



**Universidad  
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Medicina

Escuela de Tecnología Médica

**“EXTRACTO DE *LUPINUS ALBUS* COMO TRATAMIENTO  
ANTIMICROBIANO”**

Unidad de investigación  
presentado en conformidad a los requisitos para optar  
al Título de Tecnólogo Médico con especialidad en  
Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre

Autores:

Natalia Ramírez Jofré

Cristian Montecinos Saavedra

Profesores Guías:

Dr. Alberto Cornejo Mora

Dr. Nicolás Villagra Marín

Sede Republica, Enero del 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

*“La felicidad no es hacer lo que uno quiere,  
si no querer lo que uno hace.”*

**Jean Paul Sartre**

Agradecemos en primera instancia al Dr. Alberto Cornejo M. y al Dr. Nicolás Villagra M., tutores de esta unidad de investigación, por su tiempo y aprendizajes impartidos, como también la confianza depositada en nosotros.

También agradecer al equipo de trabajo de la unidad de microbiología del laboratorio CIMIS de la Universidad Andrés Bello y a la personas del departamento de Productos Naturales de la Universidad de Chile, por la gran acogida y su constante disposición a ayudarnos en lo referente a las instalaciones. Incorporar también al Técnico Don Víctor Fuentes por su constante preocupación y ayuda durante el desarrollo de esta tesis.

A la Escuela de Tecnología Médica y a la Universidad Andrés Bellos por los conocimientos y valores entregados durante nuestros años de estudios.

Finalmente agradecer enormemente a nuestras familias, los cuales fueron pilares importantes tanto emocionales como psicológicamente durante el desarrollo de nuestra tesis.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen

Abstract

CAPÍTULO I.	1
I.1 INTRODUCCIÓN	1
I.2 MARCO TEÓRICO	5
I.2.1 Enfermedades transmisibles	5
I.2.2 Infecciones asociadas a la atención de salud	6
I.2.3 Bacterias Gram negativo y su asociación en IAAS en Chile	8
I.2.4 Un nuevo problema para la Salud Pública	9
I.2.5 ¿Qué necesito saber de las resistencias bacterianas?	13
I.2.6 ¿Cómo funciona la resistencia bacteriana?	14
I.2.6.1 Modificación del sitio blanco	15
I.2.6.2 Cambio de la permeabilidad en las Porinas	16
I.2.6.3 Bombas de expulsión	16
I.2.6.4 Modificación enzimática	17
I.2.7 ¿Cómo se puede combatir esta problemática?	21
I.2.8 <i>Lupinus albus</i>	24
I.2.8.1 Historia	24
I.2.8.2 Estudios asociados	25

CAPÍTULO II.	26
II. 1 HIPÓTESIS	26
II.2 Objetivos	26
II.2.1 Objetivo general	26
II.2.2 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO III.	27
III.1 MATERIALES	27
III.1.1 Reactivos	27
III.1.2 Cepas de estudios	28
III.1.3 Medios de cultivos	29
III.1.4 Soluciones	30
III.1.5 Extracto natural y antibiótico utilizado	31
III.2 METODOLOGÍA	32
III.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC)	32
III.2.2 Estudio de susceptibilidad	34
III.2.2.1 Activación bacteriana	35
III.2.2.2 Evaluación de pureza bacteriana	35
III.2.2.3 Preparación de solución bacteriana para ensayo por CIM	36
III.2.2.4 Preparación de dilución seriada del extracto de <i>L. albus</i>	37
III.2.2.5 Ensayo por CIM	38

III.2.3 Evaluación del posible mecanismo de acción	40
III.2.3.1 Preparación de la solución del extracto a utilizar para extracción de proteína de membrana y ensayo con CCCP.	40
III.2.3.2 Extracción de proteína de membrana	41
III.2.3.3 Preparación del gel	43
III.2.3.4 Tinción coloidal de azul de Coomassie	43
III.2.3.5 Evaluación de bombas de expulsión	45
 CAPÍTULO IV.	 47
IV.1 RESULTADOS	47
IV.1.1 Perfil cromatográfico y recolección	47
IV.1.2 Estudio de CIM en bacteria Gram negativo	51
IV.1.3 Mecanismo de acción	53
IV.1.3.1 Bombas de expulsión	53
IV.1.3.2 Electroforesis de proteína de membrana externa	54
 CAPÍTULO V.	 56
V.1 DISCUSIÓN	56
V.1.1 Compuestos obtenidos del HPLC	56
V.1.2 CIM	58
V.1.3 Explicación del posible mecanismo de acción	61
V.1.3.1 No hay participación de bombas de expulsión	61
V.1.3.2 Existen cambios en las proteína de membrana	62

CAPÍTULO VI.	64
VI.1 CONCLUSIONES	64
VI.1.1 Conclusión general	64
VI.1.2 Conclusiones específicas.	64
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1: Principales sitios de infección y sus factores de riesgos.	7
Tabla I.2: Principales agente infecciosos en ITU por catéter urinario en adulto.	8
Tabla I.3: Principales agentes infecciosos asociados a infección del torrente sanguíneo (ITS).	9
Tabla I.4: Algunos ejemplos de mecanismos de resistencias.	15
Tabla I.5: Clasificación de las $\beta$ -lactamasas según diferentes autores.	20
Tabla I.6: Principales grupos químicos con actividad antimicrobiana en algunas plantas conocidas por la población.	23
Tabla III.1: Cepas trabajadas con sus respectivos códigos internos del laboratorio.	28
Tabla III.2: Reactivos y volúmenes necesarios para la preparación del gel poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE al 20%)	43
Tabla IV.1: Tiempo de retención de cada peak recolectado	48

Tabla IV.2: Evaluación de los criterios para el NMR	50
Tabla IV.3: CIM de las cepas <i>K. pneumoniae</i>	51
Tabla IV.4: CIM de los bacilos Gram negativo no fermentadores	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1: Dilución seriada del extracto de <i>L. albus</i>	38
Figura III.2: Esquema explicativo de la CIM en la placa de ELISA de 96 pocillos.	39
Figura IV.1: Traspaso de los CIM de los micropocillos a agares de M-H.	52
Figura IV.2: Benchmark pre-stained. Estándar de proteína.	54
Figura IV.3: Resultados de la corrida electroforética.	55
Figura V.1: Diagrama explicativo de las diluciones y concentraciones teórica en el agar M-H.	59
Figura V.2: Control negativo DMSO 1/5.	59

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico IV.1: Perfil cromatográfico base	47
Gráfico IV.2: Evaluación de pureza del peak N°1	49
Gráfico IV.3: Evaluación de pureza del peak N°7	49
Gráfico IV.4: Evaluación de pureza del peak N°8	49
Gráfico IV.5: Evaluación de pureza del peak N°9	50

## RESUMEN

Enterobacterias y bacilos Gram negativo no fermentadores han cobrado una gran importancia en la Salud Pública; “*Klebsiella pneumoniae* (enterobacteria), *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (bacilos Gram negativos no fermentadores)”. En el siglo XXI ha sido uno de los temas más importantes que afectan a pacientes con cuadros infecciosos, pues estas mencionadas especies participan en un gran número de procesos patogénicos.

Su importancia no sólo radica en enfermedades agudas, sino también en la implicancia de un nuevo concepto, la resistencia a antimicrobianos. Existen diferentes mecanismos de resistencia, tales como **formación de enzimas, alteración en las proteínas de membrana externa, creación de bombas de expulsión**, etc., pero actualmente preocupan las bacterias conocidas como “Súper Bugs” o “Multidrug resistant”. Estos tipos de microorganismos tienen una infinidad de mecanismos de resistencia las cuales generan el fenómeno de multi-resistencia, es decir son resistentes a una gran cantidad de antimicrobianos.

Bajo esta problemática se comenzó a utilizar el concepto de fitoterapia; aprovechar las propiedades medicinales de algunas plantas para tratar enfermedades. Investigaciones han demostrado la efectividad antimicrobiana que presentan algunos principios activos de ciertas plantas, con la finalidad de combatir contra las bacterias, pero son pocos los estudios enfocados en evaluar su utilidad frente a bacterias multi-resistentes.



El presente estudio evaluó la efectividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Lupinus albus* frente a cepas *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* obtenidas de pacientes que se vieron afectados por algún cuadro infeccioso. Todas ellas presentaron el fenómeno de multi-resistencia a la hora de evaluar su antibiograma.

Utilizando la técnica de dilución en caldo, los resultados obtenidos muestran claramente que el extracto de *L. albus* posee un CIM de 50 mg/mL en *K. pneumoniae* y de 100 mg/mL en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Además se logró establecer que el extracto de la planta tiene la capacidad de alterar las proteínas de membrana en la bacteria, lo que le confiere la actividad microbicida.

**PALABRAS CLAVES:** Resistencia Bacteriana, Fitoterapia, Extracto Metanólico, *Lupinus albus*, Súper bugs.

## ABSTRACT

Enterobacteriaceae and Gram-negative fermenters have gained great importance in public health; "*Klebsiella pneumoniae* (enterobacteria), *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* (non-fermenting Gram negative bacilli)". In the XXI century it has been one of the most important issues affecting patients with infectious processes, as these mentioned species are involved in a large number of pathogenic processes.

Its importance lies not only in acute diseases, but also the implications of a new concept, antimicrobial resistance. There are different mechanisms of resistance, such as formation of enzymes, altered outer membrane proteins, creation of efflux pumps, etc., but currently concern bacteria known as "Super Bugs" or "multidrug resistant". These types of microorganisms have infinite resistance mechanisms which generate the phenomenon of multidrug resistance, this is they are resistant to a large number of antimicrobials.

Under this problem it began using the concept of herbal medicine; take advantage of the medicinal properties of some plants to treat diseases. Research has shown that the antimicrobial effectiveness has some active ingredients of certain plants, in order to fight against bacteria, but few studies focused on evaluating its usefulness against multi-resistant bacteria.

This study evaluated the antimicrobial effectiveness of *Lupinus albus* methanol extract against strain *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* obtained from patients who were affected by a bacterial infectious condition. All of them presented the phenomenon of multi-resistance when assessing their susceptibility.

Using the broth dilution technique, the results clearly show that the *L. albus* extract has an MIC of 50 mg/mL in *K. pneumoniae* and 100 mg/mL in *P. aeruginosa* and *A. baumannii*. Furthermore it was established that the plant extract has the ability to alter membrane proteins in bacteria, which gives the microbicidal activity.

**KEY WORDS:** Bacterial Resistance, Phytotherapy, Methanol Extract, *Lupinus albus*, Super bugs.

# CAPÍTULO I.

## I.1 INTRODUCCIÓN

En el planeta Tierra existe una gran variedad de bacterias, pero quizás uno de los grupos más importantes corresponde a la familia *Enterobacteriaceae*, éstas se visualizan como bacilos Gram negativos. Compuesto por más de 100 especies, se encuentran distribuidas de forma global en suelo, agua, plantas e inclusive forman parte de la flora intestinal de diversos animales como por ejemplo en el ser humano, trayendo diversos beneficios para la salud humana (1) (2). Lamentablemente a pesar de las enormes ventajas que esta familia de bacteria presenta al hombre y a otros seres vivos, se ha visto su participación en diferentes procesos infecciosos para los pacientes, como por ejemplo en el tracto urinario (ITU), respiratorio e inclusive en bacteremia (3).

Actualmente las enterobacterias no sólo son un problema por los procesos infecciosos que generan, pues por diferentes motivos que se mencionarán más adelante, éstas y otros grupos de bacterias evolucionaron, siendo capaces de crear diversos métodos para generar resistencia a los antimicrobianos. Esto sumado a que cada año aumentan los casos reportados y además, al estar constantemente diseminándose por el mundo, ha generado que este tema sea considerado un grave problema en la Salud Pública de todos los países (4).

Otro grupo bacteriano de igual importancia clínica corresponde a los bacilos Gram negativo no fermentadores, principalmente las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, las cuales también han participado en diversos procesos infecciosos semejante al de las enterobacterias como también se ha visto su participación en el fenómeno de multi-resistencia (5).

Existen diversos mecanismos de resistencia antimicrobiana generada por las bacterias, pero quizás las de mayor importancia en enterobacteria corresponden a las  $\beta$ -lactamasas, de las cuales las carbapenemasas son las que ha cobrado mayor interés en la actualidad. Existe una diversidad de carbapenemasas en este mundo, pero quizás sean las KPC (clase A), VIM y NDM (clase B o también llamadas métalo- $\beta$ -lactamasa) y la OXA-48 (clase D) las de mayor importancia clínica por la frecuencia que se han presentado (6).

Desafortunadamente, las empresas farmacéuticas han perdido todo interés en la creación de nuevos antimicrobianos al encontrar en ellos que no es beneficioso para la empresa (7), dejando a los médicos con una limitada batería de antimicrobiano para enfrentar los diferentes procesos infecciosos generados por las bacterias. Esto genera que los microorganismos multi-resistentes no respondan a los tratamientos triviales, conllevando a que los pacientes presenten un cuadro infeccioso más prolongado y con una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Además se corre el riesgo, que estos mecanismos de resistencia sean transmitidos a otras especies bacterianas (8).

Para intentar solucionar esta problemática, diversos investigadores de forma autónoma, han decidido estudiar nuevos tratamientos alternativos, utilizando principalmente productos naturales, ya sea flores, tallos, semillas, entre otros. La fitoterapia es definida como la capacidad del ser humano para utilizar plantas o productos de este tipo con la finalidad de un posible tratamiento médico en diversas enfermedades (9).

Gracias a los diferentes avances tecnológicos como son la Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y Espectrometría de Masa, como también métodos convencionales como la Cromatografía en Columna y sus variantes, se ha logrado identificar diferentes principios activos de las diversas plantas que han sido objetos de estudios, así como son los alcaloides, flavonoides, ácidos, entre otros que han mostrado una acción farmacológica no solo para el tratamiento de diversas enfermedades agudas, sino que también crónicas (10).

Bajo la información científica que se tiene, diferentes gobiernos a nivel mundial han decidido publicar textos con la finalidad de educar a la gente en relación a las plantas y sus posibles efectos sanatorios en algunas enfermedades, donde Chile ha querido participar en esta iniciativa y en el año 2009, bajo el mandato de la Presidente Michelle Bachelet Jeria, el Ministerio de Salud (MINSAL) publicó un manifiesto llamado “Medicamentos Herbarios Tradicionales”, la cual recolecta la información de más de 100 especies de plantas y su utilización en diferentes trastornos que padece la gente en el día a día (11).

