia de concentraciones subinhibitorias de antibióticos, que producen alteraciones en la expresión de genes y/o proteínas relacionados con los mecanismos de resistencia (Ros L., 2018).

2.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIBACTERIANOS EMPLEADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN.

Mecanismo de acción de los antibióticos	
Proceso bacteriano	Antibiótico
Inhibidores de la síntesis de pared celular	Penicilinas, penicilinas de amplio espectro y antipseudomónicas. Cefalosporinas de I, II, III y IV generación. Monobactams: aztreonam, carumonam y tigemonam. Carbapenems: imipenem, meropenem, panipenem. Isoniacida, vancomicina, teicoplanina, cicloserina, bacitracina y fosfomicina.
Inhibidores del metabolismo del ac. fólico	Sulfoamidas y trimetropin
Alteradores de la membrana celular	Colistin
Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas, rifamicina y metronidazol.
Inhibidores de la síntesis de proteína	Inhibidores de la subunidad 30 S: aminoglucósidos Inhibidores de la subunidad 50 S: tetraciclinas, espectinomocina, macrólidos, clorfenicol y lincosaminos.

Ilustración 4. Mecanismo de acción de los antibióticos.

Una vez que las bacterias desarrollan resistencia, sobrevivirán a la exposición al antibiótico independientemente a su mecanismo de acción (Ilustración 4). A menudo, las bacterias adquieren resistencia concurrentemente a otros antibióticos con estructura y modo de acción similares. Las cepas resistentes se multiplican y luego se propagan (Villalobos, K., Herrera, M., 2001).

La *Pseudomona aeruginosa* al ser una bacteria Gram negativa ofrece la oportunidad de emplear diversos antibióticos (Ilustración 5) que han sido eficientes contra otras bacterias de este tipo.

No obstante, en un estudio relacionado de pruebas de sensibilidad a los antibióticos, se observó (Villalobos, K., Herrera, M., 2001):

- Las cepas de *Pseudomona aeruginosa* son resistentes al septran.
- Para *Pseudomona aeruginosa*, la resistencia a amikacina implicaría resistencia a gentamicina y tobramicina.
- Para *Pseudomona aeruginosa*, la resistencia a ciprofloxacina, implicaría resistencia a ofloxacina y levofloxacina (Villalobos, K., Herrera, M., 2001).

Antibióticos a emplear en bacilos Gram Negativos no fermentadores	
Grupo de antibióticos	Antibiótico recomendado
Penicilinas de amplio espectro	Ampicilina y sulbactam (no para <i>pseudomonas sp.</i>).
Penicilinas antipseudomónicas	Ticarcilina, ticarcilina con ácido clavulánico.
Ureidopenicilinas	Mezlocilina, azlocilina, piperacilina y piperacilina con ácido clavulánico.
Cefalosporinas	Cefoperazona, ceftazidime y cefepime.
Monobacterms	Aztreonam.
Carbapanems	Imipenems y meropenem.
Tetraciclinas	Minociclina, oxitetraciclina y doxiciclina.
Cloranfenicol	Cloranfenicol.
Polimixinas	Polimixinas B y E (uso tópico).
Aminoglucósidos	Amicacina, gentamicina y tobramicina.
Vancomicina	Para <i>Chriseoacterium meningosepticum</i> .
Quinolonas	Ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina y perfloxacina.
Septran	Septran

Ilustración 5. Antibióticos empleados en Gram negativos.

La acción de los aminoglucósidos comprende una interacción inicial con la superficie externa de la membrana celular bacteriana, transporte a través de la membrana interna y, finalmente, la unión a la subunidad 30S de los ribosomas, que inhibe la síntesis de proteínas, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (Pualomino, J., Pachón, J. 2003).

La *Pseudomona aeruginosa* posee una enzima nucleotidiltransferasa ANT-I que inactiva la gentamicina y la tobramicina; por lo tanto, la gentamicina y la tobramicina son susceptibles de sufrir las mismas modificaciones enzimáticas que las inactivan. Siendo el porcentaje de cepas resistente a estos dos aminoglicosidos similares, aunque, tobramicina es algo más potente *in vitro* contra *Pseudomona aeruginosa* (Brito, A., et. al, 2000).

En algunos casos, la enzima se produce de forma basal a alto nivel, debido a trastornos en los genes reguladores (fundamentalmente ampD) que, en condiciones normales, reprimen el gen

estructural de la enzima; por ello, estas cepas se denominan desreprimidas (Martínez, L. M., Hernández, Á. P., 2002).

Las cefalosporinas de tercera generación y las ureidopenicilinas son activas frente a las cepas que tienen enzima inducible. Estos compuestos tienen una baja capacidad inductora, pero presentan un grado variable de sensibilidad a hidrólisis. Entre ellos, los más estables a hidrólisis (piperacilina, ceftazidima, cefepima, entre otros) son los más activos *in vitro* frente a las cepas inducibles. Sin embargo, por las razones antes señaladas, estos compuestos pueden determinar la aparición de poblaciones desreprimidas a lo largo del tratamiento. En este tipo de cepas, la alta concentración de enzima acaba afectando también a los compuestos más estables y la cepa será resistente a ellos. Las carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) no sólo son pobres inductores, sino que se hidrolizan muy poco por AmpC de *Pseudomona aeruginosa*, por lo que son activas, o sólo sufren una moderada disminución de actividad frente a las cepas con alta producción de AmpC (Martínez, L., Hernández, Á., 2002).

Vancomicina (VAN) es un glicopéptido activo frente a bacterias Gram-positivas. Ejerce acción bactericida tiempo-dependiente inhibiendo la 2º etapa de síntesis de peptidoglicano. Las Gram-negativas son intrínsecamente resistentes a VAN por limitaciones para atravesar la membrana externa (Rosset, C., Manzo, R., and Alovero, F., 2013).

