



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“Análisis de la resistencia en *Escherichia coli* BLEE positiva, codificada por blaTEM-20, blaSHV-2 y del efecto inhibitor del extracto metanólico de *Ruta chalepensis* L. y un aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L.”

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICAS.**

PRESENTA:

Q.F.B EURIDICE LADISU MEJÍA ARGUETA

DIRECTORES DE TESIS:

DR. EN C. JONNATHAN G. SANTILLÁN BENÍTEZ.

DR. EN C. AURELIO MENDOZA MEDELLÍN

DRA. EN C. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 1 DE FEBRERO DEL 2019.



AGRADECIMIENTOS

A la Maestría en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, Universidad Autónoma del Estado de México

A la Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala, UBIPRO.

Al Centro Médico ISSEMyM de Toluca por proveer las cepas bacterianas de la presente tesis, con el número de protocolo 031/17.

A CONACYT, con la beca recibida con número de CVU: 850039

Número de protocolo: MCYTF-0518.

DEDICATORIAS

Primero a Dios por permitirme lograr un paso más en esta vida.

A mi madre y padre por enseñarme el valor de perseguir mis sueños a pesar de lo fuerte que sean los vientos.

A mi hermano por sus enseñanzas a lo largo de estos años, he aprendido del mejor y a seguir creciendo como tú, eres un excelente ejemplo a seguir.

A mi familia en general por el apoyo que me han brindado en todos los sentidos, con palabras de aliento como mi abuelita Teresa, mis tíos Armando y Pepe, primos, etc.

Al Dr. Jonnathan, desde las clases de licenciatura ha inculcado el investigar, además de creer en este proyecto y su gran alcance, también por sus consejos, regaños, risas, etc. Gracias Dr.

A la Dra. Margarita por azares del destino y gracias a Alonso nos conocimos y se hizo parte de este proyecto, le agradezco infinitamente por el apoyo, consejos, críticas constructivas, es aparte de una gran Dra. Una excelente persona.

Al Dr. Aurelio, gracias por el apoyo, las aportaciones a este proyecto, el crear en mí una persona que se cuestiona por los experimentos, y más que nada por estar ahí para orientar las dudas hacia la búsqueda de la razón.

A los chicos de FESI en el Laboratorio de Farmacognosia en UBIPRO, a la Dra. Ana Bertha por sus consejos, paciencia y ayuda en la realización de técnicas dentro del laboratorio. A Alonso sino fuera por la amistad que tenemos puede que no se hubiese podido extender este proyecto, gracias por tus consejos, retroalimentación, regaños y risas. A Uriel, Hatziri, Juan Pablo, Eduardo, Samara, Octavio, Alma, Dra. Karla, Juan, Paola, Angie, Eli por apoyarme, orientarme, hacer los ratos más amenos dentro del Lab., etc.

A la Dra. Lolita Hernández gracias por inculcarme desde la licenciatura el gusto por la fitoquímica, toxicología, ante todo gracias por ser mi maestra pero por ser una gran amiga.

Al Maestro Sergio Pavón y los chicos del Lab. De Microbiología en la Fac. de Química Bety, Esme, Darex gracias por permitirme trabajar en el laboratorio.

A la Dra. Mariana por sus incontables consejos, por permitirme pertenecer en este Programa de Maestría. Gracias por su constancia, esfuerzo, etc.

A mis amigos Libni, Carlos, Arturo, Vanesa, Siri, Iván, Israel, Ingrid, Halina. Gracias por estar conmigo siempre en las buenas y malas.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacognosia en UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. María Margarita Canales Martínez y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México bajo la dirección del Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez y el Dr. Aurelio Mendoza Medellín.

ÍNDICE

Contenido	pp.
Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Importancia de los antibióticos y sus mecanismos de acción	2
1.2 Importancia de precursores naturales en el control de multiresistencia bacteriana	3
1.3 Multiresistencia bacteriana y sus mecanismos.....	4
1.4 Estrategias posibles para crear nuevos tratamientos.....	7
2. Antecedentes	8
2.1 Descripción botánica y el uso de las especies vegetales	8
2.1.1 Ruda	8
2.1.2 Clavo.....	9
3. Justificación.....	11
4. Planteamiento de Problema.....	12
5. Hipótesis	13
6. Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
7. Metodología.....	14
7.1 Material vegetal.....	14
7.1.1 Zona de colecta del material vegetal.....	14
7.1.2 Colecta del material vegetal.....	15
7.1.3 Obtención del extracto de ruda	15
7.1.4 Obtención del aceite esencial de clavo.....	15
7.2 Pruebas químicas.....	16
7.2.1 Evaluación antioxidante.....	16
7.2.2 Determinación de fenoles totales.....	17
7.2.3 Determinación de flavonoides totales	17
7.2.4 Condiciones de corrida para el CG-EM	17
7.3 Evaluación de la actividad antibacteriana.....	18
7.3.1 Microorganismos usados	18
7.3.2 Evaluación en placa-agar.....	18
7.3.3 Evaluación en dilución de caldo.....	19

7.3.4	Actividad del extracto y del aceite esencial sobre la curva del crecimiento bacteriano	20
7.4	Detección molecular de genes	21
7.4.1	Extracción de DNA plasmídico	21
7.4.2	Detección de genes de resistencia bacteriana	22
7.5	Análisis estadístico	23
8.	Resultados.....	24
8.1	Material vegetal.....	24
8.2	Colecta del material bacteriano.....	28
8.2.1	Evaluación en placa-agar.....	28
8.2.2	Evaluación en dilución de caldo.....	34
8.2.3	Curva de crecimiento bacteriano	36
8.2.4	Detección molecular de genes	38
9.	Discusión	40
10.	Conclusiones.....	45
11.	Perspectivas.....	45
	Referencias	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	pp.
Figura 1. Ejemplar de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	8
Figura 2. Ejemplar de <i>Syzygium aromaticum</i> L.....	9
Figura 3. Ubicación geográfica del municipio El Oro.....	14
Figura 4. Cromatograma de gases masas del extracto metanólico de ruda.....	25
Figura 5. Cromatograma de gases masas del aceite esencial de clavo.	26
Figura 6. Antibiogramas de las 135 cepas de <i>E. coli</i> BLEE.	28
Figura 7. Gráfico de caja-bigote de los promedios de los halos de inhibición (mm), promSA (promedio de clavo), promRC (promedio de ruda), promControl (promedio del cloranfenicol).....	34
Figura 8. Cinética bacteriana de la cepa 132 ante el aceite esencial de clavo.	37
Figura 9. Cinética bacteriana de la cepa 132 con el extracto metanólico de ruda.	38
Figura 10. Gen de resistencia blaTEM-20 en DNA plasmídico de cepas <i>E. coli</i> BLEE.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	pp.
Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en el extracto metanólico de ruda....	26
Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial de clavo.....	27
Tabla 3. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición (mm).	29
Tabla 4. Determinación de la CMI y CMB de las cepas más sensibles al extracto y al aceite esencial.	35