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la efectividad antimicrobiana de un extracto de planta llamada científicamente *Lupinus albus* y nombrada por la gente como altramuz blanco o lupino blanco, con la finalidad de investigar detalladamente los efectos beneficiosos que pudieran existir en la citada planta, para que en un futuro no muy lejano pueda ser puesta a disposición de la sociedad y ayudar en la mejora de la salud de las personas que padecen patologías asociadas a infecciones por patógenos Gram negativo.

## **I.2 MARCO TEÓRICO**

### **I.2.1 Enfermedades transmisibles:**

En el mundo las causas de mortalidad son muy variadas, desde enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer o enfermedades respiratorias crónicas, todas estas categorizadas como enfermedades no transmisibles o crónicas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (12) y son las que mayor tasa de mortalidad poseen a nivel mundial (13). Pero existe otro grupo llamado Enfermedades Transmisibles o Infecciosas, las cuales a pesar de que su porcentaje de mortalidad es inferior al grupo anterior, sigue siendo de importancia clínica por la alta tasa de morbilidad que posee.

Según la OMS, en su reporte anual del año 2015 estimó que por cada 100.000 habitantes, mueren aproximadamente 178 personas a causas de enfermedades transmisibles (14).

En Chile en el año 1995 las enfermedades infecto-contagiosa fueron la primera causa de muerte, pero en la actualidad ha disminuido (15). Según datos obtenidos del Departamento de Estadísticas e Información de Salud (Ministerio de Salud de Chile, MINSAL), de un total de 98.711 defunciones, se estimó que fallecieron 2.161 personas como consecuencia de ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (Código A00-B99), a esta cifra se le puede sumar un cierto porcentaje de la defunciones productos de enfermedades respiratorias (por ejemplo neumonía, influenza, etc.) y genitourinario (infección del tracto urinario, ITU) (Código J00-J99 y N00-N99 respectivamente) (16).



## **I.2.2 Infecciones asociadas a la atención de salud:**

Las infecciones pueden ser extra-hospitalarias (afectan a pacientes sanos que se ven obligados a detener su rutina diaria e ir a consultar a un Centro Médico sobre su condición de salud) o Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), también llamadas nosocomiales, siendo este último uno de los principales problemas que presentan los pacientes ingresados en los Hospitales (17).

Según la OMS, define como IAAS a toda infección contraída por el paciente durante su estadía en el Hospital o Centro Médico y que esta persona no tenga y/o ni estaría incubando la infección por el patógeno en el momento de su ingreso (18). Diversas son las causas que originan estas infecciones y estas se pueden agrupar en 3 factores principalmente; Factores del huésped (edad, estado, inmunitario), Factores del Agente Infeccioso y Factores del Ambiente (19).

Tabla I.1

Principales sitios de infección y sus factores de riesgos

Sitio de infección	Factores de riesgo
Infección de tracto urinario	Sexo femenino Severidad de la enfermedad Cateterización de tracto urinario Roturas en el sistema cerrado Edad avanzada
Neumonía	Enfermedad subyacente (estado mental alterado, diabetes, alcoholismo) Malnutrición Severidad de la enfermedad Antihistamínicos H2, antiácidos Intubación, ventilación mecánica, equipamiento para terapia respiratoria, traqueotomía
Primaria de flujo sanguíneo	Edades extremas Severidad de la enfermedad Enfermedad subyacente, inmunosupresión, quemaduras Dispositivos intravasculares
Sitio quirúrgico	Edad avanzada Malnutrición Severidad de la enfermedad Afeitado preoperatorio Clasificación de la herida Tipo de procedimiento Prótesis

Unahalekhaka et al., 2011.

Está claro, que estas infecciones no solo tienen una importancia médica desde el punto de vista de la salud del paciente, sino que también la tiene económicamente. Algunos estudios realizados en Estados Unidos (USA), estiman que el recinto hospitalario puede incrementar hasta \$12.197 dólares por cada IAAS contraída en el lugar (20). A la par, ciertas investigaciones en Turquía sugieren que un paciente con IAAS prolonga su estadía en 23 días y además genera un gasto extra de \$2.026 dólares, en comparación a aquellos que no lo presentaban (21).

En Chile, a causa de la gran problemática que están generando la IAAS a nivel mundial, en 1983 se decidió crear el programa de Prevención y Control de Infecciones Asociadas a Atención en Salud (PNCI) comandado por el MINSAL, la cual tiene como finalidad disminuir las IAAS y los brotes epidémicos (22). En un informe entregado en el año 2013, se reportó un total 7232 casos de IAAS por parte de los hospitales asociados a este programa (23).

### I.2.3 Bacterias Gram negativo y su asociación en IAAS en Chile:

En Chile, los casos de más reporte por parte de los Hospitales participante al PNCI corresponde a ITU, neumonías no asociadas a ventilación mecánica, bacteremias y las infecciones de heridas operatorias (24). En Chile se observa que la mayor cantidad de agente infeccioso se encuentra en la categoría de bacilos Gram negativo (25), la cual se visualiza en las siguientes tablas.

Tabla I.2  
Principales agentes infecciosos en ITU por catéter  
urinario en adulto

Agente	Casos	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	528	26,01
<i>Escherichia coli</i>	432	21,28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	218	10,74
<i>Enterococcus faecalis</i>	196	9,66
<i>Candida albicans</i>	187	9,21
<i>Proteus mirabilis</i>	108	5,32
Otros	361	17,78
TOTAL	2030	100,00

Otaíza O’Ryan et al., 2013

Tabla I.3

Principales agentes infecciosos asociados a infección del torrente sanguíneo (ITS)

Agente	Casos	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	223	22,48
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	117	11,79
Staphylococcus coagulasa negativo	110	11,09
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	107	10,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60	6,05
<i>Acinetobacter baumannii</i>	56	5,65
<i>Escherichia coli</i>	42	4,23
<i>Enterobacter cloacae</i>	37	3,73
<i>Candida albicans</i>	33	3,33
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	27	2,72
Otros	180	18,15
TOTAL	992	100

Otaíza O’Ryan et al., 2013

*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* bacterias que serán objetivo de este estudio se puede apreciar su participación en varios procesos infecciosos informadas por los Hospitales (26).

#### **I.2.4 Un nuevo problema para la Salud Pública:**

En el siglo XX se creyó que era el fin de la infecciones bacterianas, ya que Alexander Fleming había descubierto accidentalmente un compuesto que era capaz de impedir el crecimiento bacteriano, la penicilina (nombre que recibe en honor al hongo que lo sintetizaba, el *Penicillium notatum*) (27). Gracias a este avance científico, las infecciones por microorganismos pasaron a ser un tema de menor importancia, dándole prioridad a las enfermedades crónicas, la cual actualmente son las principales causas de muerte a nivel mundial según las OMS (28). No obstante se mal utilizó; en infecciones virales, dosis inadecuadas, aplicaciones agrícolas, entre otros, lo que conllevó al fenómeno que actualmente se conoce como resistencia antimicrobiana (29).

El reporte más antiguo que se tiene sobre la resistencia bacteriana fue en el año 1945 cuando se encontró la primera cepa de *Staphylococcus aureus* que era resistente a la penicilina (antimicrobiano descubierto 17 años antes) la cual generó una alarma en el campo de la medicina (30). Se ha descubierto y demostrado la efectividad de nuevos antimicrobianos pero se siguen reportando casos de resistencia al día de hoy. En el año 1955 se descubrió un compuesto que podría ayudar a erradicar las bacterias Gram positiva, la vancomicina (nombre derivado de la palabra Vaquish, que significa vencedor), pero nuevamente nos encontramos en un mal escenario, pues por a su mala utilización ocasionó que en el año 1986 se reportaran las primeras bacterias Gram positivas resistentes a este antibiótico, los *Enterococcus spp.*, incluso en 1996 se informa de la primera cepa *S. aureus* resistente a este mismo antimicrobiano (31).

En las bacterias Gram negativo, el panorama actualmente no es muy diferente e incluso es peor, pues fueron la *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*, las primera enterobacterias en ser reportadas como multi-resistentes en la década de los 50, debido a que éstas eran resistentes a una gran cantidad de antimicrobianos (32). No sólo enterobacterias han generado el fenómeno de multi-resistencia, también otras bacterias de importancia clínica por la incidencia que poseen, como lo son bacilos Gram negativo no fermentadores, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* pues estos tienen una infinidad de mecanismos diferentes para poder generar la resistencia a una amplia gama de antimicrobianos (mecanismos que se explicaran más adelante) (33).

La OMS publicó un informe titulado “Antimicrobial resistance: global report on surveillance”, en el cual da a conocer la situación de resistencia bacteriana en más de 100 países, lo que es realmente alarmante. En algunos países el tratamiento con cefalosporina de tercera generación ha fracasado, la resistencia antimicrobiana ha generado un aumento de la mortalidad además de incrementar los costos económicos, entre otras conclusiones (34).

Independiente del tipo de resistencia, ha sido un gran problema para la Salud mundial, pues esto implica fracasos en el tratamiento terapéutico e inclusive un aumento de la tasa de mortalidad a causa de estas infecciones. Según la CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades) se reportan 2 millones de personas infectadas por bacterias resistentes anualmente, de las cuales fallecen 23.000 personas al año (35). En cambio la ECDC (Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades) informa de 2,5 millones de personas infectadas anualmente de las cuales fallecen 25.000 al año (36). Se cree que estos datos se incrementan cada año a pesar del enorme esfuerzo que realizan los gobiernos para enfrentar esta problemática.

Bajo este conflicto, el Gobierno Británico decidió publicar un estudio predictivo, el cual establece que en el año 2050 podrían morir más de 10 millones de personas al año además de generar un gasto anual de \$100 billones de dólares asociado a la resistencia bacteriana, lo que podría generar un grave problema económico a nivel mundial (37).

No sólo el estado de la salud del paciente se ve afectado, también ocurre en la situación económica, algunos investigadores han evaluado la diferencia que existe en pacientes con infecciones normales frente a infecciones con bacterias resistentes y han encontrado que estos últimos poseen un aumento en su estadía hospitalaria como también en el gasto que genera (38). La CDC y la ECDC han informado de un gasto anual de 20 mil millones de dólares y 1,5 billones de euros respectivamente (39) (40).

En Chile la situación no es muy diferente, el Ministerio de Salud está en una constante vigilancia frente a estas cepas resistentes. En el año 2007 se creó el Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana (GCRB) en el cual participan más de 30 centros de salud entregando información respecto a este fenómeno. En el año 2012 publicó un estudio, que mostraba las principales bacterias resistentes que afectan a nuestro país las cuales son *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (41). Posteriormente en estudios más recientes, el GCRB indican que se deben vigilar el *S. aureus* meticilino resistente, *Enterococcus spp.* vancomicina resistente y *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* resistente a carbapenémicos, mientras que otros patógenos quedarían a decisión y disposición de cada establecimiento (42).

### **I.2.5 ¿Qué necesito saber de las resistencias bacterianas?:**

Existen 2 tipos de resistencia bacteriana, la primera es conocida como resistencia natural la cual el patógeno es resistente al antimicrobiano ya que carece de alguna estructura o crece en un ambiente característico, un ejemplo claro son los micoplasmas debido a que estos son resistentes a antimicrobianos que atacan a la pared celular, pues carecen de ésta. Otro ejemplo claro son las bacterias anaeróbicas, éstas al crecer en ambientes libres de oxígeno, los aminoglucósidos no tienen actividad frente a estos tipos de patógenos (43).

El otro tipo de resistencia y es la que actualmente han generado diversos problemas es la resistencia adquirida, ésta se genera ya sea por una mutación cromosómica espontánea o por la adquisición de material genético extra-cromosómico (44). Todo esto sumado al fenómeno de transferencia genética horizontal favorece la diseminación de los genes de resistencia (45). Cuatros son los mecanismos que suelen usar las bacterias para transmitir los genes y son; conjugación, transformación, transducción y transposición (46).

Varios son los factores que conllevan a la aparición o diseminación de bacterias resistentes, entre los que se encuentran:

- a) Uso excesivo y prolongado de antimicrobianos de amplio espectro o de última generación en sospecha de cepas resistentes (47).
  
- b) Utilización de antimicrobianos en el ganado y/o aves con la finalidad de engordar, prevenir o tratar infecciones (48).



c) Propagación entre pacientes, familiares de estos o profesionales de la salud que no aplica técnicas básicas de control de infecciones recomendada por la OMS, especialmente en hospitales sobrepoblados o de bajos recursos (49).

d) Venta de antibiótico sin receta médica (50). Situación que se intenta erradicar a nivel mundial, un ejemplo es Chile pues a fines de la década de los '90 las farmacias se vieron obligadas a vender antimicrobianos bajo receta médica (51).

e) Utilización de antimicrobianos en infecciones virales (52)

### **I.2.6 ¿Cómo funciona la resistencia bacteriana?:**

Los antimicrobianos pueden ser clasificados de diferentes maneras, pero para entender el concepto de resistencia bacteriana se optará por la clasificación desde el punto de vista de su blanco de acción. Están los que inhiben la síntesis de la pared celular (ejemplos los  $\beta$ -lactámicos), alteración de la membrana plasmática (polipeptídicos), inhibición de la síntesis de proteína (macrólidos), entre otros (53).

En base a lo mencionado, las bacterias crearon diferentes formas para prevenir los ataques antimicrobianos, los mecanismos de resistencia más comunes están mencionados en la Tabla I.4 (54).

Tabla I.4: Algunos ejemplos de mecanismos de resistencias

<b>Modificación del Sitio Blanco del Antimicrobiano</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cambio D-alanina por D-lactato en peptidoglucanos (resistencia a vancomicina)</li> <li>-Modificaciones ribosomales</li> </ul>
<b>Cambio de Permeabilidad en Porinas</b>	- Mutación en porina D2 (resistencia a cabapenémicos)
<b>Bombas de Expulsión</b>	- Mecanismo para expulsar algunos Antimicrobianos (tetraciclinas, cloranfenicol, etc.)
<b>Modificación Enzimática del Antimicrobiano</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cloranfenicol acetil-transferasa</li> <li>- <math>\beta</math>-lactamasa</li> </ul>

### I.2.6.1 Modificación del sitio blanco:

En estos casos, las bacterias modifican algunos sitios específicos de su composición donde el antimicrobiano posee actividad, como por ejemplo alguna sub-unidad ribosomal, enzima, etc. Este tipo de mecanismo puede estar presente tanto en bacterias Gram negativo como positivo. La modificación de enzimas como la topoisomerasa II (DNA girasa bacteriana) y IV confiere a las bacterias como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, entre otra una resistencia a antimicrobiano de la familia quinolona. Otra enzima que se ha encontrado modificada es la RNA polimerasa, mecanismo comúnmente encontrada en las enterobacterias y la cual les puede conferir resistencia a la rifampicina (55).