2.6 EXPERIMENTACIÓN IN VITRO EVALUANDO CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La Concentración Mínima

Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . La CMI se ha establecido como "*Gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Horna Q. et al., 2005).

El incremento de la resistencia en biopelículas da como resultado la falla usual de los antibacterianos para su erradicación, aunque las pruebas de laboratorio muestran sensibilidad a los antibióticos utilizados. Se ha propuesto el desarrollo de biopelículas para usarlas en la determinación de la susceptibilidad a antibióticos, para la evaluación de las cepas de *Pseudomona aeruginosa* en estado planctónico. Se cultivó en TSB (caldo de tripticasa de soya) toda la noche, a 37°C , hasta alcanzar la escala N° 1 de Mcfarland. Se tomó una alícuota para su dilución en solución salina (SS) y se sembró en agar tripticasa soya (TSA), mediante la técnica de difusión, para obtener el número de células viables cultivables en el tiempo cero (Florián, C., Alvarado, D., Cocha, J., 2006).

Para el recuento en placa sobre TSA, se sembró por diseminación hasta una dilución de 10 - 10; se incubó a 37°C por 18 a 24 horas. Sin embargo, luego de 24 horas, aún cuando la población no desaparece, ésta disminuye en más de 5 unidades logarítmicas; a concentraciones media y alta la población planctónica, desciende a niveles no mensurables por la técnica utilizada para el recuento de microorganismos viables. La misma cepa en estado de biopelícula cambia su comportamiento frente a las mismas dosis de antibiótico; su población no disminuye en alguna de las concentraciones; incluso, luego de 24 horas la población parece mantenerse estable (Florián, C., Alvarado, D., Cocha, J., 2006).

En otra investigación realizada se usó una batería de 3 microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Para la activación de las bacterias almacenadas se prepararon suspensiones a partir de cada una de ellas y se incubaron a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 2 horas para *Escherichia coli*, 4 horas para *Staphylococcus aureus* y 8 horas para *Pseudomonas aeruginosa*).

Para la preparación del inóculo se tomó una ansada de la bacteria en estudio (previamente activada) y se suspendió en una porción de caldo Triptosa Soya, hasta lograr una turbidez comparable al patrón de turbidez 0,5 McFarland, esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuente de luz adecuada. De este inóculo se tomó una alícuota de 100µl lo que corresponde a 1x10⁸ unidades formadoras de colonias/ ml (ufc/ml) y se colocaron en las placas estériles con BHI agarizado. Estas placas se prepararon con 15 ml cada una del medio agarizado.

Para la distribución uniforme del inóculo en las placas se utilizó la técnica de escobillado, para lo cual se aplicó sobre la superficie de la placa el inóculo y luego con un asa de Digralski se efectuó un barrido en por lo menos tres direcciones, girando la placa a 90 grados. A continuación se aplicaron en cada placa, con la ayuda de una pinza estéril y ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio, 3 discos de papel de 5,5 mm de diámetro embebidos con 2µl de terpenoide cada uno. Después de 14 minutos de aplicados los discos, se comenzó la incubación a 35-37 °C, durante 12 horas, al cabo de las cuales se leyeron los resultados. Para la interpretación de los resultados se consideraron 3 categorías: 1) Inhibición del crecimiento, a todo halo translúcido detectado alrededor del disco, es decir que la bacteria es sensible al compuesto 2) No Inhibición del crecimiento, es decir que no se forma halo y la bacteria no es sensible 3) Inhibición del crecimiento en forma irregular, es decir que se observa una inhibición pero el halo no adopta la forma esperada (Maguna, F., et al., 2006).

Las bacterias Gram-negativas, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron más sensibles a los terpenoides en comparación con la gram-positiva, *Staphylococcus aureus*. Esto puede tener su causa en la diferencia que presentan estas bacterias en cuanto a su pared celular, lo cual determinará la penetración o no del terpenoide a la célula bacteriana para que produzca su acción (Maguna, F., et al., 2006).

Una investigación basada en el uso de fitoterápicos de las hojas *Aza dirachta indica*, recolectada en Carora, Estado Lara, Venezuela, donde las partes aéreas de la especie *Azadirachta indica*, fueron secadas en una estufa a 45 °C y molidas con un tamaño de partícula de 2 mm. 100 gr. en peso seco del material vegetal fueron sometidos a una extracción con etanol de 98% en aparato de Soxhlet a 65 °C durante 6 horas y se obtuvo un extracto verde oscuro, el cual fue filtrado y rotaevaporado a 50 °C al vacío hasta sequedad, con un rendimiento de 5,79%. Para la preparación de las distintas diluciones se procedió a preparar un patrón en una concentración 1:1, y a partir de éste, diluciones (1:10 y 1:100) (Gualtieri, M., et al., 2008).

En este caso, el extracto mostró actividad inhibitoria selectiva sobre las bacterias probadas. Los ensayos antibacterianos determinaron que la actividad inhibitoria contra las cepas estudiadas fueron especies dependientes. Diluciones iguales a 1/100 demostraron poder inhibitorio sobre todas las bacterias excepto *E. coli*, *E. feacalis* y *K. pneumoniae*, las cuales fueron sensibles al extracto independientemente de su concentración. Por el contrario, *S. aureus* y *P. aeruginosa* demostraron incremento de la sensibilidad a medida que la concentración disminuye (Gualtieri, M., et al., 2008).

En base a los resultados obtenidos sobre la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Aza dirachta indica*, la dilución 1/10 resultó ser la más eficiente para inhibir el

crecimiento de *Staphylococcus aureus*. La dilución 1/100 también resultó ser eficiente para inhibir *Klesiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*; en consecuencia, se preparó una crema con propiedades antibacterianas al 5% (Gualtieri, M., et.al, 2008).

2.7 Investigaciones realizadas del género *Cordia Dentata*

Los primeros informes del género *Cordia*, *Boraginaceae* incluyeron características botánicas y reproductivas. Las plantas se caracterizaron por ser fértiles, ya que son incapaces de autofecundarse, que es un criterio importante para la identificación de las especies que pertenecen al género. En la medicina popular, las especies del género *Cordia*, se informan como plantas utilizadas para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan a muchos sistemas humanos (Fagner E., et al., 2015).