Resumen

Ruta chalepensis L. y *Syzygium aromaticum* L. se utilizan en México como tratamiento en ciertas enfermedades, entre ellas aquellas causadas por *E. coli*. El objetivo del proyecto fue buscar nuevas alternativas de adyuvantes biológicos para proveer al paciente un tratamiento para enfermedades causadas por cepas multiresistentes de *E. coli*, siguiendo la siguiente metodología; para *Ruta chalepensis* L. se obtuvo el extracto metanólico, mientras que para *Syzygium aromaticum* L. se extrajo el aceite esencial, cabe resaltar que para el extracto como al aceite esencial se les realizó CG-GM para observar su composición. Ambas especies vegetales se les evaluó su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar, se determinó su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB), asimismo se evaluó el efecto del extracto y del aceite esencial sobre la curva de crecimiento bacteriano respectivamente. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico para observar la presencia o ausencia de genes de resistencia (*bla*TEM, *bla*SHV) por PCR y electroforesis. En este trabajo se obtuvieron datos de la composición del aceite esencial que contiene eugenol y cariofileno haciendo que este tuviera mejores resultados en la actividad antibacteriana que el extracto ($F=1.33$, $p=0.001$), para el caso del extracto la presencia de flavonoides y fenoles totales le otorgó una actividad antioxidante media (CA50) de 115 $\mu\text{g/mL}$ que de acuerdo al criterio de Al-Fatimi es un resultado relativamente bueno. Asimismo, las cepas más sensibles al extracto y al aceite esencial tuvieron la presencia del gen *bla*TEM-20 en un 28%. Por lo anterior, se concluyó que tanto el aceite esencial como el extracto metanólico tuvieron una actividad antibacteriana con un efecto bacteriostático sobre *E. coli* BLEE, y presentaron en un 28% de los casos el gen *bla*TEM-20.

1. Introducción

Actualmente, el incremento de la resistencia de los patógenos como lo es *E. coli* limita el uso de los agentes antimicrobianos disponibles, lo cual favorece la búsqueda de nuevos agentes, con nuevas formas de acción, que sean capaces de evadir los mecanismos de resistencia actuales¹⁻³.

Una opción es el uso de productos naturales de origen mineral, vegetal y animal, con propiedades terapéuticas que, por mucho tiempo, fueron las principales fuentes de fármacos; sin embargo, con el desarrollo de la química orgánica se provocó la preferencia de los productos sintéticos para el tratamiento farmacológico, ya que los compuestos puros se obtienen fácilmente, además, las modificaciones estructurales para producir sustancias potencialmente más activas y seguras favorece el incremento del poder económico de las compañías farmacéuticas con mejores rendimientos, lo que ha dejado de lado el recurrir a fuentes más naturales.

No obstante, el impacto en la terapia antibacteriana, con el descubrimiento de la penicilina (obtenida del hongo *Penicillium*) resaltó la importancia de los productos naturales, desde hace ya casi tres cuartos de siglo, se han venido produciendo numerosos antibióticos para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Esto ha dado como resultado un importante control de este tipo de enfermedades y, en consecuencia, del número de muertes por esta causa y aunque se ha controlado en la mayoría de los casos, el mal uso de los mismos al no suministrarse del modo y tiempo adecuado ocasionaron mutaciones en algunas bacterias haciéndolas resistentes a los antibióticos.

1.1 Importancia de los antibióticos y sus mecanismos de acción

Los antibióticos se clasifican por su mecanismo de acción en bacteriostáticos los cuales paran el desarrollo bacteriano o también puede ser bactericida el cual causa la muerte de la bacteria, que provoca diferentes efectos en las células bacterianas

y su mecanismo de acción va de la mano con sus funciones nutricionales, metabólicas y genéticas de las bacterias.

Dentro de los mecanismos de acción de los agentes antimicrobianos tenemos los siguientes;

- a) daño al DNA donde reaccionan en la cadena de DNA bacteriano que produce roturas en los enlaces sencillos y dobles de DNA lo que interfiere en la replicación y por ende se destruye la bacteria o,
- b) la desnaturalización de la proteína, esto cuando el antibiótico se mezcla en los procesos metabólicos de las bacterias y rompe la estructura terciaria de la proteína en sus enlaces, lo cual altera su pared celular y sus propiedades fisicoquímicas de las mismas, asimismo en cuanto a la eliminación del grupo sulfhidrilo, donde el antibiótico reacciona en el metabolismo de las proteínas que contienen cisteína la cual unida con coenzimas terminan en un grupo sulfhidrilo libre, que ocasiona un daño considerable a la bacteria.⁵

Sin embargo, desde 2012 la Organización Mundial de la Salud emitió un comunicado de alerta acerca de la resistencia bacteriana y sobre las medidas a tomarse como la prescripción de recetas para el uso racional de antibióticos, además que por sí solos estos pueden provocar efectos adversos en el organismo, algunos de estos pueden ser: alergia, resistencia y toxicidad.⁷

1.2 Importancia de precursores naturales en el control de multiresistencia bacteriana

Actualmente, cerca del 25 % de las sustancias prescritas a nivel mundial provienen de las plantas (aspirina, morfina, paclitaxel), y 121 de sus compuestos activos se convierten en fármacos de uso común (ácido acetilsalicílico). A su vez, de las 252 sustancias consideradas como básicas y/o esenciales (aquellos con disposición en todo momento y para enfermedades prevalentes) por ejemplo antimicrobianos como las cefalosporinas de 4ta y 5ta generación por la OMS, el 11% son de origen vegetal,

y que un gran número son sustancias sintéticas que se obtienen de precursores naturales⁴⁻⁷.

En los años 80's se creía que las naciones industrializadas habían desarrollado ya todas las herramientas necesarias para el control de los microorganismos patógenos, pero no fue así: el uso generalizado e indiscriminado de los antimicrobianos aceleró el desarrollo de mutaciones en los microorganismos, lo que llevó a que éstos se volvieran cada vez más resistentes a tales compuestos. Las medidas en las últimas décadas y uno de los objetivos del Plan de Acción Mundial es fomentar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, para movilizar recursos de los países, pero también explorar otras alternativas de profilaxis y tratamiento menos sujetas a la rápida aparición de resistencia, haciendo mención que desde 1987 no se ha dispuesto de un antibiótico nuevo en el mercado.

Tal resistencia se fue propagando a través de las diferentes poblaciones microbianas y con ello se vio comprometida seriamente la habilidad de los antimicrobianos para tratar dichas infecciones, un claro ejemplo es en 1987 donde se inició la investigación de la resistencia a los antimicrobianos en un patógeno entérico frecuente, *Escherichia coli* enterotoxigénica en aislamientos pediátricos se encontró resistencia a la ampicilina, la tetraciclina, la estreptomina y la kanamicina.⁸

1.3 Multiresistencia bacteriana y sus mecanismos

La sensibilidad de una bacteria ante un determinado antibiótico es determinada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la menor concentración del agente antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana⁹ y es considerada como el estándar de oro para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y, por lo tanto, es usada para la interpretación de otros métodos para probar la susceptibilidad a los antibióticos¹⁰. Estas mediciones también se utilizan para cuantificar la capacidad de los antibióticos para inhibir las bacterias. Niveles más bajos de CMI y mayores zonas de inhibición equivalen a los niveles más altos de potencial antibiótico.^{10,11}

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión de selección a la que se someten las bacterias con el uso de antibióticos, esta resistencia es un gran problema de salud pública, ante lo cual, los extractos vegetales con acción antibacteriana capaces de evadir los mecanismos de resistencia actuales, representan una importante alternativa para su uso clínico en el tratamiento de enfermedades infecciosas.^{10,11} Se ha demostrado que las bacterias tienen una gran capacidad de adaptación a la presencia de sustancias antibióticas que encuentran en su ambiente, y algunos de estos cambios genéticos no solamente se deben a la información encontrada en los plásmidos. Las mutaciones en ciertos genes explican la resistencia a diversos antibióticos.