Subunidades ribosomales también han sido frecuentemente modificadas por las bacterias, principalmente las subunidades 30s y 50s la que le ha conferido resistencia a macrólidos, tetraciclinas, entre otros. Bacterias anaeróbicas también pueden generar resistencia bacteriana, aunque con menor frecuencia, tal es el caso de *Bacteroides fragilis* y *Clostridium perfringens* cuyas modificaciones en la subunidad 50s le ha permitido ser inmune a tetraciclinas, macrólidos y cloranfenicol (56).

#### **I.2.6.2 Cambio de la permeabilidad en las Porinas:**

Las porinas son canales que están localizadas en la membrana externa de las bacterias Gram negativo, la cual permite el paso de moléculas hidrofílicas hacia el interior de las bacterias. La modificación de esta genera una disminución del paso de antimicrobianos por estos canales, lo que conlleva finalmente al fenómeno de resistencia. Bacterias como *Salmonella typhimurium* poseen porinas conocidas como OmpC, las cuales al ser modificadas, les ha permitido ser resistente a las cefalosporinas de primera generación. Resistencia a aminoglucósidos y carbapenémicos se han informado en *Serratia marcescens*, *E. coli* y *P. aeruginosa* utilizando este mecanismo (57).

#### **I.2.6.3 Bombas de expulsión:**

Estas son proteínas integrales que se encuentran en la membrana celular de bacterias Gram negativo y positivo. Su función principalmente es extraer del interior de la célula bacteriana compuestos dañinos para esta, pues se ha visto la resistencia por este mecanismo no sólo a antimicrobianos como tetraciclinas,  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, entre otros, sino que también a antisépticos y desinfectante de amonio (58).

#### **I.2.6.4 Modificación enzimática:**

En este mecanismo las bacterias sintetizan enzimas que son capaces de modificar la estructura del antimicrobiano, agregando alguna molécula o hidrolizando a éste. Algunos ejemplos son aminoglucósido-acetil-transferasa (resistencia a aminoglucósidos), eritromicina esterasa (resistencia a eritromicina, Grupo MLS), cloranfenicol-acetil-transferasa (resistencia a cloranfenicol) (59).

Quizás la enzima más conocida e importante a nivel mundial actualmente son las llamadas  $\beta$ -lactamasas, cuya finalidad es hidrolizar y por consiguiente degradar los antimicrobianos de la familia  $\beta$ -lactámico (60). En este grupo existe una gran variedad de antimicrobianos (penicilina, cefalosporina, entre otros) cuya característica compartida es poseer un anillo  $\beta$ -lactámico el cual le confiere la capacidad de unirse a la Proteína de Anclaje de Penicilina (PBP), lo que trae como consecuencia la inhibición del proceso de transpeptidación impidiendo de esta forma la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bacteriana, conllevando a la muerte de la bacteria (61).

La resistencia a los  $\beta$ -lactámico puede deberse por alteración del PBP, modificación de porina, síntesis de bombas de expulsión, pero son las enzimas  $\beta$ -lactamasa las de mayor importancia clínica que afecta a este grupo de antimicrobianos. Estas enzimas tienen la capacidad de romper el puente amida del anillo  $\beta$ -lactámico, lo que conlleva a la inactivación de este grupo de antimicrobianos y por tanto, no son capaces de cumplir su función (62).

Las primeras  $\beta$ -lactamasas son conocidas penicilinasas, estas solo hidrolizan la penicilina, posteriormente cuando se introdujo en el mercado y utilización de nuevos antimicrobianos de esta familia, aparecieron nuevas enzimas como lo fueron las TEM-1, TEM-2, SHV-1 que fueron capaces de degradar derivados de las penicilina y a veces a cefalosporinas de primera generación, llamando a ese grupo de enzima como  $\beta$ -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) (63).

A medida que se creaban y utilizaban nuevos antimicrobianos siguieron apareciendo nuevos tipos de  $\beta$ -lactamasa, como por ejemplo la SHV-2 descubierta en el año 1986. Esta enzima no solo es capaz de hidrolizar los antimicrobianos que la BLEA era capaz de degradar, sino que se agrega las cefalosporina de segunda, tercera y cuarta generación además de los antibióticos de la familia monobactams y al ser capaz de degradar una gran variedad de antimicrobianos, se le llamó  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Se conocen más de 100 BLEE, de la cuales las más prevalentes son las familia TEM, SHV y CTX-M (64). Posteriormente aparecen las carbapenemasa la cual le confiere resistencia extra a los carbapenémicos, estas fueron llamadas KPC o carbapenemasas de clase A (65).

Afortunadamente, el personal de la salud para enfrentarse a estos mecanismo de resistencia, usaron compuestos que permitían la inhibición de las enzimas mencionada anteriormente (BLEA, BLEE, KPC), como lo son el ácido clavulánico, sulbactam y el tazobactam (66).

Existen algunas enzimas que no son afectadas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa, lo cual genera que el equipo médico tenga una reducida batería de antimicrobianos con el cual puede actuar, por lo que se disminuyen las posibilidades con la cual pueden combatir a estos patógenos especiales. Algunas de estas enzimas son las llamadas AmpC, que se pueden encontrar principalmente en *Citrobacter freundii*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Serratia spp.* y *Enterobacter spp.*, siendo este último el de mayor importancia clínica, además se debe tener extrema precaución con las llamadas mutantes que son capaces de generar una hiperproducción de AmpC (67).

Otro tipo de enzima son las llamadas metalo- $\beta$ -lactamasa y que son dependiente del Zinc. Estas comenzaron a tomar relevancia durante la década de los '90 por su diseminación principalmente en enterobacterias. Las principales enzimas son las de la familia IMP, VIM, SPM y NDM, las cuales son capaces de conferir a las bacterias una multi-resistencia (68) (69).

Para finalizar, la última enzima que está cobrando importancia y se puede encontrar con mayor frecuencia en bacterias no fermentadoras como son el *A. baumannii* y *P. aeruginosa* son las conocidas  $\beta$ -lactamasa de clase D, representada por la familia OXA, la cuales pueden actuar de la misma forma como las BLEE y las carbapenemasas (70).

Tabla I.5: Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas según diferentes autores.

Actualmente la clasificación Bush-Jacoby-Medeiros es la más aceptada (71)

Grupo Bush-Jacoby-Medeiros	Grupo Bush (1989)	Clase Richmond-Sykes	Tipo Mitsuhashi-Inoue	Clase Molécula	Sustrato preferido	Inhibido por	Enzima Representativa	
						Ac. clavulánico	EDT A	
1	1	la, lb, ld	CSase*	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC (Bacteria Gram negativo), MIR-1
2 <sup>a</sup>	2a	No incluido	PCase* V	A	Penicilinas	+	-	Penicilinas de bacteria Gram positivo
2b	2b	III	PCase I	A	Penicilinas y cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2bc	2b'	No incluido, excepto K1 en clase IV	CXase*	A	Penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido y extendido	+	-	TEM-3 a TEM-26, SHV-2 a SHV-6, <i>K. oxytoca K1</i>
2br	No incluido	No incluido	No incluido	A	Penicilinas	±	-	TEM-30 a TEM-36, TRC-1
2c	2c	II, V	PCase IV	A	Penicilinas y carbencilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	2d	V	PCase II, PCase III	D	Penicilinas y cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	2e	lc	CXase	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinas inducibles ( <i>P. vulgaris</i> )
2f	No incluido	No incluido	No incluido	A	Penicilinas, cefalosporinas y carbapenems	+	-	NMC-A ( <i>E. cloacae</i> ), Sme-1 ( <i>S. marcescens</i> )
3	3	No incluido	No incluido	B	Mayoría de $\beta$ -lactámicos incluido carbapenems	-	+	L1 ( <i>X. maltophilia</i> ), CerA ( <i>B. fragilis</i> )
4	4	No incluido	No incluido	ND**	penicilinas	-	¿?	Penicilinas de <i>P. cepacia</i>

\* CSase: cefalosporinasa; PCase: penicilinas; CXase: cefuroxima-hidrolisis de  $\beta$ -lactamasa

\*\* ND: no determinado

Con los numerosos casos de infecciones causadas por bacterias Gram negativo, sumado a la formación de resistencia de los microorganismos frente a los antimicrobianos, queda demostrado su importancia en la Salud Pública del siglo XXI. Bajo este contexto, el ser humano ha tenido que idear nuevas formas para combatir esta problemática que de no ser solucionado traería graves consecuencias para el futuro de la humanidad.

### **I.2.7 ¿Cómo se puede combatir esta problemática?:**

Independiente del tipo de mecanismo de resistencia, como se mencionó en un principio, éste ha generado repercusiones tanto en el ámbito de la salud como económico, si agregamos que las bacterias están constantemente evolucionando y generando nuevos mecanismos de resistencia, éste sumado al poco interés de las empresas farmacéuticas por la creación de nuevos antimicrobianos no se observa un futuro muy propicio para la salud humana (72). En base a lo mencionado anteriormente, diferentes investigadores de forma autónoma han decidido averiguar nuevas alternativas para combatir las infecciones bacterianas (independiente si son resistente o no a algún antimicrobiano) dando origen a lo que se conoce actualmente como fitoterapia.

Según la Real Academia Española, define como fitoterapia, “al tratamiento de enfermedades en base a plantas o sustancias vegetales” (73). Es sabido por todos, que las plantas han estado asociadas a la historia de la humanidad desde su inicio, ya sea como alimento, ritos espirituales o con la finalidad de tratar algún trastorno de salud, siendo este último el que ha llamado poderosamente la atención de los investigadores (74). Tal es el impacto de esta terapia que se estima la utilización de más de 10.000 plantas a nivel mundial, además se ha visto que cada año aumentan las importaciones y exportaciones de diferentes plantas como también han incrementado los diferentes tipos de usos que se le ha otorgado (75).



Cada planta tiene un principio activo diferente y su concentración puede variar de acuerdo a diferentes condiciones de crecimiento entre diferentes especies, incluso si son del mismo género. Algunos ejemplos de principios activos son los terpenos, alcaloides, flavonoides, glucósidos, taninos, entre otros, de los cuales, cada uno o el conjunto de ellos dan a las plantas efectos curativos frente a ciertos males. Además son fuentes ricas en minerales y vitaminas, moléculas esenciales para la supervivencia del ser humano (76).

Tenemos por ejemplo el ácido úsnico, principio activo proveniente de los líquenes (simbiosis entre alga y hongo), muy estudiado actualmente, ha presentado una gran efectividad frente a bacterias Gram positivo como el *S. aureus* y *Bacillus subtilis*, pero no es muy eficaz en concentraciones razonables contra bacterias Gram negativo como la *E. coli* y *Vibrio harveyi*. Además, se ha estudiado su posible mecanismo de acción, el cual se cree que inhibiría la síntesis de DNA y RNA lo que con llevaría a la muerte bacteriana (77).

Investigaciones asociadas a tioglucósidos de planta del genero *Tropaeolum*, demostraron actividad antimicrobiana y antifúngica utilizado como cepas de estudios ha *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, Dermatofitos y *Candida albicans* (78).

El *Allium sativum*, vulgarmente conocido como ajo es una planta muy utilizada en la cocina a nivel mundial para añadir un sabor diferente a los alimentos. Lo que pocos saben es su efecto antimicrobiano, pues estudios han demostrado que la alicina, principio activo proveniente del ajo, tiene efecto sobre bacterias como el *S. aureus* y *P. aeruginosa*, no obstante falló como inhibidor bacteriano en cepas *E. coli* (79).

En los campos silvestres de Chile, existe una planta del género *Rubus* el cual está compuesto por especies populares como la frambuesa y la mora. Investigaciones asociada al extracto de *Rubus urticaefolius* demostraron tener actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram negativo como también en las Gram positivo, pero no presentó actividad antifúngica (80).

En búsqueda de posibles soluciones frente a bacterias multi-resistentes, investigaciones recientes utilizaron cinco plantas, *Cassia fistula*, *Holarrhena antidysenterica*, *Terminalia alata*, *Terminalia arjuna* y *Paederia foetida* fueron estudiadas en cepas clínicas, enterobacterias multi-resistentes. Como resultado se obtuvo que todas las plantas presentaban actividad antimicrobiana pero con diferencia en su magnitud, dependiendo de la cepa ensayada (81).

Tabla I.6: Principales grupos químicos con actividad antimicrobiana en algunas plantas conocidas por la población (82).

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

López-Brea et al., 2003

El presente trabajo, estudiará la actividad antimicrobiana de la planta *L. albus* en cepas clínicas. Estudios anteriores demostraron que existía actividad antimicrobiana frente a cepas *E. coli* ATCC 25922 y *B. subtilis* ATCC 6633, las cuales no presentaban ningún mecanismo de resistencia (83).

## **I.2.8 *Lupinus albus*:**

### **I.2.8.1 Historia:**

Los registros más antiguos que se saben de esta planta datan del siglo XXII A.C., ya que se encontraron restos de *Lupinus spp.* en tumbas de la civilización Egipcia de esa época (84), además diferentes autores griegos lo han mencionado en sus escritos, por ejemplo Teofrasto (372 a.C.-285 a.C.) realizó una descripción botánica de esta planta, mientras que Dioscórides (40 d.C.- 90 d.C.) habla de ella como un posible alimento que podría ser utilizado por el ser humano en periodos de hambruna, además de mencionar sus propiedades sanatorias para eliminar lombrices (parásitos intestinales), sarna, exantema, entre otros (85). También se le menciona en escritos antiguo provenientes de Roma, puesto que durante el mandato del emperador romano Diocleciano, el Imperio romano sufrió de una grave crisis económica, por lo que se vieron en la necesidad de crear un escrito donde fijaran valores monetarios de algunos producto y con eso poder estabilizar la economía romana, ese es el caso del “El Edicto de Diocleciano” (otro nombre son Edicto de Precios Máximo o simplemente Edicto Sobre Precios). En este aparece nombrada varias plantas el cual aparece mencionada el *L. albus* con su valor monetario y sus utilizaciones (86).