Existen informes publicados que describen a través de una amplia variedad de métodos sus diversas actividades: antimicrobiano, modificador de antibióticos, antiinflamatorio, antinociceptivo, antifertilidad, toxicidad, mordida de serpiente, hipolipidémico, inmunomodulador, insecticida y antioxidante (Fagner E., et. al., 2015).

2.7.1 Características

- **Porte:** árbol pequeño, 2-10 m de altura. Se caracteriza por su porte irregular, tronco corto, frecuentemente torcido, y copa muy ramificada.
- **Corteza:** gris o pardo grisáceo, muy fisurada. Ramas: largas y extendidas.
- **Hojas:** Simples y alternas, 3-13.5 cm de largo, 2-7 cm de ancho, elípticas a elíptico-ovadas o redondeadas, ápice agudo o redondeado. Contienen pequeños dientes en el

borde (de ahí el nombre científico *dentata*), los cuales son una continuación de los nervios secundarios (Zamora, N., González J. Poveda, L., 1999).

- **Flores:** amarillas pálidas a blancas, muy vistosas. Producen néctar y son polinizadas por abejas y otros insectos. Inflorescencia en cimas paniculadas, hasta de 20 cm de ancho, con muchas flores (Zamora, N., et al., 1999).
- **Fruto:** Fruto ovoide, 1-1.5 cm de largo, 0.6 cm de diámetro, blanco y casi transparente cuando madura. Es comido por aves, monos, murciélagos e iguanas, atraídas por la pulpa jugosa y muy dulce (Zamora, N., et al., 1999).

La especie *C. dentata* presenta un alto contenido de proteína cruda. El contenido de grasa observado en esta especie es bajo (1.50-1.76%), lo que se considera normal en una especie arbórea. El contenido de lignina es alto (10-13%). El valor observado de hemicelulosa se considera ligeramente alto (19-20%). Presentan una mayor cantidad de tejido vascular y esclerénquima en sus hojas, las cuales están rodeadas por una doble capa de células con paredes gruesas y suberizadas que la hacen más resistentes al rompimiento mecánico y al ataque microbiano (García A., et al., 2009).

2.8. *Malachra alceifolia*

La *Malachra alceifolia* es conocida comúnmente como Malva. Su modo de preparación es mediante la decocción, basado en hervir la planta con la finalidad de disolver sus químicos. Es utilizada para tratamientos febriles e inflamatorios; se aplica de manera local y mediante baños medicinales (Gómez H., et al., 2001).

2.9. Características

- **Tallo:** Tallos teretes densamente escabrosos, con tricomas estrellados, tricomas simples esparcidos y basalmente glandulares.
- **Hoja:** Hojas simples, alternas, escabrosas, el haz solo con tricomas simples; limbo astado, ovado u oblongo-elíptico, margen serrado, ápice obtuso, base oblicua a truncada, palmatinervio, con 3-5 nervios basales, 3-7 pares de venas secundarias, en disposición opuesta y alterna sobre la vena media. Estípulas laciniadas, pilosas, libres, pareadas, pecíolos pubescentes (Ramos J., 2014).
- **Inflorescencia:** Inflorescencia en densos racimos axilares o terminales.
- **Flor:** Flores sésiles, subtendidas por una bráctea foliosa, bráctea ovada a suborbicular, base cordada, ápice acuminado, con 7-12 costillas saliendo desde la base, bracteólas 2, laciniadas, saliendo del eje de la bráctea, pilosas. Cáliz campanulado, sépalos oblongo-lanceolados, connados en la base, pubescentes, ápice agudo. Corola de 5 pétalos libres imbricados en estado de yema, actinomorfa, campanulada en antesis, de color amarillo con una línea roja en la base, pétalos unguiculados, limbo ovobado, ápice redondeado, con 10 venas saliendo desde la base. Androceo de 30 a 40 estambres unidos formando un tubo que rodea el gineceo. Ovario súpero, pentacarpelar, coronado con 5 estilos, bifurcados hacia el ápice, estigmas capitados (Ramos J., 2014).
- **Fruto y semilla:** Fruto con brácteas y cáliz persistente, en esquizocarpo, 5 mericarpos en forma trígono-obovoide. Semillas 2-3 mm de longitud, negras, glabras, superficie minutamente reticulada; funículo persistente, péndulo, lanceolado (Ramos J., 2014).
- **Usos y propiedades:** Antiinflamatorio, antipirético, diurético, emoliente, estimulante, galactógeno, abscesos, golpes, hinchazones, inflamación ocular, inflamación renal y lavados vaginales (Ramos J., 2014).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La *Pseudomona aeruginosa* se ha considerado una bacteria de gran importancia a nivel mundial, debido su alta capacidad para adquirir mecanismos de resistencia intrínseca tales como: alteraciones en la composición de su pared bacteriana integrada principalmente por (glicoproteínas), con capacidad para desarrollar modificaciones a nivel ribosomal y su facilidad para mutar, lo cual ha generado que se presenten nuevas cepas resistentes a la mayoría de los antibióticos con actividad antipseudomonal. Estas condiciones conllevan a serios problemas terapéuticos, y su consecuente impacto en la salud pública que deriva en la generación de diferentes enfermedades nosocomiales, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

Dentro de las alternativas terapéuticas consideradas en la actualidad para enfrentar esta problemática, contempla el empleo de la fitoterapia, que implica el uso de extractos vegetales para contrarrestar infecciones bacterianas, incluidos aquellos agentes que muestran resistencia ante antibiótico convencionales.