De manera importante, se han registrado mutaciones que modifican las proteínas blanco para penicilinas, cloranfenicol, tetraciclina, entre otras, que determinan un fenotipo de resistencia a dichos antibióticos.¹²

La mutación a nivel de DNA plasmídico también se hace presente; el caso de las betalactamasas es muy ilustrativo, debido a la capacidad de adaptación de las bacterias a medios con antibióticos nuevos. Como sugiere su nombre, dichas enzimas hidrolizan los anillos betalactámicos de antibióticos como la ampicilina y la amoxicilina.¹³

Este fenómeno (mutación a nivel del DNA plasmídico) sin embargo, se extendió gradualmente a todo el mundo y algún tiempo después se volvió a registrar la presencia de cepas productoras de nuevas betalactamasas, codificadas por plásmidos, los cuales permiten a la bacteria hidrolizar penicilinas, oximinocefalosporinas y monobactámicos, y surgen principalmente debido a mutaciones en los genes blaSHV, blaTEM y blaCTX-M que son capaces de inactivar un mayor número de derivados betalactámicos, a las cuales se les conoce como betalactamasas de espectro extendido (BLEE)¹⁴. La explicación molecular subyacente a este fenómeno de ensanchamiento del espectro de betalactámicos hidrolizados por las enzimas producidas a partir de plásmidos, es la mutación de los genes que codifican las betalactamasas, es decir, la conformación de las betalactamasas originales era tal, que su sitio activo presentó afinidad sólo para los

primeros antibióticos betalactámicos utilizados¹⁴. Como resultado, se han identificado cerca de 300 variantes naturales de estos genes que codifican para el fenotipo BLEE, clasificadas por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995, basada en el peso molecular de la enzima, el punto isoeléctrico; el perfil de sustrato y la propiedad de ser inhibidas por la presencia de ácido clavulánico o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), empleándose principalmente estas dos últimas características para la organización fenotípica de las BLEE. En esta clasificación se incluyen enzimas derivadas de CTX cefotaximasas, SHV sulfihidrido-variable, TEM Temoniera y OXA resistentes a oxacilina, de las cuales las más comunes y con diseminación a nivel mundial son TEM y SHV, de frecuentes en Norteamérica es la TEM, y encontradas en enterobacterias la SHV-2, SHV-5 y TEM-20.

Existen mecanismos moleculares que propician el acumulamiento de genes de resistencia en un mismo plásmido, como es el caso de los transposones, que son segmentos de DNA que en muchos casos contienen genes de resistencia a antibióticos y son capaces de “brincar” de un plásmido a otro, o del cromosoma a un plásmido o viceversa, conociéndose dos modalidades:

- a) una en la que el transposón pasa de un sitio a otro sin dejar una copia en el sitio original y,
- b) la otra en la que el proceso involucra un evento de replicación del transposón que permite dejar una copia en el sitio original, de manera que al cabo del proceso habrá dos copias del transposón en sitios diferentes, propiciando así la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos en él contenidos¹⁵.

Este tipo de estrategias moleculares propicia la prevalencia de los genes de resistencia aún bajo condiciones parcialmente selectivas, es decir, si en cierta población bacteriana existen bacterias resistentes a algún antibiótico, por ejemplo, la amoxicilina, el uso de este antibiótico selecciona a los miembros de la población que presentan el gene involucrado en la resistencia a dicho antibiótico¹⁵. Pero si en el mismo plásmido en el que se encuentra codificada la resistencia a amoxicilina también existen genes que determinan la resistencia a cloranfenicol y a ceftriaxona por ejemplo, la permanencia de estos últimos genes se verá favorecida aún si en el

medio en el que se desarrollan las bacterias y que contiene amoxicilina, no existe cloranfenicol ni ceftriaxona.

La presión selectiva que ejerce la amoxicilina en el ejemplo señalado, basta para preservar la capacidad de resistencia a los tres antibióticos, tal es la característica de la multirresistencia¹⁶. Y esto conlleva a un factor que ha sido crucial para la adquisición de infecciones y donde la resistencia ha sido la mezcla de microorganismos que son capaces de transferir la información a través de un cruce entre ellas, a lo que se le conoce como conjugación¹⁷⁻¹⁸.

1.4 Estrategias posibles para crear nuevos tratamientos

Tomando en cuenta que esta resistencia va incrementando a lo largo de los años, las plantas medicinales son una excelente alternativa ya que son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana. Estudios realizados mostraron que entre el 70 y 80% de la población recurre a las plantas para curar diversos padecimientos que van desde un simple resfriado hasta enfermedades de tipo gastrointestinal, dermatitis, anti-inflamatorios, antioxidantes,¹⁹ sin embargo, de las más de 6000 especies usadas con fines terapéuticos en el país, sólo el 10% han sido estudiadas a nivel farmacológico, microbiológico y fitoquímico, es decir, que únicamente el 10% tiene una validación experimental de su uso popular¹⁹. Es importante mencionar que la existencia de esta medicina tradicional en México tiene el tercer lugar de la clasificación mundial y la mayoría de personas recurren a su uso. Entre las que se encuentra *Ruta chalepensis* L. y *Syzygium aromaticum* L.

2. Antecedentes

Los extractos de plantas han sido empleados por el hombre en el tratamiento de enfermedades bacterianas. Estos son mezclas complejas de metabolitos secundarios lipófilos volátiles, que son extraídos de las plantas con disolventes y destilación por arrastre de vapor²³. Los factores ambientales, la etapa de crecimiento y la salud de la planta determinan las concentraciones de los extractos²⁴. Por lo que en esta sección se muestran estudios realizados acerca de la ruda y el clavo como antimicrobianos.

2.1 Descripción botánica y el uso de las especies vegetales

2.1.1 Ruda

FAMILIA:

Rutaceae

NOMBRE
CIENTÍFICO:

Ruta chalepensis L.

NOMBRE COMÚN:

"Lula o ruda"

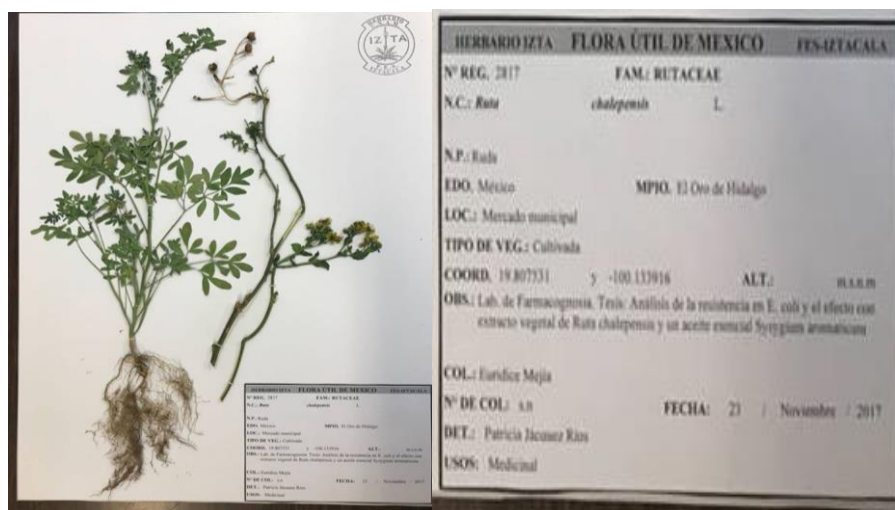


Figura 1. Ejemplar de *Ruta chalepensis* L.