### **I.2.8.2 Estudios asociados:**

*Lupinus albus*, vulgarmente conocida como altramuza blanca o lupino blanco, podría llegar a ser utilizada para tratar enfermedades crónicas, tales como Diabetes Mellitus, pues según Knechet et al, 2006, demostraron que al someter a las ratas a una dieta rica en semilla de esta planta generaría una actividad anti-hiperglicémica (87). Otros investigadores como Fontanari, et al, 2012, observaron que ciertas proteínas de esta planta probablemente podrían tener efecto hepatoprotector como también la capacidad de disminuir el colesterol no HDL en la sangre lo que ayudaría enormemente en la salud de las personas (88). Anteriormente se mencionó su actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC (89).

Principios activos aislados de otras especies de *Lupinus spp.* pero que igualmente se encuentra en la planta *Lupinus albus*, han mostrado efectividad antimicrobiana y antifúngica. Unos de los ejemplos son principios activos como la lupanina (alcaloide) y genisteína (flavonoide) la cual han demostrado tener actividad antimicrobiana frente a bacteria Gram positivo y Gram negativo, inclusive la lupanina ha demostrado tener una acción antifúngica frente a la especie *Aspergillus niger*, agente causal de la Aspergilosis (90).

## **CAPÍTULO II.**

### **II.1 HIPÓTESIS**

Basado en los antecedentes descritos anteriormente, se plantea la hipótesis “El extracto de *Lupinus albus* presenta actividad microbicida sobre bacterias Gram negativo multi-resistentes de importancia Clínica”.

### **II.2 OBJETIVOS**

#### **II.2.1 Objetivo general:**

Demostrar la efectividad antimicrobiana que posee el extracto de *L. albus* en bacterias Gram negativo multi-resistente.

#### **II.2.2 Objetivos específicos:**

1. Identificar cuáles son los principios activos presentes en el extracto metanólico de la planta
2. Determinar si el extracto de *L. albus* actúa como antimicrobiano sobre bacterias Gram negativo resistentes a cabapenémicos, utilizando la metodología de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)..
3. Identificar los mecanismo de acción que posee el extracto metanólico de *L. albus*.

## **CAPÍTULO III.**

### **III.1 MATERIALES**

#### **III.1.1 Reactivos:**

##### **Proveedor Merck:**

- Agar-Agar
- Agar MacConkey
- Agua destilada
- Extracto de levadura granulado
- Peptona

##### **Proveedor Sigma:**

- Gentamicina (50 µg/mL)

##### **Proveedor BD:**

- Acrilamida bis acrilamida 30:08
- Ácido tricloro acético
- APS 10% (Persulfato de Amonio)
- Azul de Comassie R-250 (Brillant Blue G)
- Dimetilsufóxido (DMSO)
- Isopropanol
- Metanol
- NaCl 5M obtenido de Winkler.
- SDS 10% (Dodecilsulfato Sódico)
- TEMED (Tetrametiletlenodiamina)
- Tris HCl 0.5 M pH 6.8

- Tris HCl 1.5 M pH 8.8
- Imipenem (Disco 10 µg)
- Ertapenem (Disco 10 µg)

### III.1.2 Cepas de estudios:

Se realizó un estudio en 5 cepas *Klebsiella pneumoniae*, 2 *Pseudomonas aeruginosa* y 2 *Acinetobacter baumannii*. Estas fueron entregadas por el Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica (PUC) y del Hospital Clínico de la Universidad de Chile Dr. José Joaquín Aguirre. Todas presentaron multi-resistencia a diferentes antimicrobianos.

Tabla III.1:

Cepas trabajadas con sus respectivo código interno del laboratorio

Numero	Cepa	Código Interno
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	2309
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	2366
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	2462
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K27665
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	K28531
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27419
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28055
8	<i>Acinetobacter baumannii</i>	18624
9	<i>Acinetobacter baumannii</i>	19381

\* Cepas entregada por el Hospital Clínico de la Universidad de Chile la cuales posee carbapenemasas, según los registros obtenido del laboratorio CIMIS (UNAB), lugar donde están almacenadas a -20°C.

### III.1.3 Medios de cultivos:

#### **Agar Mueller Hinton (M-H) para 1 L**

- Agar Mueller Hinton 38 gr
- Agua Destilada 1 L

#### **Agar Luria Bertani (LB) para 200 mL**

- Peptona 2 gr
- NaCl 1 gr
- Extracto de levadura granulado 1 gr
- Agar-Agar 3 gr
- Agua Destilada 200 mL

#### **Caldo Luria Bertani para 200 mL**

- Peptona 2 gr
- NaCl 2 gr
- Extracto de levadura granulado 1 gr
- Agua Destilada 200 mL



### **III.1.4 Soluciones:**

#### **Buffer N° 1:**

- tris HCl 10 mM pH 8.0 (1, 211 g de trisma base por 1 L de agua destilada).

#### **Buffer N° 2:**

- tris HCl 10 mM pH 8.0
- MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- Agregar tritón al 2%

#### **Buffer N° 3:**

- Tris HCl 100 mM pH 8.0
- SDS 2%

#### **Tinción coloidal de azul de Coomassie, solución madre:**

- 0.1% (p / v) azul brillante de Coomassie (G250)
- 2% (p / v) de ácido orto-fosfórico
- 10% (p / v) de sulfato de amonio

#### **Tinción coloidal de azul de Comassie, solución de trabajo:**

- 80% (v / v) solución de tinte de stock.
- 20% (v / v) de metanol.

### **III.1.5 Extracto natural y antibiótico utilizado:**

- Extracto de *L. albus* (Stock 200 mg/mL y 125 mg/mL , disuelto en DMSO diluido en 1/5)
- Gentamicina (Stock 1000 µgr/mL, disuelto en agua destilada estéril).

## III.2 METODOLOGÍA

El presente estudio es de tipo analítico experimental, se realizó en dos lugares diferente dependiendo de la fase en la que se encontraba. Las técnicas de obtención del extracto, NMR, HPLC-masa y concentración de los compuestos recolectados se realizaron en el departamento de Química, Productos Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile a cargo del Dr. Carlos Areche.

Las etapas de separación cromatográfica del extracto, estudio de susceptibilidad e identificación del posible mecanismo de acción fueron realizadas en el laboratorio CIMIS de la Universidad Andrés Bello. Se trabajó con 5 cepas *K. pneumoniae*, 2 cepas *P. aeruginosa* y 2 cepas *A. baumannii* que presentaron multi-resistencia al momento de su estudio, lo cual es significativamente importante por ser obtenidas de pacientes que presentaban patologías asociadas a estas bacterias.

Se utilizó el extracto de *L. albus* como posible antimicrobiano frente a las cepas mencionadas anteriormente.

### III.2.1 Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC):

Con la información presentada en el capítulo I.2.8.2 se sabe que el extracto posee actividad antimicrobiana, es por esto que con la finalidad de cumplir con los objetivos específicos, se decidió comenzar con el perfil cromatográfico del extracto de la planta, recolección e identificación de los principios activos de *L. albus*. Esto, al ser un procedimiento que requiere de mucho más tiempo en comparación a las otras técnicas que se trabajaran en este informe.

Se utilizó el equipo cromatográfico YL9100 HPLC con una columna Kromasil 100 C-18 de 10 mm (fase reversa) para la separación de los diferentes compuesto de dicho extracto por afinidad polar. También se evaluó la pureza de los compuestos obtenidos utilizando una columna Kromasil 100 C-18 de 4 mm (fase reversa).

Las condiciones de gradiente con la cual se trabajó fueron las siguientes:

- Se utilizó agua destilada y metanol como fase móvil.
- Se inició la corrida con 90% de agua destilada y 10% de metanol
- Las concentraciones variaron hasta llegar a los 90 minutos donde los solventes se invirtieron, siendo 90% metanol y 10% agua.
- A los 90,1 minutos se utilizó como único solvente el metanol
- Tiempo corrida total 140 minutos
- Flujo de 3,5 mL/min en la columna de 10 mm y de 1 mL/min en la de 4 mm
- Presión de 1500 psi.

El primer paso para iniciar el proceso de corrida es la “purga”, la cual consiste en dejar corriendo agua (solvente) durante 5 minutos a un flujo de 5 mL/min para eliminar burbujas de aire que se puedan encontrar en el sistema de flujo. Posteriormente se inyectan 100 µL de agua destilada para eliminar todo compuesto polar que pueda interferir. Finalmente se inyectan 100 µL de metanol para los compuesto apolares con la misma finalidad del anterior.

1. El extracto fue entregado por el departamento de química de la Universidad de Chile.
2. Se masó en un tubo eppendorf de 2 mL, 0,1 gr de extracto y se disolvió en 1 mL de metanol (100 mg/mL)
3. Se homogenizó en vórtex por 10 minutos o hasta que quedara completamente disuelto

4. La solución se recoge en jeringa de 2,5 mL y se filtra en poro de 0,22  $\mu\text{m}$
5. Se inyecta 100  $\mu\text{L}$  de la solución filtrada en el equipo de HPLC
6. La primera corrida obtenida de este extracto es utilizada para conseguir el perfil cromatográfico de referencia.
7. Las corridas posteriores fueron para recolectar los principales peak del perfil cromatográfico obtenido anteriormente.
8. Al finalizar cada corrida se inyecta 100  $\mu\text{L}$  de agua, posteriormente se inyecta 100  $\mu\text{L}$  de metanol, esto para eliminar compuestos polares y apolares que pudieran haber quedado atrapado en la columna

Una vez obtenidos los compuesto aislados, son inyectados individualmente pero utilizando la columna de 4 mm para evaluar la pureza de estos.

### **III.2.2 Estudio de susceptibilidad:**

Diversos son los ensayos utilizados a nivel mundial para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana, pero en este trabajo, considerando la oleosidad del extracto, la pigmentación y generación de una poca cantidad de precipitado que persiste en la solución del extracto a pesar de ser filtrada, se utilizara la técnica de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en micro-dilución (91).

### **III.2.2.1 Activación bacteriana:**

Las cepas bacterianas a estudiar están en caldo de cultivo Luria y están almacenadas en un refrigerador a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para conservarlas.

- Las cepas previamente refrigeradas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , fueron transportadas en cooler con hielo para conservar su temperatura.
- Se obtiene una alícuota bacteriana de  $100\text{ }\mu\text{L}$ .
- Se depositan en  $2\text{ ml}$  de caldo luria
- Se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación por 24 horas.
- Finalizada la incubación, se puede dejar a temperatura ambiente hasta su uso (las cepas deben ser utilizadas el mismo día en que se realizara el ensayo, no es aconsejable postergarlo para el día siguiente por lo cambios metabólicos que pueden sufrir las bacterias a temperatura ambiente.)

### **III.2.2.2 Evaluación de pureza bacteriana:**

Antes de realizar cualquier tipo de ensayo en las cepas bacterianas a estudiar, se procede a evaluar la pureza bacteriana, pues estas han sido ocupadas por otros investigadores, por lo que no se asegura que esté libre de contaminación por otras bacterias

- Se realiza la activación bacteriana siguiendo el protocolo del capítulo III.2.2.1.
- Finalizada la incubación, se realiza una siembra por agotamiento de estriada en agar Luria de cada cepa bacteria

- Se incuban a 37°C en estufa por 24 horas para corroborar la pureza de éstas.

### **III.2.2.3 Preparación de solución bacteriana para ensayo por CIM:**

Para eliminar cualquier interferente que pudiera generar alguna molécula del caldo Luria, se efectuó un lavado de las cepas con suero fisiológico antes de ser usada para finalmente preparar el Mc-Farland y la dilución necesaria.

1. Se activan bacterias con el mismo protocolo mencionado en el capítulo III.2.2.1.
2. Se deposita 1 mL de bacterias activadas en tubo eppendorf de 1.5 mL y se realiza una centrifugación durante 4 minutos a 13.000 rpm en 4°C
3. Se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 1 mL de suero fisiológico (0,9% p/v) homogenizándola en vórtex. Se realiza una nueva centrifugación con el mismo protocolo descrito anteriormente. (este paso se repite 3 veces)
4. En tubos de vidrio estériles previamente rotulados con el código interno de cada cepa, se depositan 5 mL de suero fisiológico (0,9% p/v) y se agregan 50 µL de bacterias previamente lavadas hasta alcanzar un Mc-Farland de 0.5 (~  $1,5 \times 10^8$  UFC /mL.)
5. En otros tubos de vidrios estériles previamente rotulados con el código interno de cada cepa, se depositan 9990 µL de suero fisiológico (0,9% p/v) y se agregan 10 µL de bacterias llevadas a 0,5 Mc-Farland anteriormente (solución final ~  $1,5 \times 10^5$  UFC/mL).

#### III.2.2.4 Preparación de dilución seriada del extracto de *L. albus*:

1. Se masó 1,0 gr del extracto en un tubo de vidrio y se disolvió inicialmente con 1 mL de Dimetilsulfóxido estéril (DMSO) y se mezcló hasta que quedara lo más homogenizado posible, posteriormente se añadió 4 mL de agua destilada estéril y se terminó de homogenizar utilizando vórtex. Se obtuvo una solución cuya concentración es de 200 mg/mL (0,2 gr/mL) del extracto. A su vez con este procedimiento se consigue realizar una dilución del DMSO al 1/5 para eliminarlo como interferente en la inhibición bacteriana, pues en una tesis anterior se menciona su efecto inhibitorio en bacterias (92).

2. La solución resultante se filtra utilizando un poro de 0,22  $\mu\text{m}$  y traspasándose a otro tubo.

3. El tubo con la solución filtrada es rotulado con el número 1. Se añade otros 6 tubos rotulándolo con los números 2, 3, 4, 5, 6 y 7, y se dispensa 2 mL de agua destilada estéril en estos últimos.

4. Del tubo número 1, se extrae 2 mL de la solución, se deposita en el tubo número 2 y se mezcla, quedando una dilución  $\frac{1}{2}$ . Posteriormente de este se saca 2 mL, se deposita en el tubo número 3 y se mezcla quedando una dilución de  $\frac{1}{4}$ . Se continúa con el procedimiento hasta el tubo número 7. En la figura III.1 se visualiza de mejor forma el procedimiento y la concentración teórica de cada tubo.