4. JUSTIFICACIÓN

La *Pseudomona aeruginosa* en la actualidad es uno de los microorganismos que posee mayor impacto en las infecciones hospitalarias, siendo así uno de los principales patógenos causante de infecciones nosocomiales. En los últimos años, se ha aumentado la resistencia de estas cepas bacterianas a diversos antimicrobianos, e incluso se ha incrementado la mortalidad en pacientes infectados (Hernández, A. et al., 2018). Esta situación obliga a la incursión en el estudio de alternativas terapéuticas, que permitan generar nuevas herramientas para enfrentar este tipo de infecciones.

Por otro lado, siendo Colombia uno de los países con mayor diversidad biológica en el mundo, resulta esencial el estudio de plantas que muy posiblemente puedan tener un significativo potencial fitoterapéutico. Entre ellas, la *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia*, pertenecientes a la familia *Boraginaceae* abundantes en la costa norte colombiana y conocidas como “uvito” y “rabo de alacrán” respectivamente, con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, emolientes, entre otras (Álvarez C, Castro A, González M, Jiménez M., 2005). Por otra parte, se ha propuesto analizar el efecto de dos extractos completos de estas plantas naturales sobre cultivos resistentes de *Pseudomona aeruginosa*, facilitados por el laboratorio de microbiología de la Universidad Antonio Nariño. Finalmente, los resultados podrían aportar conocimiento que determine su utilización como agente fitoterapéutico en el tratamiento en pacientes infectados por esta bacteria.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano de extractos completos de *Malachra alceifolia* y *Cordia dentata*, sobre la *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Evaluar el efecto de *Malachra alceifolia* y *Cordia dentata* sobre el crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de *Malachra alceifolia* y *Cordia dentata* frente a la cepa *P. aeruginosa*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Muestras

Extractos: *Malachra alceifolia* y *Cordia dentata* de origen caribeño. En la siguiente tabla se muestran los datos que caracterizan los extractos completos de cada especie vegetal empleada en el estudio (Tabla #1).

Tabla #1 Caracterización de las muestras de los extractos de plantas obtenidas

<i>Malachra alceifolia (MA)</i>			<i>Cordia dentata (CD)</i>		
CÓDIGO	PESO (mg)	SOLVENTE DE DILUCIÓN	CÓDIGO	PESO (mg)	SOLVENTE DE DILUCIÓN
MA-III-43b	200	Cloroformo	CD-III-24b	500	Cloroformo

Facilitados por el Laboratorio de Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena.

6.1.2 Ceba bacteriana

Para el desarrollo de la investigación se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa*, facilitados por la Dra. Yuly Bernal del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Antonio Nariño.

6.1.3 Equipos

- Espectrofotómetro Multiskan FC©
- Linterna ultravioleta MERCK ®
- Plancha de agitación y calentamiento VELP scientific ®
- Balanza analítica Pioner OHAUS ®
- Vortex SCIOLOGEX MX-S
- Autoclave All American ® No. 25X
- Incubadora Thelco Laboratory THERMO ®
- Refrigerador White- Westinghouse

6.1.4 Otros

- Tubos eppendorf.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Papel aluminio.
- Pinzas metálicas sin garra.
- Asa bacteriana.
- Cajas de petri.

- Alcohol antiséptico.
- Caldo nutritivo.
- Agar cetrimide.
- Agar mueller hilton.
- Agar nutritivo.
- Embudo de vidrio.
- Puntas plasticas para micropipeta.
- Placas de calentamiento.
- Sensidiscos.
- Imán arrastrable.
- Erlenmeyer.
- Gradilla para tubos eppendorf.
- Guardian.
- Papel vinipel.
- Matraz aforado.
- Sensi discos cefalexina.
- Microscopios.

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Característica de la investigación

Este estudio experimental prospectivo se llevara a cabo en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Antonio Nariño de Bogotá, D.C., Colombia.

6.2.2 Estudio fitoquímico

6.2.1.2 *Recolección de la muestra*

Las hojas deshidratadas de la *Cordia dentata* (Código MA-III-43b) y *Malachra alceifolia* (Código CD-III-24b) se recolectaron en Cartagena de Indias, Departamento de Bolívar (10°25'25"Norte, 75°31'31"Oeste y elevación 2 m.s.n.m)..

6.2.1.3 *Tratamiento del material vegetal*

Los extractos fueron facilitados por el Laboratorio de Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena. Brevemente, se secaron 520 gramos de la *Cordia dentata* y 180 gramos *Malachra alceifolia*, cada especie fue colocada en recipientes con solvente de cloroformo. Para esto, se realizaron maceraciones sucesivas con los solventes de cloroformo (baja polaridad), en agitación no constante y a temperatura de 45°C.

6.2.3 Estudio bacteriológico

6.2.3.1 Reactivación de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*

Para la reactivación de la cepa se descongeló y se sembró en caldo nutritivo por 24h a 37°C, posterior a la activación, la cepa se pasó a medios sólidos de agar cetrímide y agar nutritivo, una vez la sepa se activó, se utilizó para realizar las pruebas susceptibilidad a los fitoextractos *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia*.

6.2.3.2 Ensayo de sensibilidad a los antibióticos

Para determinar la sensibilidad y/o resistencia de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, se utilizó la técnica Kirby-Bauer de difusión por discos reformulada por sugerencia de los Estándares de Desempeño para Ensayos de Sensibilidad Antimicrobianas por Discos (CLSI) (CLSI-M100, 2020). Se utilizaron los siguientes antimicrobianos para *P. aeruginosa*: tetraciclina (TE 30 mg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT 1.25 / 23.75 µg), eritromicina (E 15 µg), ampicilina (AMP 10 mg), cefalotina (CF 30 µg), vancomicina (VA 30 µg) y cefoxitin (FOX 30 µg), gentamicina (GM 10 µg), amikacina (IAM 30 µg), tobramicina (TOB 10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), lincomicina (L 2 µg) y clindamicina (DA 2 µg). El diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada disco se midió y se interpretó como lo describe el CLSI, que clasifica el organismo en tres categorías: sensible (S), sensible intermedio (I) y resistente (R) (CLSI-M100, 2020).