Pathak et al.²⁵ y Pandey et al.²⁶ mencionaron que el extracto hidroalcohólico de hojas de ruda puede ser usado como un potente antiparasitario, antioxidante y antimicrobiano. Pandey et al.²⁴ demostraron que el extracto de ruda (*Ruta graveolens* L.) disminuyó la incidencia y gravedad de diarreas en ratones. Los constituyentes químicos del aceite esencial de ruda son: carvacrol, timol, terpineno, limoneno y linalol; dependiendo del origen y tipo de planta poseen efectos

antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes. Acciones antimicrobianas se le atribuyen principalmente al carvacrol y timol, además de que, con los extractos alcohólicos de ruda, se encontró que tienen efecto inhibitor contra *E. coli* en el método de placa-agar con un halo de inhibición de 9 mm y en difusión en caldo con 7 mm de diámetro.²⁷ Además, en estudios el extracto metanólico ejerce una actividad antibiótica contra *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Candida albicans*.²¹

Zobel et al³¹ encontraron que las hojas de ruda retardaron la actividad de la mitosis bacteriana, atribuyéndose a la presencia de xantotoxinas y psoralenos, Pandey et al²⁶ hallaron que los extractos alcohólicos y acuosos de ruda exhibieron actividad inhibitora en patógenos gramnegativos, y Delgadillo-Ruíz³² que los extractos de ruda presentaron efecto inhibitor y bacteriostático en *E. coli*.

En la Figura 1 se muestra el ejemplar de ruda identificado por el Herbario de FES Iztacala de la UNAM (ver apartado 7.1.1)

2.1.2 Clavo

FAMILIA:

Myrtaceae

NOMBRE CIENTÍFICO:

Syzygium aromaticum (L.)

Merr. & Perry

NOMBRE COMÚN:

“Clavo”

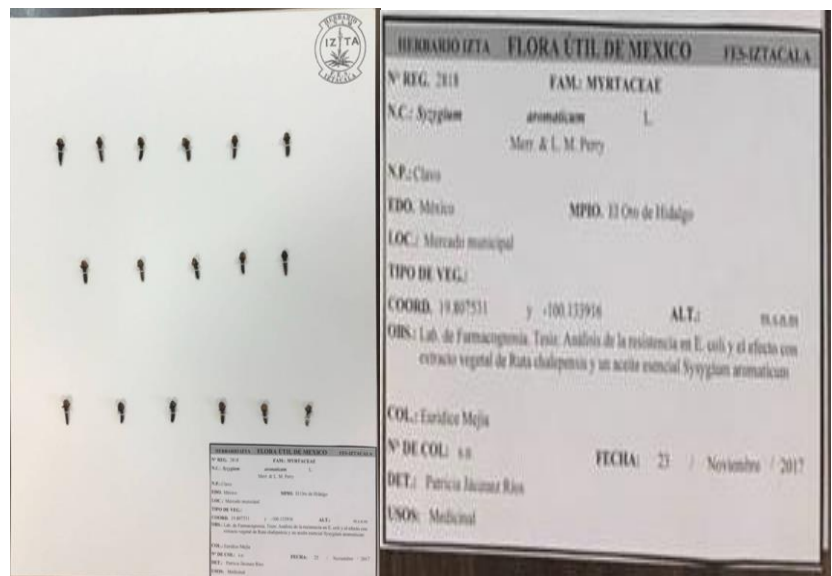


Figura 2. Ejemplar de *Syzygium aromaticum* L.

El clavo es utilizado como condimento alimenticio y también como planta medicinal para aliviar el dolor de dientes. Con tal fin, en Oaxaca y Guanajuato, se calientan

levemente unos clavos triturados y luego se aplica sobre la muela que duele; también suele usarse en Morelos contra las caries debido a que inhibe el crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, esto de acuerdo a Zhang et al³⁴ que mencionan que el eugenol permeabiliza la membrana celular y destruye irreversiblemente la integridad de la membrana plasmática e inhibe la formación de biofilm de este tipo de microorganismos. El clavo en té y como aceite esencial inhibe el crecimiento de *Candidas*²² y Pastrana et al³³ usaron un extracto de clavo encontrando que tienen efecto antimicrobiano en *E. coli* y *S. aureus*.

El extracto fenólico de *Syzygium aromaticum* en el estudio de El-Maati et al²⁸ tiene actividades antibacterianas contra el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* en un rango de concentración de 50 a 100 µg/mL. En el estudio de Ajiboye et al²⁹ se muestra que las semillas de *Syzygium aromaticum* contienen eugenol es uno de los componentes que muestra actividad antimicrobiana, obteniendo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.06 mg/mL, alterando la permeabilidad de la membrana y causando el aumento de enzimas de estrés oxidativo como lo es catalasa y superóxido dismutasa.

En la Figura 2 se muestra el ejemplar de clavo identificado por el Herbario de FES Iztacala de la UNAM (ver apartado 7.1.1)

3. Justificación

Desde el punto de vista de Salud Pública, los determinantes genéticos de mayor importancia que pueden ser codificados por plásmidos son los que codifican para los factores de virulencia y los asociados a la resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos. Por lo que, los plásmidos son los portadores de determinantes de resistencia, en muchos casos con capacidad conjugativa o de movilización.

Los plásmidos son las estructuras extracromosomales de mayor relevancia epidemiológica, por su capacidad de promover la diseminación horizontal de un gran número de genes de resistencia, lo que contribuye al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y promueve la aparición de cepas patógenas multiresistentes³⁰. Así que la evaluación de la sensibilidad de las bacterias a los diferentes agentes antibacterianos se basa sobre el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con diferentes concentraciones del agente.

La multiresistencia se debe a que existe un gran uso irracional de antibióticos. Las alternativas de tratamiento cada vez se ven más limitadas y a la fecha los extractos vegetales han sido poco utilizados como terapia antibacteriana a nivel urbano, mientras que en comunidades rurales son muy usados. Por lo cual, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia sobre los metabolitos secundarios presentes en las mismas por las diferentes especificidades a dianas de acción, lo que las convierte en una alternativa al tratamiento de cepas multiresistentes debido a sus propiedades antimicrobianas (revisar apartado 2).

4. Planteamiento de Problema

El estudio que se tiene de enfermedades comunes como es la diarrea causada por bacterias como *E. coli* es de gran importancia en la actualidad, debido a que a nivel clínico el costo-beneficio disminuye el número de nuevas moléculas de tratamiento, así como los antibióticos disponibles en el mercado incrementándose el costo para el sector salud a medida que aumenta el número de bacterias multiresistentes.

La presencia de microorganismos multiresistentes es cada vez más frecuente debido al uso irracional de antibióticos, por ello *E. coli* es uno de los microorganismos más a menudo implicado en enfermedades gastrointestinales y causantes de diarrea, ya que la producción de las enzimas betalactamasas se ha convertido en el mecanismo más frecuente de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos.

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios que son responsables de diversas actividades biológicas, como en el caso de la ruda y del clavo que son usados para combatir algunas enfermedades microbianas, pues se ha observado en algunos estudios que los extractos y aceites inhiben el crecimiento de patógenos como la *E. coli*. Por tal motivo y debido a la resistencia que presenta *Escherichia coli* y a la posible presencia de los genes blaTEM-20, blaSHV-2 en cepas BLEE positivas codificadas por plásmido podrían tener un efecto inhibitorio ante el extracto metanólico de *Ruta chalepensis* L. y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L. y así corroborar de manera científica el uso de estas especies en la medicina tradicional mexicana.

Por lo cual la pregunta a resolver en estudio es: ¿el extracto metanólico de ruda y el aceite esencial de clavo inhibirán el crecimiento de cepas *E. coli* BLEE positivas?

5. Hipótesis

Las cepas de *E. coli* BLEE que contienen los genes blaTEM-20, blaSHV-2 serán inhibidas por el extracto metanólico de *Ruta chalepensis* L. y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* L.