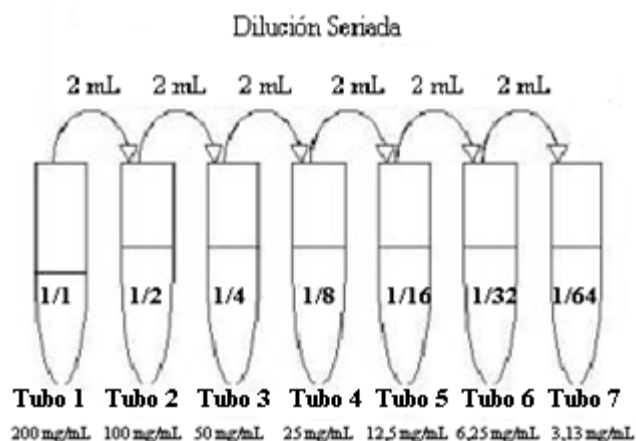


Figura III.1:

Dilución seriada del extracto de *L. albus*.

### III.2.2.5 Ensayo por CIM:

1. Se utilizan placas de ELISA (8 X 12 pocillos), con una capacidad por pocillo de 300  $\mu$ L y se rotulan previamente a su uso con: control de DMSO 1/5, cepas bacteriana a ensayar en duplicado, control extracto, control agua destilada y control gentamicina.

2. En los pocillos se dispensan: 50  $\mu$ L de caldo Luria, 100  $\mu$ L del extracto en estudio previamente preparado y 50  $\mu$ L bacteria (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*). Se utiliza los tubos de la dilución seriada del extracto obtenida en el capítulo III.2.2.4. El tubo N°1 se deposita en todos los pocillos A en la línea horizontal, el tubo N°2 se deposita en todos los pocillos B de la línea horizontal y así sucesivamente. Con esto la solución del extracto nuevamente es diluido en  $\frac{1}{2}$  en todos los pocillos. El pocillo H de la línea horizontal, solo posee 50  $\mu$ L de caldo Luria y 50  $\mu$ L de la cepa a estudiar y será usado como control de crecimiento bacteriano. En la Figura III.2 se aprecia de mejor forma los pasos mencionados anteriormente.

3. Se añade control negativo DMSO 1/5, el cual posee 50  $\mu$ L de caldo Luria, 100  $\mu$ L de DMSO diluido en 1/5 y 50  $\mu$ L de bacteria (todas las cepas estudiadas son sometida a este control). La finalidad de esto es evaluar si el DMSO diluido a 1/5 posee cierta inhibición bacteriana.
4. Se incuban a 37°C durante 24 horas.

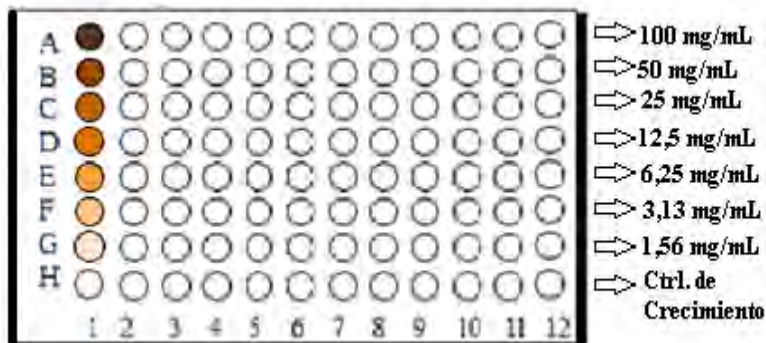


Figura III.2: Esquema Explicativo de la CIM en la placa de ELISA de 96 pocillos.

Paso 1: Se agrega 50  $\mu$ L de caldo Luria a todos los pocillos.

Paso 2: Se dispensa 100  $\mu$ L de la solución del extracto del Tubo 1 de la Figura III.1 a la línea horizontal A. En la línea horizontal B se deposita 100  $\mu$ L del Tubo 2. Así sucesivamente hasta llegar a la ubicación G que corresponde al Tubo 7.

Paso N°3: Se dispensa 50  $\mu$ L de la cepa bacteriana a estudia de forma vertical. Se realiza en duplicado, por ende, los números 1 y 2 corresponde a una cepa, 3 y 4 a otra cepa diferente y así sucesivamente.

5. Luego de su incubación se determina la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), en placas agar Mueller Hinton (M-H). Para esto se utiliza una planilla de papel rotulada con la enumeración de 1 al 8 de manera vertical y con 8 cuadrantes en forma horizontal por cada enumeración vertical (en total se tiene 64 cuadrantes). Cada cuadrante se usa para dispensar las muestras de cada pocillo obtenidas desde la placa de ELISA

6. Se dispensan 4  $\mu$ L en cada cuadrante de la placa agar M-H obtenidas de los pocillos de placa ELISA previamente incubadas.

7. Una vez realizado el traspaso de todos los pocillo desde la placa de ELISA al agar M-H, se realiza una incubación a 37°C durante 24 horas

8. Finalizada la incubación, se registra las CIM obtenidas de todas las cepas.

### **III.2.3 Evaluación del posible mecanismo de acción:**

Una vez evaluada la efectividad antimicrobiana del extracto de *L. albus* se procedió a investigar el posible mecanismo de acción.

#### **III.2.3.1 Preparación de la solución del extracto a utilizar para extracción de proteína de membrana y ensayo con CCCP:**

Ya sea para evaluar la integridad de la membrana de la bacteria o bombas de expulsión, fue necesario realizar previamente una solución de trabajo del extracto de la planta.

1. En un tubo eppendorf de 2 mL se masa 0,25 gr del extracto y se agrega 400  $\mu$ L de DMSO. Se homogeniza y posteriormente se completa con 1600  $\mu$ L de agua destilada cuya finalidad es generar una dilución 1/5 del DMSO con el mismo objetivo mencionado anteriormente (capítulo III.2.2.4). Con esto se obtiene una concentración de 125 mg/mL

2. La solución se filtra con poro de 0,22  $\mu$ m y se traspasa a un nuevo tubo eppendorf de 2 mL.

Esta solución debe ser preparada en el mismo momento que se utilizara para los diferentes ensayos.

### III.2.3.2 Extracción de proteína de membrana:

Para evaluar si el extracto está actuando a nivel de la membrana, se hace una comparación entre bacterias que crecieron en caldo Luria sin extracto contra la misma bacteria pero que creció en caldo Luria con una concentración sub-letal del extracto de la planta. El protocolo es el siguiente.

1. Por cada cepa a estudiar se rotula dos tubos de vidrio estériles, uno solo con el código interno que posee la cepa y el otro con el código interno más las siglas E.L.A. el cual será al que se le añadirá el extracto de *L. albus*.
2. En el tubo de vidrio estéril rotulado con el código interno se deposita 1,9 mL de caldo Luria + 100  $\mu$ L de la cepa a estudiar.
3. El tubo de vidrio estéril rotulado con el código interno más las siglas E.L.A. se le añade 1,7 mL de caldo Luria + 200  $\mu$ L de la solución de extracto concentrado a 125 mg/mL + 100  $\mu$ L de la cepa a estudiar. Con esto se consigue que el tubo con las siglas E.L.A tenga una concentración de 12,5 mg/mL del extracto, considerado como sub-letal en base a los resultados obtenidos en el estudio de susceptibilidad. Preparación del concentrado del extracto se describe en el capítulo III.2.3.1.
4. Los tubos son incubados a 37°C por 24 horas en agitación (Los pasos que vienen a continuación, todos los tubos son trabajados de la misma forma).
5. Finalizada la incubación, se traspasa a tubos eppendorf 1,5 mL previamente rotulado y se centrifuga durante 4 minutos a 13.000 rpm en micro-centrifuga.
6. Se eliminar el sobrenadante y se agrega 1 mL de suero fisiológico (0,9% p/v). Se homogeniza usando vórtex (repetir 3 veces).

7. Botar el sobrenadante y resuspender el pellet de bacteria en buffer N°1 con 1 mL.
8. Las bacterias se sónicán por 100 segundos (se realiza en un ambiente fresco para evitar el calentamiento de las bacteria producida por esta técnica).
9. Se centrifuga a 7.000 rpm por 5 minutos a 20°C en una micro-centrifuga.
10. El sobrenadante es traspasado a nuevos tubos eppendorf de 1,5 mL y el pellet es eliminado.
11. Centrifugar el sobrenadante durante 45 minutos a 13.000 rpm en micro centrifuga a 20°C
12. Botar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 uL de Buffer N°2 (tritón 2%), homogenizando con micro-pipeta utilizando puntas diferentes para cada tubo eppendorf.
13. Incubar 30 minutos a 37°C.
14. Centrifugar 45 minutos a 13.000 rpm en micro centrifuga.
15. Botar el sobrenadante y resuspender el pellet en Buffer N°3 con 50 uL.
16. Se almacena a -20°C hasta su posterior procedimiento en la corrida electroforética

### III.2.3.3 Preparación del gel:

Tabla III.2: Reactivos y volúmenes necesarios para la preparación del gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE al 20%).

Reactivos	Staking	Resolved
<b>Acrilamida bis acrilamida 30:08</b>	<b>1.75 mL</b>	<b>4.38 mL</b>
<b>Tris HCl 0.5 M pH 6.8</b>	<b>1.75 mL</b>	<b>-</b>
<b>Tris HCl 1.5 M pH 8.8</b>	<b>-</b>	<b>2.64 mL</b>
<b>SDS 10%</b>	<b>70 µL</b>	<b>105 µL</b>
<b>TEMED</b>	<b>15 µL</b>	<b>15 µL</b>
<b>H<sub>2</sub>O destilada</b>	<b>3.6 mL</b>	<b>2.56 mL</b>
<b>NaCl</b>	<b>-</b>	<b>300 µL</b>
<b>APS – 10%</b>	<b>50 µL</b>	<b>60 µL</b>
<b>Volumen Total</b>	<b>7,5 mL</b>	<b>10 mL</b>

Preparado el gel, se monta el equipo de electroforesis y se deja corriendo con las muestras obtenidas en el capítulo III.2.3.2.

### III.2.3.4 Tinción coloidal de azul de Coomassie:

#### Solución madre:

- Se disuelven 20 gr. de ácido fosfórico y 100 gr. de sulfato de amonio en 500 mL de agua destilada en un matraz aforado.
- Posteriormente se agrega 1 gr de colorante Coomassie
- Se agita y se afora hasta 1 L con agua destila.
- Se obtiene una concentración de 0,1% p/v del azul brillante de Coomassie G250, 2% p/v de ácido fosfórico y 10% p/v de sulfato de amonio.

No es necesario realizarle un proceso de filtración y debe ser preparada con un tiempo mínimo de 24 horas antes de realizar la tinción.

Puede ser almacenada a temperatura ambiente durante varias semanas sin que se vea afectada su capacidad tintorial

#### Tinción solución de trabajo:

Para preparar la solución de trabajo se debe tomar 4 parte de la solución madre mencionada anteriormente y se agrega 1 parte de metanol. Concentración final de 80% v/v de solución madre y 20% v/v de metanol. Esta solución debe ser preparada antes de su uso.

#### Procedimiento de tinción:

Se debe usar recipiente de vidrio o plástico de alta calidad y el procedimiento se lleva a cabo en una mesa de agitación a temperatura ambiente.

1. El gel se fija con 40% (v / v) de etanol, 10% (v / v) de ácido acético durante al menos 60 min
2. Lavar el gel con agua durante 2 x 10 min (gel debe estar completamente cubierto)
3. Dejar toda la noche el gel con la tinción coloidal Coomassie (solución de trabajo)
4. Mover el gel a un nuevo recipiente con ácido acético al 1% v/v
5. Lavar el gel con ácido acético al 1% hasta que el gel quede libre de partículas de Coomassie (el fondo debe ser claro).

Se utiliza escáner convencional para documentar los resultados en este trabajo. Se recomienda cortar las bandas de interés del gel que serán analizadas en un futuro de forma inmediatamente, estos pueden ser almacenados y permanecer viables a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento por espectrometría de masas.

### **III.2.3.5 Evaluación de bombas de expulsión:**

Se ha visto que las bombas de expulsión de antibiótico necesita la fuerza protón-motriz dada por los hidrogeniones ( $\text{H}^+$ ) para expulsar desde el interior de la célula bacteriana hacia el exterior los diferentes antimicrobianos. Compuestos como el carbonil cianuro m-clorofenil idrazona (CCCP) generan una inhibición de la creación de la fuerza protón-motriz por lo que deja inactivada las bombas de expulsión, por ende el antimicrobiano es capaz de generar su efecto sin ningún inconveniente, pues la bacteria no logra expulsarla de su interior. Lamentablemente por su alta toxicidad en el ser humano no es posible utilizarlo como coadyuvante, pero si se utiliza en la clínica para identificar mecanismos de resistencia producido por las bombas de expulsión (93).

#### Protocolo de trabajo:

1. Por cada cepa a estudiar se rotula dos tubos de vidrio estériles, uno solo con el código interno que posee la cepa y el otro con el código interno más las siglas CCCP el cual será al que se le añadirá el carbonil cianuro m-clorofenil idrazona.
2. En el tubo rotulado con el código interno de la cepa se deposita  $1795\ \mu\text{L}$  de caldo Luria,  $200\ \mu\text{L}$  del extracto concentrado a  $125\ \text{mg/mL}$  y  $5\ \mu\text{L}$  de la cepa a estudiar. Volumen final  $2\ \text{mL}$ . Preparación del extracto concentrado a  $125\ \text{mg/mL}$  se menciona en el capítulo III.2.3.1.



3. En el tubo rotulado con el código interno de la cepa más CCCP se deposita 1792  $\mu\text{L}$  de caldo Luria, 200  $\mu\text{L}$  de extracto concentrado a 125 mg/mL, 5  $\mu\text{L}$  de la cepa a estudiar y 3  $\mu\text{L}$  de CCCP.

4. Todos los tubos son incubados a 37°C durante 24 horas en agitación

5. Finalizada la incubación, cada una de ella se siembra en césped en Agar M-H y se realiza la técnica de difusión en disco con Imipenem y Ertapenem. Se deja incubando 24 h a 37°C y para luego evaluar el crecimiento.

# CAPÍTULO IV.

## IV.1 RESULTADOS

### IV.1.1 Perfil cromatográfico y recolección:

Como se mencionó en el capítulo III.2.1, la primera corrida se realizó con la finalidad de obtener el perfil cromatográfico del extracto de la planta y poder determinar cuáles serán los peak (compuestos) que se recolectaran, por ende en esta primera corrida no se recolecto ningún peak. En el Gráfico IV.1 se puede apreciar un total de 10 peak con diferentes tiempos de retención y magnitud.