6.2.3.3 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos

La actividad de los extractos fue evaluada mediante la cuantificación de la concentración mínima inhibitoria por densidad óptica usando un espectrofotómetro Multiskan FC© a una longitud de onda de 625 nm.

6.2.3.4 Concentración mínima inhibitoria – CMI.

100µg de cada fito-extracto fueron diluidos en 100µL de agua destilada estéril, estos se dispensaron en una microplaca de 96 pozos de fondo plano, para cada fito-extractos (*Cordia dentata* y *Malachra alceifolia*) se realizaron diluciones seriadas 1:2 y una concentración constante de *P. aeruginosa* (0,5 de McFarland) volumen final 200 de µL/pozo, el diseño se resume en la Tabla 2. Se hicieron dos réplicas de la prueba en tiempo diferente y cada prueba se montó por duplicado. La validación de la CMI se realizó por el método de difusión sobre agar Mueller-Hinton, sembrando masivamente en agar Mueller-Hinton la cepa de *P. aeruginosa* y colocando una gota de 100µL de cada fito-extracto (100 µg).

6.2.4 Procedimiento

Se realizaron diluciones progresivas en una microplaca de 96 pozos donde se hizo una rotulación en la cual se enumeraron 12 columnas y 7 filas (Tabla 2).

En el pozo #1 fila A, se dispensaron 100µL de agua destilada estéril, así como también 100 µL del extracto #1 *Malachra alceifolia*, con el fin de obtener una dilución concentrada, luego se continuaron haciendo diluciones en base ½ hasta el pozo #12. Este mismo procedimiento se realizó con el extracto #2 *Cordia dentata* en la fila B. Luego se colocó 100µL de bacteria en caldo en cada uno de los pozos hasta el #12 de las filas A y B.

En la fila C se tomaron dos pozos en los cuales se depositó 100 µL de bacteria y 100µL de agua destilada estéril, este pozo fue uno de nuestros controles junto a la fila D en la cual se depositó en cada pozo 100µL de cloroformo y 100µL de agua destilada estéril del pozo #1 al #12, con el fin de verificar que el cloroformo no tuviese ningún efecto bacteriostático o bactericida frente a la bacteria.

Finalmente, en la fila F se colocaron 200 µL de agua destilada estéril en dos pozos, así mismo en la fila G se colocó caldo sin bacteria, con la finalidad de verificar que no había contaminación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A <i>Malachra alceifolia</i>	100µg del extracto. Con 100µL de 0.5 McFarland de <i>P. aeruginosa</i>	100µL [50] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [25] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [12.5] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [6.25] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [3.125] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [1.5625] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.78125] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.390625] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.1953125] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.09765625] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.0488281] 0.5 McFarland de bacteria
B <i>Cordia dentata</i>	100µg del extracto. Con 100µL de 0.5 McFarland de <i>pseudomona</i> .	100µL [50] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [25] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [12.5] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [6.25] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [3.125] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [1.5625] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.78125] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.390625] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.1953125] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.09765625] 0.5 McFarland de bacteria	100µL [0.0488281] 0.5 McFarland de bacteria
C Control de bacteria	100µL de <i>Pseudomona aeruginosa</i> con 100µL agua destilada	100µL de <i>Pseudomona aeruginosa</i> con 100µL agua destilada.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D Cloroformo	100µL de cloroformo, 100µL agua destilada con 0.5 McFarland de bacteria.	100µL cloroformo con 100µL Dilución 1/2	100µL Dilución 1/4	100µL Dilución 1/6	100µL Dilución 1/8	100µL Dilución 1/16	100µL Dilución 1/32	100µL Dilución 1/64	100µL Dilución 1/128	100µL Dilución 1/256	100µL Dilución 1/512	-
E Antibiótico	100µL de antibiótico con 100µL de bacteria	100µL Dilución 1/2	100µL Dilución 1/4	100µL Dilución 1/6	100µL Dilución 1/8	100µL Dilución 1/16	100µL Dilución 1/32	100µL Dilución 1/64	100µL Dilución 1/128	100µL Dilución 1/256	100µL Dilución 1/512	-
F Agua destilada	200 µL	200 µL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G Caldo	200 µL	200 µL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla # 2. Diseño del montaje de la CMI en microplaca de 96 pozos de los extractos con la *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente propia

La bacteria en caldo fue dejada durante 30 horas en la incubadora cumplidas estas horas se le realizó la escala de McFarland con un grado de turbidez de 0.5, para ser puesta en la microplaca y leída en el espectrofotómetro (Ilustración 6).

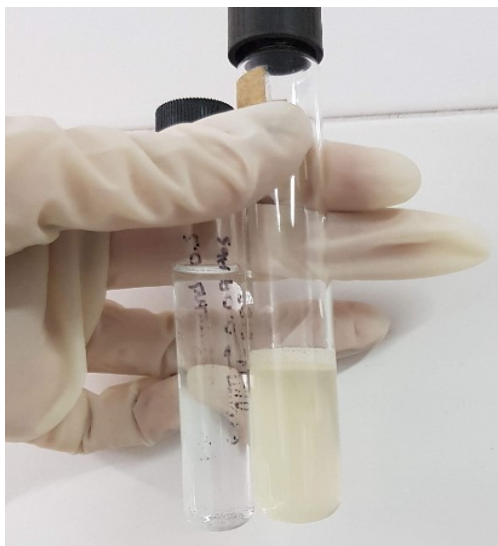


Ilustración # 6. Escala de McFarland grado 0.5 de turbidez. Fuente propia.