6. Objetivo General

Analizar la resistencia en *E. coli* BLEE positiva, codificada por los genes blaTEM-20, blaSHV-2 y la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *R. chalepensis* L. y el aceite esencial de *S. aromaticum* L.

Objetivos Específicos

- Realizar antibiogramas e identificar cepas BLEE positivo con base en los criterios establecidos por el CLSI en cepas de *E. coli*.
- Extraer y caracterizar químicamente el extracto metanólico de *R. chalepensis* y el aceite esencial de *S. aromaticum* y evaluar su actividad antibacteriana por medio de su CMI y su efecto bacteriostático o bactericida.
- Realizar el análisis de DNA plasmídico para cepas BLEE positivo, identificando los genes blaTEM-20, blaSHV-2.

7. Metodología

7.1 Material vegetal

7.1.1 Zona de colecta del material vegetal.

Las dos especies de plantas que se utilizaron en este trabajo se recolectaron en El Oro de Hidalgo, Estado de México (Figura 3), éste se encuentra situado al noroeste de la ciudad de Toluca, limítrofe con el estado de Michoacán. Forma parte de la Sierra Madre Occidental, que se extiende desde Tlalpujahua, pasa por este lugar y se prolonga por Temascalcingo y Atlacomulco. El Oro está rodeado de cerros, los más importantes son: La somera, en cuya vertiente se alza la cabecera municipal, se considera el más elevado del sistema, con una altura aproximada de 3200 msnm (msnm: metros sobre el nivel del mar); hacia el sureste de la cabecera se encuentra el Cerro Llorón, segundo en importancia; además merecen mencionarse el de la Carbonera en Tapaxco y el de la Tijera en Bassoco y a su vez tiene clima templado subhúmedo con una precipitación pluvial media anual de 859 mm.

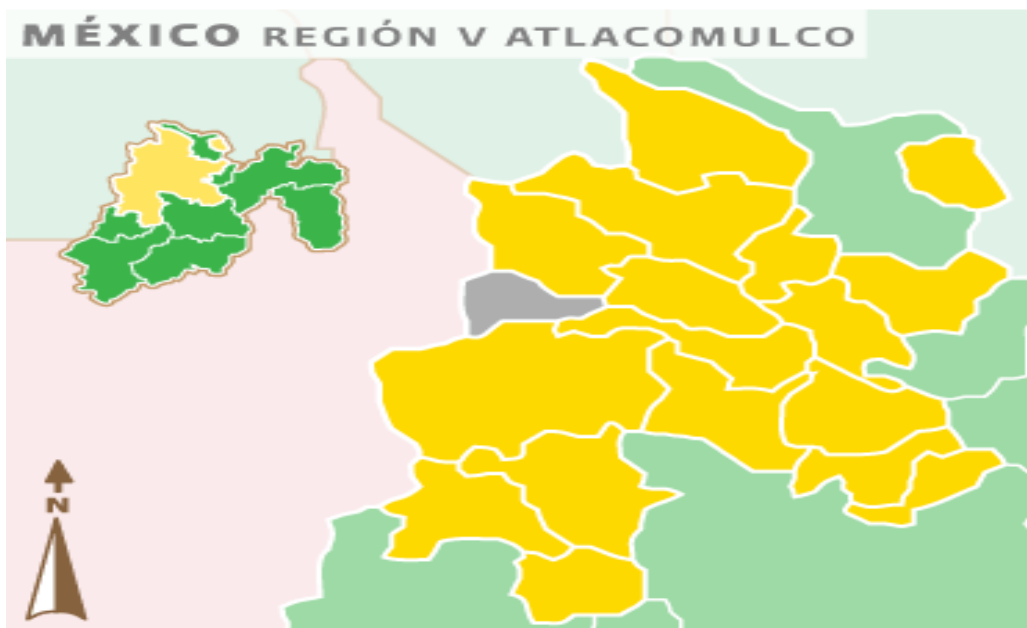


Figura 3. Ubicación geográfica del municipio El Oro.

7.1.2 Colecta del material vegetal

Ambas especies se colectaron en noviembre-diciembre del 2017, la ruda se dejó secar libre de insectos u otros residuos de otras plantas, en cuanto al clavo se compró en una tienda de abarrotes ubicada en el mismo municipio El Oro con coordenadas 19°48'03"N 100°07'53"O, el clavo se compró en el Mercado de Sonora de la CDMX por los dueños de la tienda de abarrotes. Se depositó un ejemplar de cada especie en el Herbario IZTA con los números 2817 para *Ruta chalepensis* y 2818 para *S. aromaticum* (Figura 1 y Figura 2).

7.1.3 Obtención del extracto de ruda

El extracto se obtuvo de la parte aérea de la planta seca, se utilizaron 800 g para *Ruta chalepensis* y, una vez cortadas en pedazos pequeños se obtuvo el extracto metanólico mediante la técnica de maceración³⁵ que consta en tomar la parte aérea seca y triturada de la planta y se le agrega un solvente de polaridad alta, en este caso se utilizó metanol. Una vez obtenido el extracto, se destiló el exceso de solvente a presión reducida. El extracto obtenido se colocó en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente, finalmente se calculó el rendimiento total por diferencia de peso.

7.1.4 Obtención del aceite esencial de clavo

Para la obtención del aceite esencial de los botones del clavo se pesaron 236.2 g y se molieron con un mortero para proceder a dejarlo reposar durante 1 noche en agua destilada y obtener el aceite esencial por hidrodestilación.

7.2 Pruebas químicas

7.2.1 Evaluación antioxidante

La evaluación antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) Okusa⁴¹ método modificado de Murillo⁴² con la siguiente metodología:

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de DPPH por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones partes por millón (-ppm-), por medio de espectrometría visible (VIS).

Aplicación del extracto en una placa de ELISA: se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones por triplicado, el solvente utilizado es metanol grado HPLC. Posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de la luz y se mantiene en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA.⁴²

Blanco. Pozos con 200 µL de metanol.

Control Positivo. Se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados:

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = ((C-E)/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH + metanol

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema).

La Concentración Antioxidante Media (CA50) del extracto se determinó utilizando las siguientes concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm. Como control positivo se utilizó la quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se utilizaron pozos con 200 μ L de MeOH grado HPLC.

7.2.2 Determinación de fenoles totales

La Concentración de Fenoles Totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redóx usando el reactivo Folin-Ciocalteu por el método modificado de Singleton et al.⁴³ Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en una solución estándar de 200 μ g/mL. A partir de esta solución se tomaron alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.0625, 0.125, 0.5 y 1 mg/mL) con una longitud de onda de 760 nm, a partir de la curva se interpoló la absorbancia de la muestra de ruda para calcular los equivalentes de ácido gálico. La muestra en una concentración de 1 mg/mL.

7.2.3 Determinación de flavonoides totales

Se determinó por medio del método de Dowd (Ramamoorthy y Bono),⁴⁴ empleando una solución de $AlCl_3$ al 2%. Se realizó una curva de quercetina a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ppm). Se determinó la absorbancia a 415 nm, y los resultados se expresaron como μ g equivalentes de quercetina por gramo de extracto de ruda (μ g eQ/g). La muestra en una concentración de 2 mg/mL.

7.2.4 Condiciones de corrida para el CG-EM

Se inyectó en el equipo 1 μ L del extracto de ruda y/o aceite esencial de clavo a una concentración de 3mg/mL. Se empleó un cromatógrafo 6850 Network GC System de Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas 5975C VL MSD con detector de triple eje, de la misma marca, equipado con una columna capilar

RTX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor, compuesta de dimetil polisiloxano (95 %) y fenil polisiloxano (5 %).