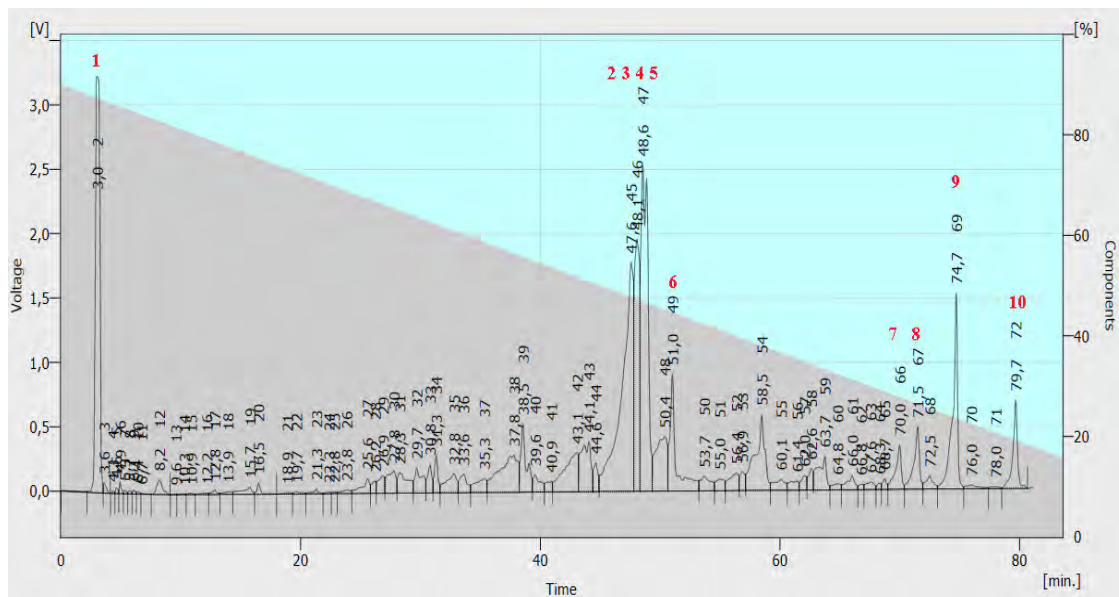


Gráfico IV.1: Perfil cromatográfico base.

Los números en rojos fueron los peak que se decidió recolectar por su magnitud.

Tabla IV.1:

Tiempo de retención de cada peak recolectado.

<b>N° de identificación del Peak</b>	<b>Tiempo de Retención (min.)</b>
1	3
2	47,6
3	48,1
4	48,6
5	49
6	51
7	70
8	71,5
9	74,7
10	79,7

Posteriormente, se hizo un total de 20 corridas de recolección y se concentró utilizando el equipo de rota-vapor Hei-Vap (Heidolph) asociado a un generador de vacío PC3000I Vario Pro (Vaccubrand), dejando un remanente de metanol. Finalmente se evaluó la pureza de los 10 peak, de los cuales cuatros de ellos presentaban 100% de pureza, por lo que se decidió seguir trabajando con ellos y se descartaron los otros seis por presentar contaminación.

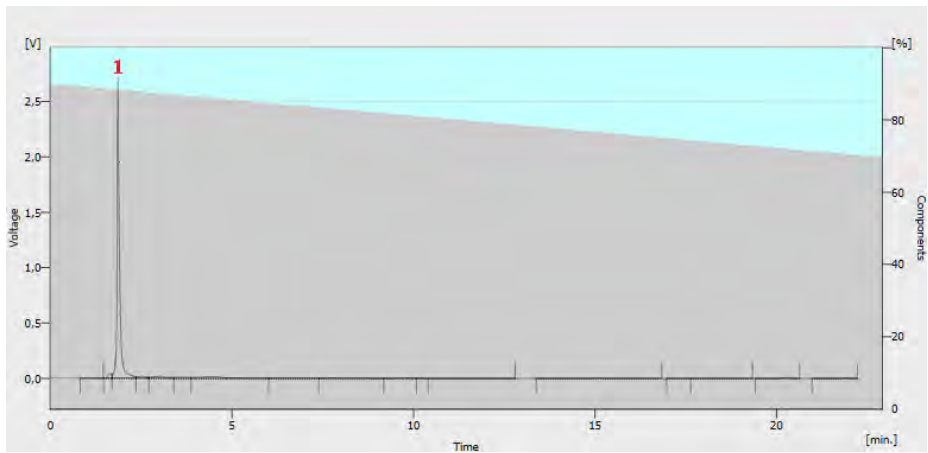


Gráfico IV.2: Evaluación de pureza del peak N°1

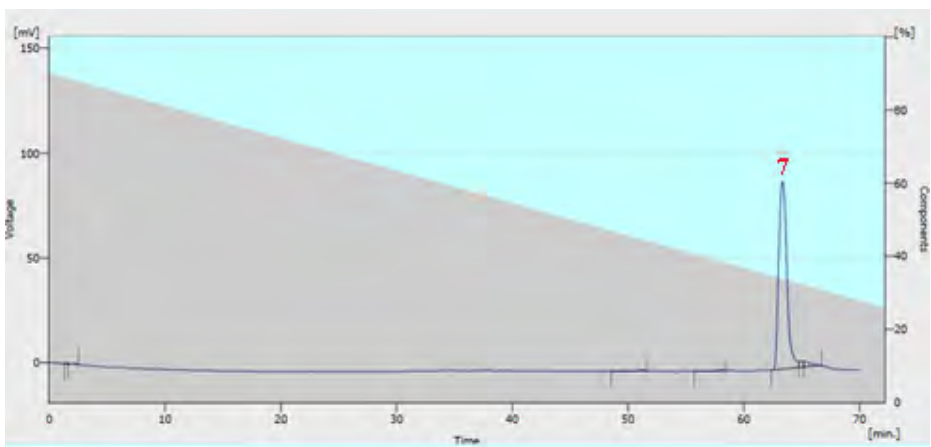


Gráfico IV.3: Evaluación de pureza del peak N°7

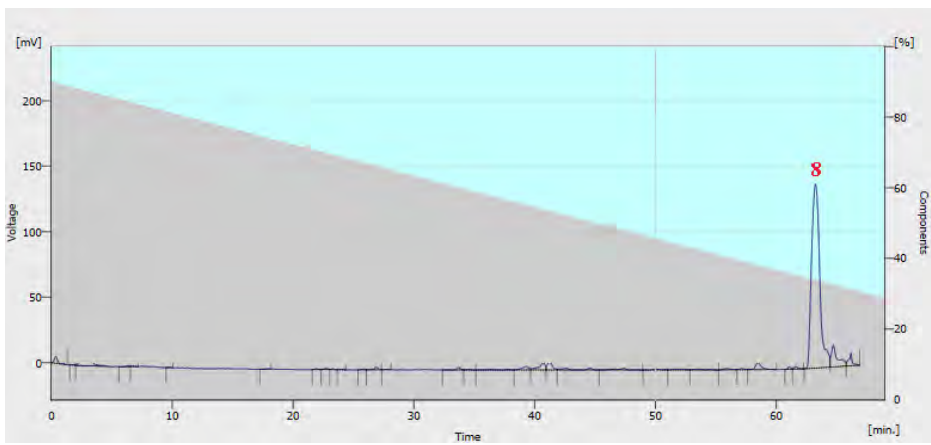


Gráfico IV.4: Evaluación de pureza del peak N° 8.

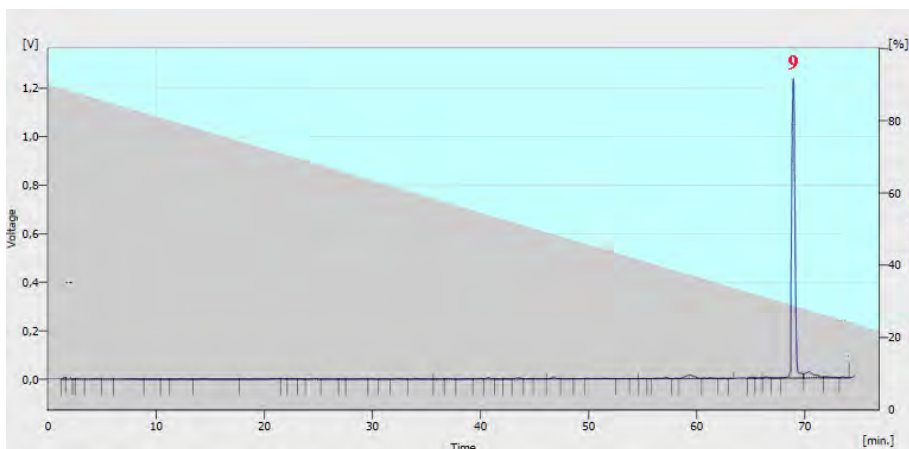


Gráfico IV.5: Evaluación de pureza del peak N° 9

Finalizado el estudio de pureza, se liofilizó cada compuesto para obtener su masa final. Los requisitos para realizarla técnica de NMR son:

- El compuesto debe tener 100% de pureza
- Masar como mínimo 4 mg.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla IV.2: Evaluación de los criterios para el NMR

Peak	Pureza	Masa (mg)
N° 1	SI	11,4
N° 7	SI	2,4
N° 8	SI	4,6
N° 9	SI	2,6

En base a los datos obtenidos, estos fueron entregados al Departamento de química de la Universidad de Chile para su identificación. Considerando que dos de los 4 peak presentaron una masa inferior del requisito mínimo para realizar la técnica de NMR, se sugirió al departamento complementarlo con la técnica de HPLC-masa.

#### IV.1.2 Estudio de CIM en bacterias Gram negativo:

En una primera instancia se evaluó las cepas *K. pneumoniae* frente al extracto de *L. albus*. El control negativo de DMSO diluido en 1/5 se pudo apreciar que hubo crecimiento bacteriano desde el primero pocillo, en cambio el control de evaluación de pureza del extracto se pudo observar que en ninguna dilución hubo crecimiento bacteria, confirmado la no existencia de contaminación bacteriana. Finalmente el pocillo ocho usado como control positivo, se percibió el crecimiento bacteriano de todas las cepas. En base a lo mencionado anteriormente se establece que los resultados son confiables.

Tabla IV.3: CIM de las cepas *K.pneumoniae*.

Se observa que la cepa 2366 es la única que presenta un CIM mayor.

Código Interno	CIM		
	Albus Stock 200 mg/mL	Control DMSO (1/5)	Gentamicina stock 1000 µg/mL
2309	50 mg/mL	OK	62,5 µg/mL
2366	100 mg/mL	OK	62,5 µg/mL
2462	50 mg/mL	OK	31,25 µg/mL
K28531	50 mg/mL	OK	15,63 µg/mL
K27665	50 mg/mL	OK	62,5 µg/mL

En segunda instancia se evaluó otras cepas Gram negativo de importancia clínica, siguiendo el mismo protocolo trabajando con las *K. pneumoniae*. Todos los controles cumplieron con los requisitos mencionado anteriormente, por lo que los resultados están validados.

Tabla IV.4: CIM de los bacilos Gram negativo no fermentadores.

Se aprecia una mayor resistencia al extracto de *L. albus* por parte de las bacterias

Código Interno	CIM		
	Albus Stock 200 mg/mL	Control DMSO (1/5)	Gentamicina stock 1000 µg/mL
27419	100 mg/mL	OK	< 3,91 µg/mL
28055	100 mg/mL	OK	< 3,91 µg/mL
18624	100 mg/mL	OK	62,5 µg/mL
19381	100 mg/mL	OK	31,25 µg/mL

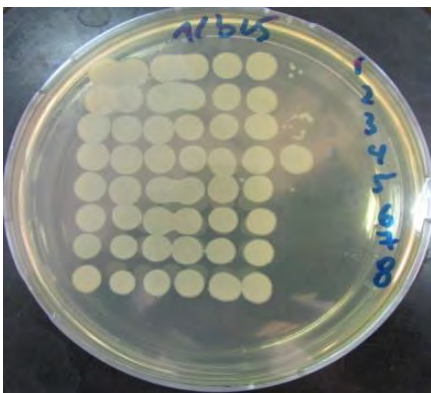


Figura IV.1: Traspaso de los CIM de los micros-pocillos a agares de M-H II.

Se utilizaron número de una unidad para ahorrar espacios. Las cepas fueron trabajadas en duplicados.

N° 1 y 2: cepa 2309

N° 3 y 4: cepa 2366.

N° 5 y 6: cepa 2462.

N° 7 y 8: cepa K28531

Los CIM fueron repetidos 3 veces arrojando los mismos resultados en todas las ocasiones.

### **IV.1.3 Mecanismo de acción:**

Al comprobarse la capacidad inhibitoria que presenta el extracto frente a las cepas bacterianas en estudios se procedió a determinar el posible mecanismo de acción de dicha planta frente a *K. pneumoniae* por tener una mayor sensibilidad.

#### **IV.1.3.1 Bombas de expulsión:**

Como se mencionó anteriormente el ensayo utilizando el compuesto CCCP permite evaluar si la resistencia a los antimicrobianos se originaba por bombas de expulsión.

Se intentó demostrar que el extracto de *L. albus* era capaz de inhibir de alguna forma las bombas de expulsión. Por ende si el extracto genera efecto sobre dichas bombas se esperaría que la bacteria no fuera capaz de crecer al ser expuesta al antimicrobiano.

Los resultados obtenidos muestran que no existe una diferencia significativa entre las cepas tratadas con CCCP y aquellas que no fueron tratadas con CCCP pero tenían extracto de la planta.



#### IV.1.3.2 Electroforesis de proteína de membrana externa:

Para finalizar los estudios de mecanismo de acción, se evaluó con este ensayo si la permeabilidad de la membrana bacteriana se ve alterada de alguna forma, comparando bacterias cultivadas con extracto de *L. albus* en concentración sub-letal (12,5 mg/mL) contra aquellas que crecieron sin el extracto de la planta.

Al observarse la *Figura IV.3*, el rectángulo verde se aprecia una diferencia en las bandas, pues en la bacteria no tratada con el extracto se observa claramente de manera significativa la presencia de una proteína de membrana por debajo de los 37 KDa, a diferencia de la bacteria tratada con el extracto desaparecería casi en su totalidad. Además se aprecia un engrosamiento de la banda de proteína ubicada a 37 KDa en la bacteria tratada con el extracto de la planta.