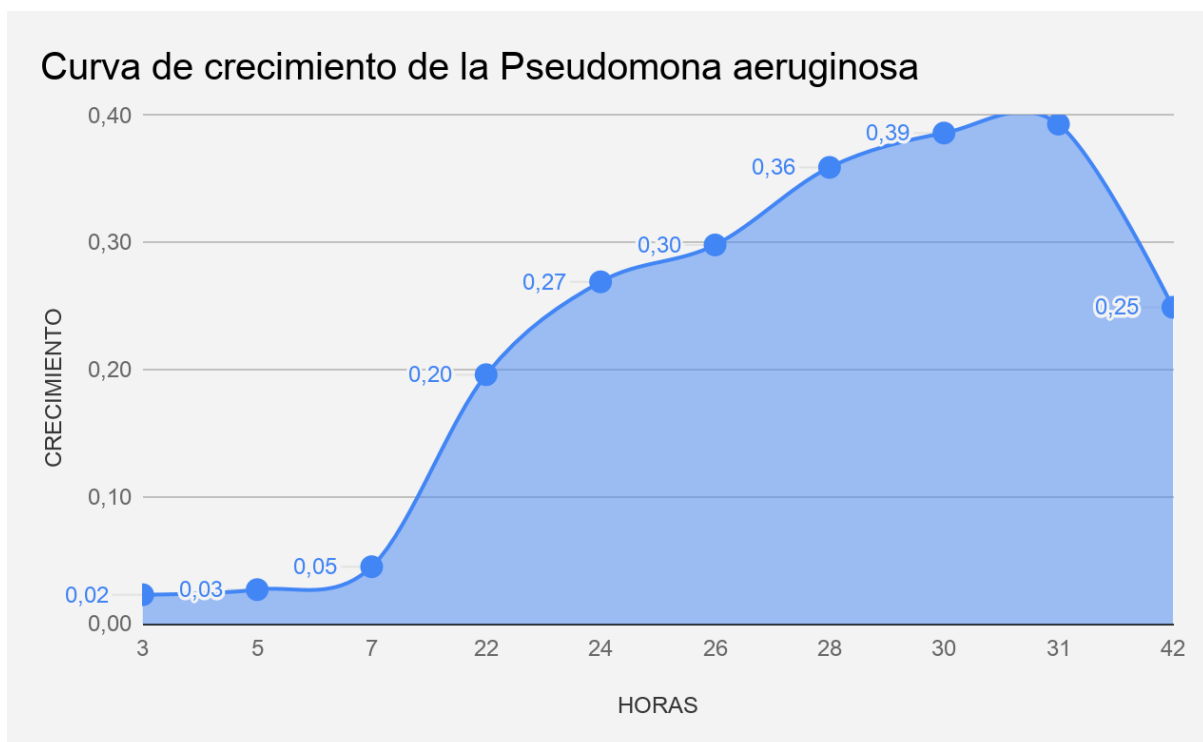
6.2.4.1 Control de calidad de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos.

El control de calidad se llevo a cabo utilizando cepas de la American Type Culture Collection (AATCC), *P. aeruginosa* ATCC27853.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa*

La curva de la cinética de crecimiento de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, mostró una fase de adaptación de 7 horas, una fase de crecimiento exponencial de 11 horas, una fase estacionaria de 1 hora 30 min, y una fase de muerte celular que inició a las 31 horas 30 min.. A continuación, se presenta la cinética de la *P. aeruginosa* estudiada. Gráfica 1.



Gráfica 1. Cinética de crecimiento en 48 h de *la Pseudomonas aeruginosa*. Fuente propia.

7.2 Resultado de la concentración mínima inhibitoria – CMI.

Los extractos *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia*, fueron leídos a 625 nm en el espectrofotómetro en donde mostraron ser no inhibitorios a la *Pseudomonas aeruginosa*. Dicho procedimiento se realizó por duplicado para confirmar los resultados y se tomó la lectura promedio de éstas con el fin de hallar la lectura media (Tabla #3).

No se observó ninguna actividad de los dos extractos evaluados, sobre la cepa de *Pseudomona aeruginosa*. Seguidamente se procedió a tomar dos cajas de Petri con agar cetrimide, las cuales fueron inoculadas previamente con la bacteria, se colocaron 100µL de ambos extractos, con el fin de evaluar su cinética. Finalmente, se confirmó la ausencia de actividad bactericida sobre estas cepas microbianas.

Nombre		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Cordia dentata</i>	A	4.394	3.808	3.837	1.975	1.758	1.505	1.218	1.425	1.064	1.354	1.375	1.428
<i>Malachra alceifolia</i>	B	4.160	5.242	4.800	2.331	1.902	1.557	1.255	1.198	1.370	1.341	1.396	1.409
Control de <i>P. aeruginosa</i>	C	1.575	1.434	1.412	0.930	0.147	0.146	0.129	0.128	0.222	0.156	0.158	0.156
Cloroformo	D	1.825	1.252	1.512	1.409	1.342	1.152	1,393	1.401	1.431	1.420	1.434	1.479
Antibiótico Gentamicina	E	0.131	0.171	0.170	0.210	0.228	0.169	0.185	0.216	0.222	0.223	0.276	0.181
Agua destilada	F	0.100	0.116	0.144	0.160	0.155	0.162	0.145	0.157	0.112	0.156	0.158	0.199
Caldo nutritivo	G	0.498	0.759	0.149	0.133	0.143	0.156	0.153	0.138	0.126	0.117	0.173	0.141

Tabla #3. Lectura media de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de cloroformo de *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia* (A y B), frente a la cepa de *Pseudomona aeruginosa*, sin presencia de los extractos (C), con cloroformo (D) y gentamicina (E). Fuente propia.