El modo de inyección utilizado fue un Split, radio 80:1, flujo de corrida 37 cm/seg. La temperatura del horno se programó de la siguiente forma: temperatura inicial de 70 °C durante dos minutos tras lo cual se incrementó a 8 °C/min hasta alcanzar los 270°C y después a 10 °C/min durante seis minutos. El tiempo total fue de 75 minutos; temperatura de la línea de transferencia 290 °C. Los espectros de masas que fueron obtenidos por impacto electrónico; se obtuvieron con una energía de ionización de 70 electrón Volts (eV) y se detectaron en un rango de masa desde 35 a 600 m/z. Se empleó helio como gas de arrastre. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST y la *PubMed Compound* del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

7.3 Evaluación de la actividad antibacteriana

7.3.1 Microorganismos usados

Las cepas recolectadas de *E. coli* aisladas e identificadas por medios de cultivo, bioquímicas, antibiogramas e identificadas como BLEE + VITEK ®2 Compact (BioMerieux) en el Laboratorio de Bacteriología de un Centro de Salud de la ciudad de Toluca de Lerdo, y su posterior identificación como cepas BLEE positivas. Las cepas de *E. coli* BLEE se aislaron entre julio y diciembre de 2017, manteniéndose en agar nutritivo y en refrigeración para su conservación.

Cada cepa bacteriana se suspendió en caldo Müeller Hinton (Bioxon, Edo. de México, México) y fueron incubados durante 24 horas antes de la prueba a 37 ° C en Agar Müeller Hinton (Bioxon, Edo. de México, México) para realizar los ensayos pertinentes.

7.3.2 Evaluación en placa-agar

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer³⁶ con la siguiente metodología:

El inóculo bacteriano fue incubado en 10 mL de caldo Müller Hinton a 37 ° C durante 24 h. Las colonias fueron ajustadas a una turbidez comparable al estándar McFarland (1.5×10^8 CFU/mL). Las suspensiones microbianas se colocaron en placas de agar Müller Hinton (BD Bioxon) previamente templadas, se sembró cada bacteria por estría en tapete con discos de 5 mm de diámetro (Whatman n.º5) impregnados con 10 µL de extracto (2 mg por sensidisco) o aceite a probar 3 µL, y discos con 25 µg de cloranfenicol usado como controles positivos.

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de sensibilidad, se incubaron (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35 °C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incubaron siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control (control negativo). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

7.3.3 Evaluación en dilución de caldo

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó la técnica de dilución en agar Koneman³⁸ que consta en la siguiente metodología:

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de macrodilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos (bacterias y levaduras) a los antimicrobianos se determina en fase líquida, en una serie de microtubos moldeados en una placa de ELISA de noventa y seis pozos.

La placa se prepara colocando 50 µL de caldo (Müller-Hinton para ensayos con bacterias) más el extracto o el aceite esencial en cada celda a diferentes concentraciones experimentales (en este caso para el aceite esencial 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.75, 0.875 mg/mL y para el extracto 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.781

mg/mL), las concentraciones anteriormente mencionadas se colocaron tomando el criterio de pruebas piloto para determinar los rangos de concentraciones que se requerían para el experimento.

Se prepara la suspensión bacteriana de acuerdo al método descrito anteriormente (a la metodología de la evaluación cualitativa) hasta alcanzar el estándar N° 0.5 de McFarland. De esta suspensión se toman 100 µL y se le adicionan 99.9 mL de solución salina al 0.9% obteniendo así una concentración de 1×10^5 bacterias/mL. Cada celda se inocula con 50 µL de esta suspensión bacteriana. Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 h. a 37 °C. Pasado este tiempo se añaden 50 µL a cada celda de una solución de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08% y se incuba a 37°C esta vez por 30 min.

En las celdas donde se desarrollan los microorganismos esta sustancia es reducida a formazán, produciéndose una coloración rojiza-violácea, de lo contrario significa que no hay desarrollo bacteriano y la solución permanece clara. Es muy importante mantener protegida la placa de la luz, debido a que esto puede alterar los resultados.

Interpretación de resultados:

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la CMI y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la CMB. Para obtener significancia estadística esta prueba se hace por triplicado.

7.3.4 Actividad del extracto y del aceite esencial sobre la curva del crecimiento bacteriano

Para determinar si el extracto metanólico de ruda y el aceite esencial de clavo tenía un efecto bactericida o bacteriostático, se evaluó su actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano, para la cual se preparó un tubo para cada concentración del extracto ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CMB) y otro para el testigo, de esta forma se muestreó desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros

tiempos, posteriormente dos muestras con intervalos de dos horas, una muestra a las 12 h y finalmente a las 24 h. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.³⁹ con la siguiente metodología:

Se prepara un tubo por lo menos para cada uno de los productos a probar, para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después durante dos horas, durante 4 h y finalmente a las 12 y 24 h. Posteriormente también se prepara y rotula un tubo que sirve como control del experimento.

El inóculo se obtiene aproximadamente con 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müeller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 h de incubación). Se inocula con ayuda de una micropipeta 100 μ L de la suspensión de bacterias en los tubos que contengan los productos a probar, estos deben tener la concentración de CMI, la mitad de la CMI y CMB. Se incuba en una estufa sin presión de CO₂. Se muestreó cada hora las primeras 4 h, después cada dos horas y finalmente a las 12 y 24 horas. La duración del experimento es de 24 a 36 h.

Por último, se graficó el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las ordenadas "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las abscisas "X", para determinar la cantidad necesaria del material vegetal a evaluar necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas.⁴⁰

7.4 Detección molecular de genes

7.4.1 Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA se realiza por el método de lisis alcalina, siguiendo las indicaciones descritas por de Birnboim y Doly⁴⁷ donde las bacterias de un día a otro se dejan crecer en caldo Luria, posteriormente se centrifugan 3mL en 2 fracciones a 9500 rad/s por 5 min. Se resuspenden en 100 μ L de solución I (Glucosa 50 mM; Tris.Cl (pH 8.0) 25 mM; EDTA (pH 8.0) 10 mM. Posteriormente se

adicionan 200 μL de solución II (0.2 N NaOH; 1% SDS) preparada el mismo día a partir de soluciones concentradas, mezclada por inversión e incubación en hielo durante unos minutos. Luego se adicionan 150 μL de solución III (60 mL acetato de sodio 5M; 11.5 mL ácido acético glacial; 28.5 mL de H_2O) con incubación en hielo durante algunos minutos y centrifugación a 9500 revoluciones por 5 min. Se separa el sobrenadante en tubo nuevo y se añaden 420 μL de Cloroformo-Fenol-Alcohol isoamílico. Se mezcla por inversión y se centrifuga. Se separa la fase acuosa (superior) en tubo nuevo y se añade 1 mL de Etanol Absoluto. Se desecha el sobrenadante y se lava la pastilla con etanol al 70% frío, dejando secar a temperatura ambiente algunos minutos y se resuspende en 50 μL de H_2O deionizada estéril.

7.4.2 Detección de genes de resistencia bacteriana

Se emplea como molde para la PCR 5 μL del sobrenadante obtenido en la extracción de DNA. Se emplean como oligonucleótidos (IDT) 2 parejas denominadas: *blaTEM-20* (F: GAT AAC ACT GCG GCC AAC TT y R: TTG CCG GGA AGC TAG AGT AA) y *blaSHV-2* (F: CTT TCC CAT GAT GAG CAC CT y R: CGC TGT TAT CGC TCA TGG TA) con una concentración de 12.5 μM . Las condiciones empleadas en las distintas reacciones de PCR (termociclador Techne-TC-512) son Master Mix PCR M7502 (Promega) 12.5 μL , 1 μL primer F, 1 μL primer R, muestra de DNA 5 μL y agua libre de nucleasas 5.5 μL .