El ensayo fue repetido cuatro veces para corroborar y cerciorarse que los resultados obtenido sean repetible. En la última electroforesis las bandas en la que se encontraron una diferencia significativa fueron cortadas, almacenadas (-20°C) para su posterior análisis y secuenciación.

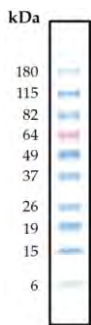


Figura IV.2:  
Benchmark pre-stained  
Estándar de proteína.

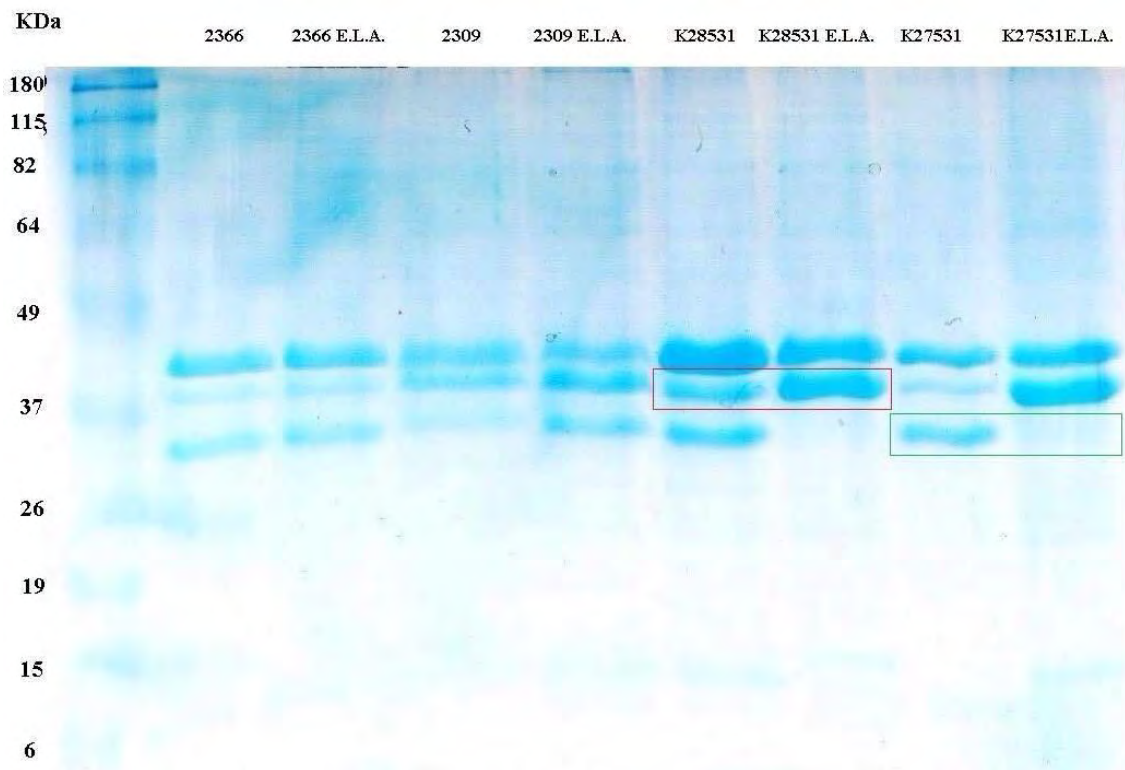


Figura IV.3: Resultados de la corrida electroforética.

Se observa claramente 2 diferencia en las bandas de proteínas. El rectángulo rojo muestra un cambio en la concentración aparente de proteína de membrana entre cepas no tratada contra la cepa que si fue tratada con el extracto, mientras que el rectángulo verde demuestra la desaparición de una banda de proteína en la cepa tratada con el extracto. El peso aparente de ambas proteína que sufrieron cambio significativo estaría alrededor de los 37 KDa.

## CAPÍTULO V.

### V.1 DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como enfoque, evaluar en primera instancia el efecto antimicrobiano del extracto de *L. albus* frente a cepas *K. pneumoniae* que presentaron mecanismo de multi-resistencia a los antimicrobianos, las cuales fueron aislados de paciente hospitalizados en el Hospital Clínico de la Pontífice Universidad Católica (PUC) y del Hospital Clínico de la Universidad de Chile Dr. José Joaquín Aguirres. A su vez se intentó recolectar los peak de importancia del extracto de *L. albus* según su perfil cromatográfico, como también evaluar el posible mecanismo de acción que este ejerce sobre las bacteria.

#### V.1.1 Compuestos obtenidos del HPLC:

Al buscarse en literaturas y/o trabajos de investigaciones anteriores, se pudo apreciar que no existe un perfil cromatográfico del extracto de *L. albus* por lo que se podría establecer que este es el primero en su naturaleza y que podrá ser utilizados para futuros estudios asociados a esta planta.

Al utilizarse metanol y agua destilada como solvente se intentó separar los diferentes compuestos presentes en la planta por su afinidad polar, siendo moléculas más polares las primeras en recolectarse y posteriormente las más apolares sería las ultimas en recolectarse. En el perfil se puede apreciar que el extracto está formado por varios peak (compuestos) con diferentes afinidades polares.

Desde la década de los 80` ya se estaban informando la composición química presente en el género *Lupinus spp.* y se han comparado entre especies, pero quizás unos de los compuestos que más han llamado la atención son los alcaloides (94). Estos se encuentran en concentraciones muy variadas entre especies del mismo género de *Lupinus spp.*, pero han llamado poderosamente la atención dos alcaloides principalmente, la lupanina y la esparteína, ambas presentes en la planta de estudio de este trabajo, *L. albus* (95). En la literatura se ha informado que la esparteína puede ser usada como arrítmico mientras que en trabajo anteriores se han informado su efecto inhibitorio en bacterias (96) (97). A pesar de los beneficios de los alcaloides, se debe tener sumo cuidado su uso en el ser humano pues son tóxicas, por lo que se debe evaluar más minuciosamente su utilidad (98).

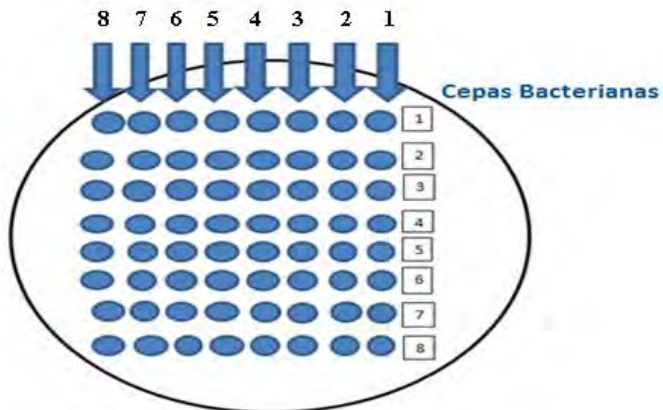
Otro grupo de moléculas que se han reportado en la planta estudiada son los llamados isoflavonoides, el cual en un trabajo se realizó un perfil cromatográfico de estas moléculas (99). Se han informado previamente que tanto los isoflavonoides como los flavonoides poseen actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* meticilino resistente (100).

En el capítulo 1.2.8.2 se mencionó que en un estudio comprobaron la actividad antimicrobiana de la semilla de *L. albus*, donde fueron capaces de aislar grupos fenoles y ensayarlas en cepas ATCC (101).

De los 10 peak recolectados, solo se pudo trabajar con cuatro, puesto que los otros seis presentaron contaminación con otros compuesto y unos de los requisitos para trabajar con la técnica de NMR es que el compuesto tenga un 100% de pureza, por lo que se descartaron. Esto pudo haberse generado principalmente a causa de que la columna trabajada en el momento de la recolección (Kromasil 100 C-18 de 10 mm) presentaba una capacidad para separar por afinidad polar inferior al de la columna utilizada para evaluar la pureza (Kromasil 100 C-18 de 4 mm). De los cuatros peak recolocados solo dos masaron la cantidad mínima según el segundo criterio por lo que se decidió complementarlo con la técnica de HPLC-masa. Los resultados están siendo analizados y por el poco tiempo que se tiene para entregar este trabajo no se podrá ensayar los compuestos identificados con cepas bacterianas. Preliminarmente se han encontrado una variedad de flavonas e isoflavonas.

### **V.1.2 CIM:**

Por recomendación de los autores de una tesis anterior a ésta, pero de la misma índole, se aconsejó utilizar la técnica de CIM y no la de difusión en agar, puesto que el extracto presenta un alto grado de oleosidad, lo que dificulta su difusión en el agar (102). Además la solución presenta un alto grado de pigmentación como también la formación de algunos precipitados persistiendo después del filtrado, por lo se descarta la utilización de técnica de absorbancia para evaluar el crecimiento bacteriano, a cambio se siembra cada pocillo en un agar de M-H para evaluar si hubo o no crecimiento después de la incubación. También al mezclar una parte de DMSO con cuatro partes de agua destilada se intenta eliminar el efecto inhibitorio del DMSO informado en la tesis mencionada anteriormente .



1= 1/2 (100 mg/mL)	5= 1/32 (6,25 mg/mL)
2= 1/4 (50 mg/mL)	6= 1/64 (3,13 mg/mL)
3= 1/8 (25 mg/mL)	7= 1/128 (1,56 mg/mL)
4= 1/16 (12,5 mg/mL)	8= Control de Crecimiento

Figura V.1: Diagrama explicativo de las diluciones y concentraciones teóricas en el agar M-H.

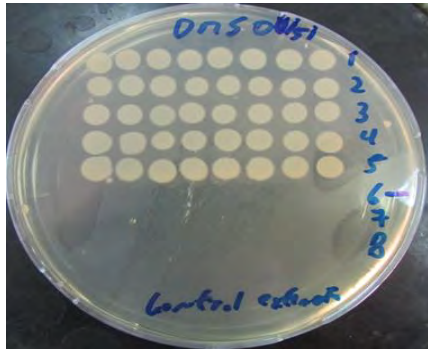


Figura V.2: Control negativo DMSO 1/5

Se consigue eliminar el DMSO como interferente en la inhibición bacteriana al observarse que hubo crecimiento desde la primera dilución (1/2).

N° 1: Cepa 2309	N° 5: Cepa K27665
N° 2: Cepa 2366	N° 6: (Vacío)
N° 3: Cepa 2462	N° 7 y 8: Control Extracto
N° 4: Cepa K28531	

Considerando que los controles son válidos, se puede establecer que las CIM obtenidas son confiables y esta correspondería a la última dilución donde no hubo crecimiento bacteriano. De las cepas *K. pneumoniae* trabajada se observa que cuatro de las cinco, presentaron una CIM de 50 mg/mL y sola una tuvo una CIM mayor que fue de 100 mg/mL, esto puede ser explicado por la variabilidad genética que presentan las cepas. Se recuerda que todas las cepas son diferentes, obtenidas de pacientes y momentos distintos.

Sin embargo los bacilos Gram negativo no fermentadores, todas presentaron un CIM de 100 mg/mL por lo que se cree que esto puede ser originado por los miles de mecanismo de resistencia que podrían tener este grupo en particular (103).

Cabe destacar que inicialmente el ensayo de susceptibilidad fue realizado con extracto *Lupinus albus* guardado a temperatura ambiente previamente. En este procedimiento los resultados no fueron favorables por lo que se decide volver a realizar exactamente el mismo protocolo pero modificando la temperatura de mencionado extracto refrigerándose a 8°C. Los resultados fueron los deseados, por lo que se llegó a la conclusión que el extracto tiene un mejor rendimiento en cuanto a su inhibición bacteriana cuando se encuentra almacenada 8°C que estando a temperatura ambiente alrededor de 28°C

### **V.1.3 Explicación del posible mecanismo de acción:**

Todo dependerá del principio activo que se esté ocupando, será el mecanismo de acción que tendrá. Existen varios estudios donde se evalúa la susceptibilidad en el mecanismo de acción. Un ejemplo es el mencionado en el capítulo 1.2.7 donde demostraron que el ácido úsnico proveniente de los líquenes genera inhibición de la síntesis del DNA y RNA por ende la bacteria no era capaz de multiplicarse y tampoco de sintetizar proteína, lo que conllevaba a su muerte celular (104).

Otro principio activo frecuentemente visto en las verduras y frutas son los grupos de quinonas, donde se ha visto que posee efectividad antimicrobiana al actuar en las proteínas de membrana, polipéptidos de la pared celular y en enzimas de la membrana. También se tiene los grupos flavonoides mencionados anteriormente, donde se ha visto que se une a proteínas extracelulares y además forman complejos en la pared bacteriana, lo que generaría inestabilidad de ésta (105).

#### **V.1.3.1 No hay participación de bombas de expulsión:**

Como se mencionó anteriormente (capítulo III.2.3.5) el compuesto carbonil cianuro m-clorofenil idrazona (CCCP) es un fuerte inhibidor de la generación de la fuerza protón-motriz, el cual es esencial por las bombas de expulsión para extraer desde el interior de las células diferentes antimicrobianos.

El ensayo consistió en comparar un tubo que poseía caldo LB, inóculo de bacteria, extracto de la planta contra otro tubo con caldo LB, inóculo de bacteria, extracto de la planta y CCCP. Al exponerlo a un antibiótico se incubó y luego se observa el resultado obtenido.



Como se expuso en el capítulo IV.1.3.1, los resultados fueron negativos, ya que la cepa tratada con CCCP en comparación a la cepa sin CCCP, los halos generados por los antimicrobianos no se encontraron diferencias significativas, por lo que se estableció que el extracto de *L. albus* no genera inhibición de las bombas de expulsión.

#### **V.1.3.2 Existen cambios en las proteínas de membrana:**

Como se puede apreciar en el resultado obtenido en la Figura IV.3 se observan claramente tres diferencias significativas.

1. Las cepas que poseen carbapenemasa no presentaron una diferencia significativa en las bandas de proteína. En cambio las cepas que presentan el fenómeno de multi-resistencia sin presencia de carbapenemasa si tuvieron resultados favorables. Esto podría explicarse a la participación de más de un mecanismo de acción para que el extracto generara inhibición bacteriana en todas las cepas.

2. Existe la presencia de una banda de proteína en la cepa no tratada con el extracto la cual desaparece en la cepa tratada con el extracto

3. Una de las bandas se concentra en la cepa tratada con el extracto en comparación a su contraparte, la cual es una banda más tenue.