8. DISCUSIÓN

Las especies del género *Cordia* son empleadas como alternativa terapéutica en numerosas patologías de manera empírica en la medicina popular. Sin embargo, existen reportes que describen las propiedades etnofarmacológicas, entre ellas antimicrobiano, modificador de antibióticos, antiinflamatorio, antinociceptivo, antifertilidad, toxicidad, mordida de serpiente, hipolipidémico, inmunomodulador, insecticida y antioxidante (Fagner E., et al., 2015). Estudios previos han evaluado muchas especies del género *Cordia* en relación con su potencial antibacteriano Salazar A. y col. (2011), realizaron estudios para determinar la actividad antibacteriana del extracto de *C. boissierie*; observaron actividad contra bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* y *Acinetobacter baumannii*). En contra posición a nuestros resultados, no se encontró susceptibilidad de la *Pseudomona aeruginosa* a los extractos de plantas probadas, muy posiblemente debido a que los componentes de los extractos clorofórmicos no tienen actividad bacteriostática o bactericida para la bacteria. Otra plausible explicación estaría en que los extractos clorofórmicos de *Cordia dentata* y *Malachra alceifolia* fueron obtenidos a partir de las hojas de la planta, mientras que previos estudios han demostrado, que la concentración de compuestos con actividad antimicrobiana se ha encontrado en flores e incluso en la corteza de la planta el (Salazar A., et al.; 2011; Nariya et al., 2011).

Por otro lado, un estudio anterior ha demostrado actividad antimicrobiana de extractos de las hojas de *Cordia verbenácea*, contra *S. aureus* y *E. coli* (Pinhol et al., 2012). Los extractos utilizados en este estudio fueron obtenidos a partir de *Cordia dentata*, y adicionalmente, se usó una cepa multirresistente de *Pseudomonas aeruginosa*, que posiblemente no tiene moléculas

blanco para los compuestos de los extractos probados, o que su carácter de multirresistencia puede estarle confiriendo protección contra los Fito-extractos.

La *Malachra alceifolia* es utilizada para tratamientos febriles, inflamatorios, antipirético, diurético, alergias, galactógeno, abscesos, golpes, hinchazones, suplemento de proteínas y vitaminas, inflamación piel, vaginitis y lavados vaginales (Zurita, N. S., Navas, M. À. L., 2014). Además, hay estudios realizados por el Laboratorio de Química de Medicamentos de la Universidad de Cartagena, donde se determinó que la *Malachra alceifolia* posee actividad antileishmanial, antioxidante, antimicrobiana e hipoglicemiante, con respecto a la *Cordia dentata* se obtuvo que poseía capacidad antioxidante, antimicrobiana e hipoglicemiante (resultados no publicados). Un estudio hecho con *Cordia dentata*, *Heliotropium indicum* y *Momordica charantia* frente a las cepas de las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y la *Pseudomona aeruginosa*, mostro que *P. aeruginosa* fue susceptible a la *Cordia dentata* en solución de hexano (Cervantes et al., 2017).

Lo anteriormente expuesto abre la posibilidad de probar extractos de las mismas plantas usando flore, corteza y raíces con solventes de mayor polaridad.

9. CONCLUSIONES

Los extractos completos obtenidos a partir del solvente cloroformo, fueron ineficientes frente a cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, por no mostrar algún efecto bacteriostático o bactericida frente a este microorganismo.

Los extractos completos obtenidos a partir del solvente cloroformo de *Malachra alceifolia* y *Cordia dentata* no funcionan para hacer algún procedimiento clínico o terapéutico con el fin de generar alguna acción en contra cepas multiresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*.

10. RECOMENDACIONES

Este estudio invita a estudiantes y/o docentes del campo de la medicina a analizar y trabajar sobre nuevas alternativas para el control de distintos patógenos que afectan la salud pública, llevando a la farmacología a proponer tratamientos alternativos que reduzcan la generación de cepas multirresistentes y reduciendo a su vez los efectos secundarios generados por el uso de antibióticos en los pacientes.

Se recomienda realizar estudios con los mismos extractos utilizando los solventes de acetato de etilo y metanol acidificado debido a que presentan menos polaridad donde posiblemente se obtengan compuestos diferentes con actividad antimicrobiana, lo que no se observó con el solvente del cloroformo. No obstante, a pesar de no haber tenido un efecto los extractos sobre la cepa de la *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, se ha comprobado con anteriores estudios que sus propiedades antimicrobianas son efectivas, lo cual promueve a seguir haciendo ensayos que lleven a evaluar su efecto en otros agentes infecciosos oportunista.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁLVAREZ C, CASTRO A, GONZALEZM, JIMÉNEZ M. 2005. Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. scielo. vol.53.
- BARCENILLA F., JOVER A., VALLVERDÚ M. Y CASTELLANA D. 2008. Nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de las bacterias multirresistentes en Unidades de Cuidados Intensivos. *Revista Esp Quimioter* (21), 9-13.
- BENAVIDES E., HERNÁNDEZ G., ROMERO A., CASTRO H., RODRÍGUEZ J. 2001. Evaluación preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*) como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: ixodida). *Rev Colomb Entomol.* 27(1-2), 1-8.
- BRITO, A., LANDAETA, J. M., ROLDÁN, Y., MARCANO, M., SANTOS, J. R., GUZMÁN, M., & CARMONA, O. (2000). Resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a la gentamicina, tobramicina amikacina en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 20(1), 01-01.
- CALDERÓN ROJAS, G., & AGUILAR ULATE, L. (2017). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica Y Centroamérica*, 73(621), 757-763.
- CIRES M. 2002. La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. *Rev Cubana Med Gen Integr* 18 (2).
- FAGNER E., FERREIRA E., SILVA A., CARVALHO V., MELO H., COSTA J. The genus *Cordia*: botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 25 (5) 542-552, 2015.
- FLORIÁN, C., ALVARADO, D., COHA, J. (2006). Evaluación in vitro de la resistencia a ciprofloxacina en biopelículas y poblaciones planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 67, No. 4, pp. 290-297).
- GARCÍA A., ABADIA B., BARAHONA R. , SÁNCHEZ S. (2009). Caracterización fitoquímica de factores antinutricionales en las hojas de uvito (*cordia dentata* poir) phytochemical characterization of the antinutritional factors in the uvito leaves *cordia dentata* poir.
- GARCÍA F. 2001. Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta méd. costarric* 43(3).