Dentro del termociclador para el gen TEM-20 las etapas de PCR fueron; una desnaturalización de 5 min a 97 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, anillamiento 1 min a 56 °C (a excepción del gen *blaSHV* que requiere 54°C para el anillamiento), extensión 1 minuto a 72 °C, seguido de 10 minutos a 72 °C de extensión final. Los productos de PCR serán visualizados en geles de agarosa (Merck, Alemania) al 1.5%, en TEB 1X con tinción de bromuro de etidio. Se empleará un buffer de carga 5X colorless marcador de peso molecular de 100-2000 bp DNA (Bioline, EEUU).³⁴

7.5 Análisis estadístico

Para la evaluación en placa-agar se realizaron por triplicado y los valores luego se presentaron como media \pm desviación estándar. El análisis de los datos del aceite esencial y el extracto metanólico con respecto al cloranfenicol se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se consideraron con una prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer ($p < 0.05$), así como q_1 - q_4 para la obtención del diagrama de caja-bigote usando R-project Core-Team (2017).

8. Resultados

De la presente tesis se mandaron dos artículos; el primero de epidemiología a la revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica y el segundo con respecto al análisis con la ruda y el clavo a Journal of Food and Drug Analysis que se presenta al final de la presente tesis y como archivo adjunto.

8.1 Material vegetal

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* tuvo un rendimiento del 6.35% y una densidad de 1.16 g/mL y el extracto metanólico de *Ruta chalepensis* un rendimiento del 16.60%. El extracto metanólico de ruda presentó una actividad antioxidante media (CA50) de 115 µg/mL. Considerando el criterio de Al-Fatimi (2007)⁴⁸, donde se refiere que a una CA50 menor de 96.6 µg/mL para extractos se consideran excelentes, aunque en el intervalo de 100-1000 ug/mL todavía se consideran con actividad antioxidante buena o media, podemos afirmar que este extracto posee una buena o media capacidad antioxidante ya que el valor que presentó se encuentra dentro del rango, y esto es de suma importancia en infecciones debido a que existe en las mismas, una reacción de defensa que es la generación de radicales libres, los cuales inhiben el crecimiento de microorganismos pero también pueden afectar a las células humanas.

Además, el extracto se comparó con la quercetina el cual es un flavonoide que posee una alta capacidad antioxidante; el valor obtenido para este flavonoide fue de 1.89 µg/mL. Es necesario considerar que la quercetina es un compuesto puro y por el contrario el extracto metanólico de ruda es una mezcla de compuestos, los cuales podrían estar actuando en sinergismo y probablemente por esta razón la CA50 que presenta el extracto es menor al de la quercetina.

Se encontró que el extracto posee una concentración de fenoles totales de 133.58 mg de equivalentes de ácido gálico lo que representa 133.58 mg de fenoles totales en 1 g del extracto y de flavonoides totales 10.895 mg de eQ/g.

Asimismo, al extracto metanólico de ruda y al aceite esencial de clavo se les realizó una cromatografía de gases-masas, en la Figura 4 se muestra el cromatograma del extracto metanólico de ruda y en la Tabla 1 los compuestos identificados por la base de datos NIST (2013) y la de PubMed Compound del National Center of Biotechnology Information (NCBI) en la ruda que contiene algunos compuestos indólicos, así como en la Figura 4 se muestra el cromatograma del aceite esencial de clavo y sus componentes terpenicos como el eugenol y el cariofileno en la Tabla 2 colocando el tiempo de retención y el porcentaje de abundancia de cada uno de los compuestos identificados.

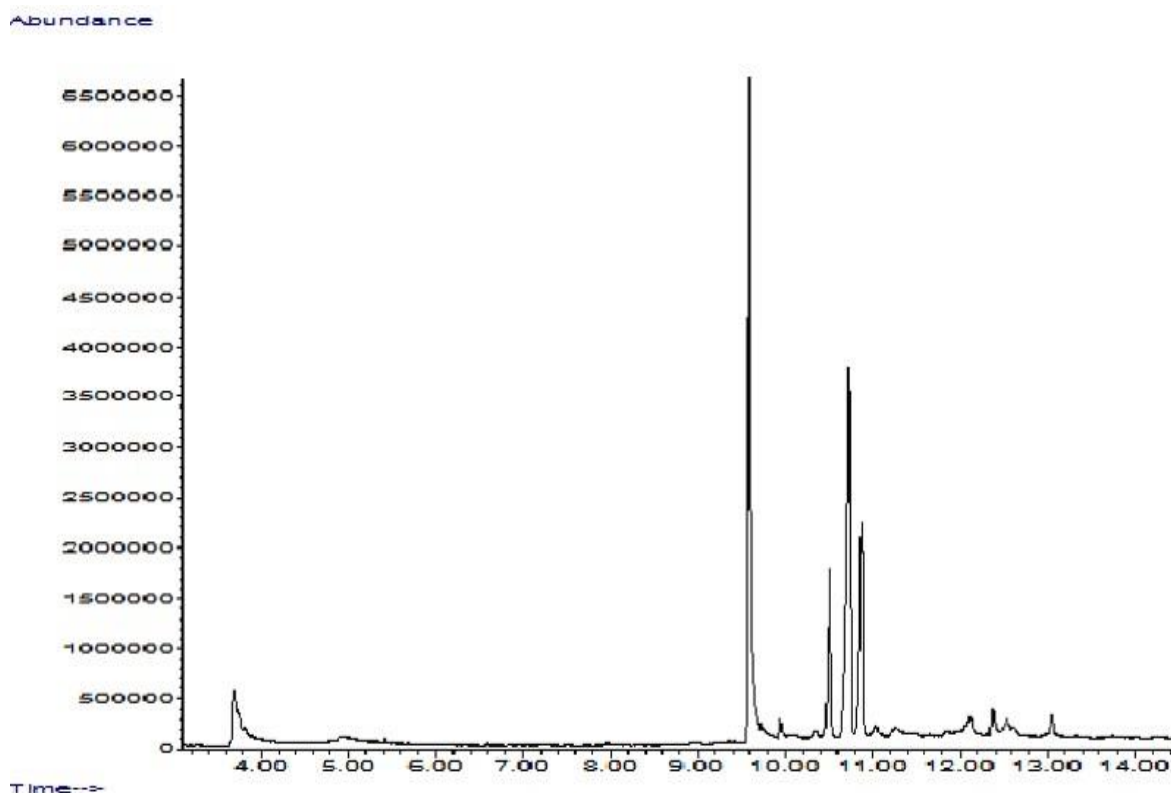
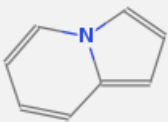
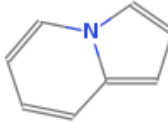
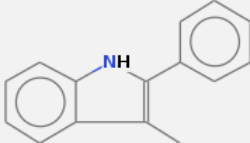


Figura 4. Cromatograma de gases masas del extracto metanólico de ruda.

Tabla 1. Metabolitos secundarios identificados en el extracto metanólico de ruda.