En la literatura se han informado de dos importante porinas en *K. pneumoniae* que estarían involucradas en el mecanismo de resistencia antimicrobiana, la OmpK35 y la OmpK36 que pesan 38 y 36 KDa respectivamente (106) (107). Las porinas mencionadas anteriormente concuerdan con el peso de las bandas de proteína donde se obtuvieron diferencias significativas por lo que se establece que posiblemente sean las porinas OmpK36 y OmpK35 lo que se debería confirmar, es por este motivo que las bandas obtenidas fueron enviadas a Alemania para su posterior análisis. Se han informado de una tercera porina que tendría un peso similar a las mencionadas anteriormente que es la OmpK37 y que también estaría involucrada en el mecanismo de resistencia bacteriana (108).

Las porinas OmpK35 y OmpK36 son homologas a las porinas OmpF y OmpC presente en *E. coli* respectivamente. Estas porinas permitirían el paso de cefalosporinas y carbapenémicos a la célula bacteriana, por ende la pérdida de éstas porinas genera una resistencia a algunos antimicrobianos, por ejemplo la pérdida de la proteína OmpK36 le confiere a la bacteria resistencia a cefalosporina, carbapenémicos e inclusive en un aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas (109).

Las cepas *K. pneumoniae* que carecen de enzimas BLEE presentan las porinas OmpK35 y OmpK36, mientras que mayoritariamente aquellas que presentan enzimas BLEE expresan solo la OmpK36. Muy pocas cepas estudiadas que poseen enzima BLEE carecen de ambas porinas (110).

En base a los resultados obtenidos se establece que el extracto de *L. albus* posee efectividad antimicrobiana al modificar la permeabilidad de la membrana por alteración en las porinas. Queda por confirmar si las proteínas afectadas son las OmpK35, OmpK36 y/o OmpK37.

## **CAPÍTULO VI.**

### **VI.1 CONCLUSIONES**

#### **VI.1.1 Conclusión general:**

Se logró demostrar que el extracto natural extraído de la planta de *Lupinus albus* posee actividad antimicrobiana contra cepas Gram negativo de importancia clínica multi-resistente con diferencia en la concentración necesaria para generar la inhibición bacteriana.

#### **VI.1.2 Conclusiones específicas:**

1. Se logró realizar un perfil cromatográfico de la planta *L. albus* pero por el poco tiempo disponible, no se logró ensayar los compuestos recolectados en las cepas. Se concluye que el extracto está formado por diferentes compuestos relacionados a flavonas e isoflavonas, de acuerdo al análisis de HPLC-masa.

2. La planta *L. albus* produjo mayoritariamente una CIM de 50 mg/mL contra las cepas de *K. pneumoniae* multi-resistentes y un CIM de 100 mg/mL en bacilo Gram negativo no fermentadores ensayadas en este trabajo.

3. La planta *L. albus* genera una alteración de la membrana de la bacteria al interactuar con las proteína de membrana. Se sugiere que probablemente actúa a nivel de las porinas OmpK 35, OmpK 36 y/u OmpK 37.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA:

- (1) Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). "Koneman. *Diagnostico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*". Buenos Aires, Argentina. Ed. Médica Panamericana. Páginas 220 a 269.
- (2) (3) Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426-3431.
- (4) Gérvas, J. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atención primaria*, 25(8), 589-596.
- (5) (33) Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2013). Infecciones causadas por bacterias gram negativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(6), 402-409.
- (6) Rafael, C. (2014, January). Enterobacterias multirresistente y Epidemiología de las carbapenemasas. Influencia en las opciones terapéuticas. In *8th Cuban Congress on Microbiology and Parasitology, 5th National Congress on Tropical Medicine and 5th International Symposium on HIV/aids infection in Cuba*.
- (7) (29) (72) Bérdy, J. (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of antibiotics*, 65(8), 385-395.
- (8) (55) (56) (57) (58) (59) (60) Sussmann, O. A., Mattos, L., & Restrepo, A. (2002). Resistencia bacteriana. *Universitas Médica*, 43(1), 91-96.
- (9) Torres Camacho, V., & Castro Cañaviri, A. E. (2014). Fitoterapia. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 42, 2185.

(10) (82) López-Brea, M., & Domingo, D. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.

(11) Resolución N° 548 Exenta (2009). Aprueba Listado De Medicamentos Herbarios Tradicionales según lo dispuesto en el inciso segundo del artículo 44 del decreto supremo N° 1.876. Ministerio de Salud. Diario Oficial de la República de Chile.

(12) Organización Mundial de la Salud, (2015), Enfermedades No Transmisibles. Obtenido el 10 de septiembre del 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>.

(13) (14) (28) World Health Organization. (2015). World health statistics 2015. World Health Organization.

(15) Instituto Nacional de Estadística, Chile (2014). Mortalidad En Chile, 2002 Y 2012. Obtenido el 9 de octubre del 2015. [http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario\\_de\\_publicaciones/pdf/mortalidad.pdf](http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/mortalidad.pdf)

(16) Departamento de Estadística e Información de Salud. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile (Sin Fecha). Obtenido el 9 de octubre del 2015. <http://www.deis.cl/?p=51>

(17) J. Á. García-Rodríguez, J. J. Picazo (1998). “*Microbiología Médica: 2. Microbiología Clínica*”. Madrid, España. Editorial Elsevier España. Páginas 5 a 10.

(18) Organización Mundial de la Salud (Sin Fecha). “Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria”. Obtenida el 10 de septiembre del 2015. [http://www.who.int/gpsc/country\\_work/burden\\_hcai/es/](http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/es/)

(19) Unahalekhaka, A. (2011). Epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud. Conceptos básicos de control de infecciones de IFIC, 29.

- (20) Kilgore, M. L., Ghosh, K., Beavers, C. M., Wong, D. Y., Hymel Jr, P. A., & Brossette, S. E. (2008). "The costs of nosocomial infections". *Medical care*, 46(1), 101-104.
- (21) Esatoğlu, A. E., Agirbas, I., Onder, O. R., & Celik, Y. (2006). Additional cost of hospital-acquired infection to the patient: a case study in Turkey. *Health Services Management Research*, 19(3), 137-143.
- (22) (23) (24) (25) (26) Otaíza O’Ryan F., Orsini Brignole M., Pohlenz Acuña, M. (2013). Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2013. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.
- (27) González, J. B., & Escalona, B. M. P. (1997). Historia de las penicilinas. *Correo Científico Médico de Holguín*, 1(1), 1.
- (30) Díaz, M. I. R., & Magaña, A. D. (2014). ¡ El mal uso de antibióticos genera resistencia!. *Saber Más: Revista de divulgación de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, (14), 4-5.
- (31) Núñez Betancourt, A., Morales Rodríguez, C. M., Rivera Martínez, M. E., & González González, A. L. (2006). Vancomicina. Un vencedor vencido. *Medicrit*, 3(6), 136-138.
- (32) Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10, S122-S129.
- (34) World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization.
- (35) (39) US Department of Health and Human Services. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA*.

(36) (40) ECDC, E. (2009). The bacterial challenge: time to react. *Stockholm: European Center for Disease Prevention and Control.*

(37) O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob Resist.*

(38) Mejía Villatoro, C. R., Villatoro Nazareno, G., Silvestre, M., De Briz, H., Valle, R., & Gordillo, M. R. (2008). Costo del tratamiento de infecciones nosocomiales por gérmenes multirresistentes, Hospital Roosevelt, Guatemala. *Rev. Col. Méd. Cir. Guatem*, (2), 36-39.

(41) Cifuentes, M., Silva, F., García, P., Bello, H., Briceno, I., Calvo, M., & Labarca, J. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Revista chilena de infectología*, 31(2), 123-130.

(42) Cifuentes, M., Silva, F., Arancibia, J. M., Rosales, R., Ajenjo, M. C., Riedel, G., & Labarca, J. (2015). Grupo Colaborativo de Resistencia Bacteriana, Chile: recomendaciones 2014 para el control de la resistencia bacteriana. *Revista chilena de infectología*, 32(3), 305-318.

(43) (44) (46) Negroni, M. (2000). *Microbiología estomatológica*. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Páginas 123 a 127

(45) Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual*. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Páginas 202 a 215.

(47) (48) (49) (50) Pecho Galarza, E., & Avellaneda Mariscal, J. M. (2002). Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el centro médico naval de enero a diciembre del 2000. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Tesis de Pregrado). Lima, Perú.

(51) (52) (54) Fica, C. A. (2014). Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos, cocáceas gram positivas y anaerobios. Implicancias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 432-444.



(53) Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría (2007). *Manual De Antibióticos En Pediatría*. Caracas, Venezuela. Editorial Médica Panamericana. Página 6.

(61) Forbes, B. A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Páginas 181 a 183.

(62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (70) (103) Casellas, J. M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev. Panamá Salud Pública*, 30(6), 519-28.

(69) Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. (2011). *Describen las Principales Características y la Epidemiología de las Metalobetalactamasas*. Bagó. Obtenido 25 de octubre de 2015. <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb630.htm>

(71) Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211.

(73) Real Academia Española. (2014). Fitoterapia. En Diccionario de la lengua española (23<sup>a</sup> ed.). Obtenido el 25 de octubre de 2015 <http://buscon.rae.es/drae/srv/search?val=fitoterapia>

(74) Fullick A. *Las plantas y la historia de la humanidad. Farmacopea natural*. Creces. Obtenido el 25 de octubre del 2015. <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%203&tc=3&nc=5&art=634>

(75) de Catalunya, R. A. D. F. (2002). La Fitoterapia: ¿ una terapéutica para el tercer milenio?. *Revista de Fitoterapia*, 2(2), 101-121.

- (76) Roldán, A. A. (1997). *100 plantas medicinales escogidas: Una guía de plantas de todo el mundo seleccionadas por su valor terapéutico* (Vol. 175). Madrid España. Editorial Edaf S.A... Páginas 27 a 28.
- (77) (104) Maciąg-Dorszyńska, M., Węgrzyn, G., & Guzow-Krzemińska, B. (2014). Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *FEMS microbiology letters*, 353(1), 57-62.
- (78) Cumpa Santa Cruz, N., Guerra Ayala, M. I., Béjar Castillo, V., & Ruitón, F. Avances en la investigación de tioglicósidos en plantas del género *Tropaleum*, actividad antibacteriana y antifúngica. (*Dic 1991*) v. 57 (4) p. 235-244.
- (79) Chalar Vargas, L. R., Mamani, M., Carlos, J., Vargas Alvarez, E., Sejas Rebollo, M., & Romero, B. (2014). Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. *Revista Científica Ciencia Médica*, 17(1), 26-28.
- (80) Paula Silva, J. D., & Martins de Siqueira, A. (2000). Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(1), 26-29.
- (81) Rath, S., & Padhy, R. N. (2015). Antibacterial efficacy of five medicinal plants against multidrug-resistant enteropathogenic bacteria infecting under-5 hospitalized children. *Journal of integrative medicine*, 13(1), 45-57.
- (83) (89) (101) Lampart-Szczapa, E., Siger, A., Trojanowska, K., Nogala-Kalucka, M., Malecka, M., & Pacholek, B. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of lupin seeds extracts. *Food/Nahrung*, 47(5), 286-290.
- (84) Martín, S. F., Navarro, A., Ferrando, I., & Lumbreras, E. L. (2007). El descubrimient de l'últim endemisme: la tramussera valenciana. *Mètode: Revista de difusió de la investigació de la Universitat de Valencia*, (52), 106-113.

- (85) (86) Munguía, S. S., & Ripa, J. T. (2009). *Historia de las plantas en el mundo antiguo*. Madrid España. Editorial CSIC-CSIC Press. Páginas 272 y 273
- (87) Knecht, K. T., Nguyen, H., Auken, A. D., & Kinder, D. H. (2006). Effects of extracts of lupine seed on blood glucose levels in glucose resistant mice: antihyperglycemic effects of *Lupinus albus* (white lupine, Egypt) and *Lupinus caudatus* (tailcup lupine, Mesa Verde National Park). *Journal of herbal pharmacotherapy*, 6(3-4), 89-104.
- (88) Fontanari, G. G., Batistuti, J. P., da Cruz, R. J., Saldiva, P. H. N., & Arêas, J. A. G. (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chemistry*, 132(3), 1521-1526.
- (90) Ruitón, C. M. F., Alcarraz, M. R., & Vidalón, M. T. (1998). Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* cp Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. (*Jun 1999*) v. 1 (2) p. 71-80.
- (91) Malbrán, C. (2001). Manual de procedimientos para la determinación de sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. *Buenos Aires: INEI-ANLIS*, 39-66.
- (92) (102) Valderrama, C. (2015). Efecto Antimicrobiano de Metabolitos Secundarios y Extractos Naturales contra Bacterias resistente a Carbapenémicos (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Andrés Bello. Santiago, Chile.
- (93) Opazo, A., Mella, S., Domínguez, M., Bello, H., & González, G. (2009). Bombas de expulsión multidrogas en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Revista chilena de infectología*, 26(6), 499-503.

- (94) Jambrina J. L., Crespo M. C. (1985). El altramuz (Lupinus). Cultivo de futuro. Obtenido el 30 de noviembre del 2015. [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf\\_REA%2FREA\\_1985\\_01\\_2\\_8.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_REA%2FREA_1985_01_2_8.pdf).
- (95) Cubillos, A., Gädicke, P., von Baer, D., & Ahumada, F. (1999). Determinación de la dosis letal media (DL50) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marón. *Archivos de medicina veterinaria*, 31(2), 249-256.
- (96) (98) Vioque, J. (Ed.). (2000). *Jornada internacional sobre proteínas alimentarias*(Vol. 47). Universidad de Sevilla. Páginas 133 y 134
- (97) Wink, M., & Schimmer, O. (2010). Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. *Functions and biotechnology of plant secondary metabolites*, 39, 21-161.
- (99) Stobiecki, M., Malosse, C., Kerhoas, L., Wojlaszek, P., & Einhorn, J. (1999). Detection of isoflavonoids and their glycosides by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry in root extracts of lupin (*Lupinus albus*). *Phytochemical Analysis*, 10(4), 198-207.
- (100) Mukne, A. P., Viswanathan, V., & Phadatare, A. G. (2011). Structure prerequisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacognosy reviews*, 5(9), 13...
- (105) Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.

(106) (108) (109) (110) Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, Á., Tomás, J. M.,... & Benedí, V. J. (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(10), 3332-3335.

(107) Cai, J. C., Hu, Y. Y., Zhang, R., Zhou, H. W., & Chen, G. X. (2012). Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. By matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*, 50(6), 2179-2182.