HORNA QUINTANA, G., SILVA DÍAZ, M., VICENTE TABOADA, W., & TAMARIZ ORTIZ, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39-45.

GÓMEZ E. H., DÍAS C. F., FRANCO O. L., MERCADO C. J., GUZMÁN L. J., MEDINA J. D., GAITÁN I. R. (2001). Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview.

LIVERMORE D. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare?. *Clinical Infectious Diseases* (34), 634-640, 2002.

MARTÍNEZ, L. M., & HERNÁNDEZ, Á. P. (2002). Mecanismos de resistencia a las carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa*.

MOJICA P, CUÉLLAR S. 2015. Productos fitoterapéuticos.

Rosset, C. I., Manzo, R. H., & Alovero, F. (2013). Polímero catiónico propicia acción bactericida de vancomicina frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

SÁNCHEZ M. (2010). Propiedades bioquímicas y biofísicas de ramnolípidos biotensioactivos 19-93.

SOTO L. Resistencia bacteriana. *Revista Cub Med Mil* 8(1), 2003.

MELLA S., SEPÚLVEDA A., GONZÁLEZ R., BELLO T., DOMÍNGUEZ Y., ZEMELMAN Z. Y RAMÍREZ G. (2004). Aminoglycosides-aminocyclitols: Structural characteristics and new aspects on resistance. *Rev Chil Infect* ; 21 (4): 330-338.

VILLALOBOS, K., & HERRERA, M. L. (2001). Pruebas de sensibilidad a los antibióticos; su utilidad según agente infeccioso. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 69-76.

STANCHI O.N, MARTINO E. P., GENTILINI E., REINOSO E. H., ECHEVERIA M. G., LEARDINI A. N., COPES A. J. (2007). *Microbiología Veterinaria*, (21) 235-236.

L. IAM. (2017). Evolution of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*^[1]_[SEP]. One health organization. UNMSM. Facultad de Medicina.

GUALTIERI, M. J., GONZÁLEZ, M. C., CONTRERAS, K. P., NOGUERA, M. C., UZCÁTEGUI, E. E., VILLASMIL, S., & VILLALTA, C. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39(2), 12-16.

HORNA QUINTANA, G., SILVA DÍAZ, M., VICENTE TABOADA, W., & TAMARIZ ORTIZ, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana*, 16(1), 39-45.

- MAGUNA, F. P., ROMERO, A. M., GARRO, O. A., & OKULIK, N. B. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: Facultad de Agroindustrias.*
- ZURITA, N. S., & NAVAS, M. À. L. (2014). Interpretación Ambiental de INBioparque, La Finca.
- ZAMORA, N., GONZÁLEZ J. & POVEDA, L. J. (1999). Árboles y Arbustos del Bosque Seco de Costa Rica. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica.
- MORENO C, GONZÁLEZ R, BELTRÁN C. (2009). Antimicrobial resistance mechanisms in respiratory pathogens. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello*; 69:185-192.
- LOERA-VALENZUELA, P.B., LOPEZ-ORTIZ, C.E. & ROMERO-VELA, C.D. & LUEVANOS ESCAREÑO, MIRIAM & BALAGURUSAMY, NAGAMANI. (2016). Mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos en bacterias. *Revista Medicina de Tlaxcala*. 8(67).
- BREIYEH Z., JUBETH B., KARAMAN R.(2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Artículo de Avances en la química medicinal: nuevos objetivos y mecanismos, nuevas drogas, nuevas esperanzas 2020* 16;25(6).
- ROS, L. B. B. (2018). Título: Resistencia antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa*: Situación epidemiológica en España y alternativas de tratamiento (doctoral Dissertation, universidad Complutense).
- XU, Z., XU, X., QI, D., YANG, L., LI, B., LI, L., CHEN, D. (2017). Effect of aminoglycosides on the pathogenic characteristics of microbiology. *Microbial pathogenesis*, 113, 357-364.
- BOUSSEKEY, N., & ALFANDARI, S. (2007). Aminoglucósidos. *EMC-Tratado de Medicina*, 11(1), 1-4.
- TAFUR J., TORRES J., VILLEGAS M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Centro Internacional de Investigaciones Médicas. Volumen 12(3)
- CERVANTES CEBALLOS, L., SÁNCHEZ HOYOS, F., GÓMEZ ESTRADA, H. (2017). Antibacterial activity of *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn and *Momordica*

- charantia Linn from the Northern Colombian Coast. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 46(2), 143-159.
- GONZÁLEZ, C. L. (2017). *infecciones nosocomiales, importancia de pseudomonas aeruginosa* (doctoral dissertation, universidad complutense).
- HERNÁNDEZ, A., YAGÜE, G., VÁZQUEZ, E. G., SIMÓN, M., PARRADO, L. M., CANTERAS, M., GÓMEZ, J. (2018). Infecciones nosocomiales por pseudomonas aeruginosa multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 123.
- LEÓN S. (2010). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. *Salud en Tabasco*, vol. 16, núm.
- RAMOS J. (2014). *Malachra Alceiforme Jacq.*
- SALAZAR-ARANDA, R., PÉREZ-LOPEZ, L. A., LOPEZ-ARROYO, J., ALANÍS-GARZA, B. A., & WAKSMAN DE TORRES, N. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- NARIYA, P. B., BHALODIA, N. R., SHUKLA, V. J., & ACHARYA, R. N. (2011). Antimicrobial and antifungal activities of *Cordia dichotoma* (Forster F.) bark extracts. *Ayu*, 32(4), 585.
- L.D. PINHOL, P.N.S.S. MACEDO, E.A. ERNANE, A.C. SOBRINHO, R. MARTINS ATIVIDADE. Antimicrobiana de extractos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Cienc. Rural*, 42 (2012), pp. 326-331
- PUALOMINO, J., PACHÓN, J. (2003). *Aminoglucósidos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(2), 105–115. doi:10.1016/s0213-005x(03)72893-6.