No. De compuesto	Tiempo de retención (min)	Compuesto	% de abundancia	Estructura
1	3.695	Indolizina	7.68	
2	4.915	Indolizina	1.621	
3	9.591	3-metil-2-fenilindol	29.602	

Abundance

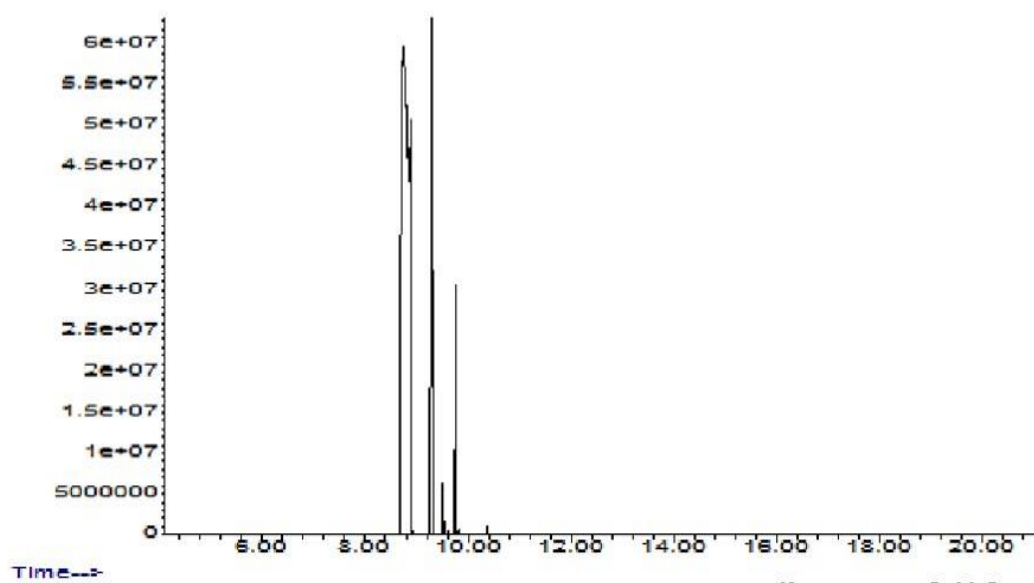
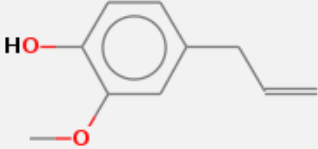
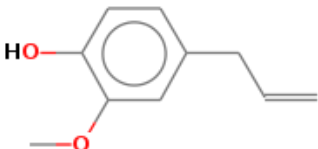
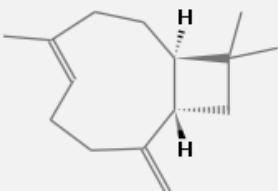
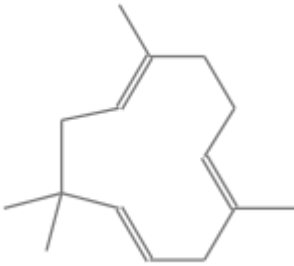
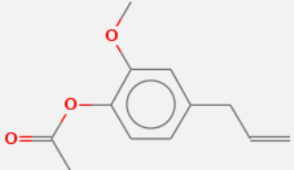


Figura 5. Cromatograma de gases masas del aceite esencial de clavo.

Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial de clavo.

No. De compuesto	Tiempo de retención (min)	Compuesto	% de abundancia	Estructura
1	8.728	Eugenol	71.44	
2	8.872	Eugenol	5.882	
3	9.305	Cariofileno	16.77	
4	9.513	Alfa-cariofileno	0.73	
5	9.762	Acetileugenol	5.178	

8.2 Colecta del material bacteriano

Se realizó una selección de muestras a conveniencia (de 135 cepas de *E. coli* productoras de BLEE) en un periodo de Julio-Diciembre de 2017. En la Figura 6 se observa que estas cepas son multiresistentes a antibióticos como Cefazolina, Ceftriaxona, Cefepima que son cefalosporinas de tercera y cuarta generación y lo cual las hace productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

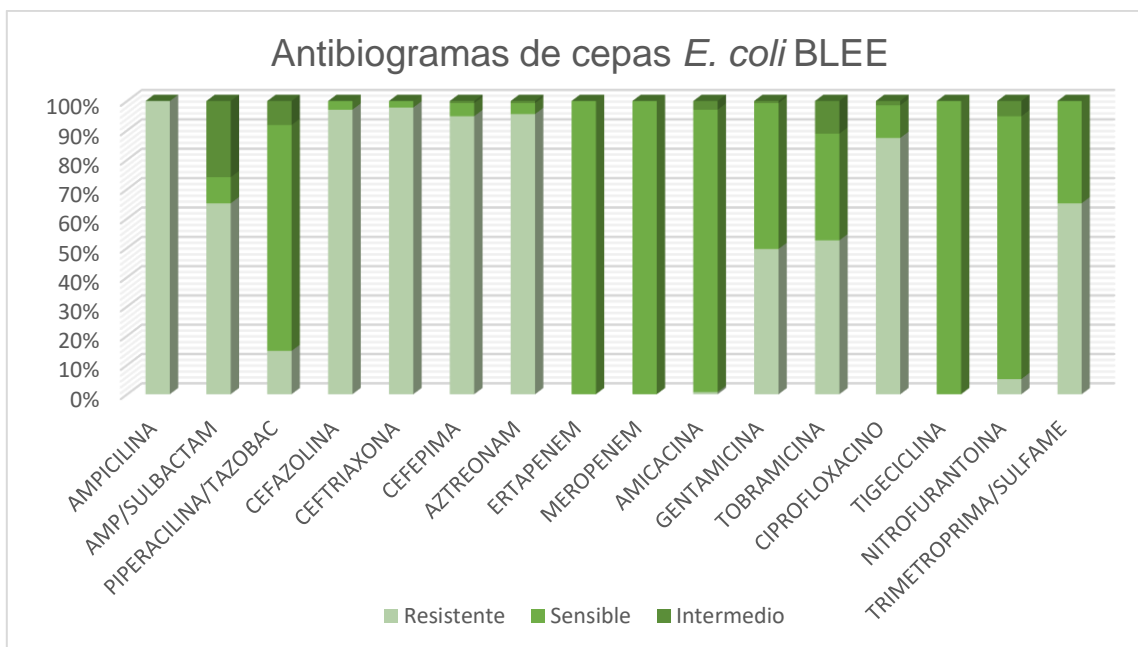


Figura 6. Antibiogramas de las 135 cepas de *E. coli* BLEE.

Para realizar los antibiogramas, la evaluación en placa-agar, determinación de CMI y CMB se usó como control la *E. coli* ATCC 25922 que es sensible a los antibióticos anteriores.

8.2.1 Evaluación en placa-agar

Posterior a la obtención del extracto y aceite esencial, se llevó a cabo la evaluación bacteriana en placa-agar, con la finalidad de obtener la sensibilidad de las bacterias al extracto y al aceite esencial midiendo los halos de inhibición, usando como control positivo se utilizó cloranfenicol.

En la Tabla 3 se muestran las medias y desviaciones estándar de los halos de inhibición, se encontró que el clavo tiene mejor efecto inhibitor con respecto a la ruda, mostrándose en verde las cepas más sensibles que se ocupan para determinar la CMI, CMB y el aislamiento del DNA plasmídico para observar la presencia de los genes de resistencia tomando como criterio de selección que el halo de inhibición fuera mayor a 21 mm de diámetro en el caso del aceite y de 10 mm en el extracto.

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición (mm).

Bacteria <i>E. coli</i> BLEE	Halos de inhibición con media y desv. Std. N.A: no activo (mm)		
	<i>S.</i> <i>aromaticum</i>	<i>R.</i> <i>chalepensis</i>	Control +
ECB1	10.33± 0.57	NA	17.33±2.30
ECB2	12.00±4.58	6.33±0.58	19.00±1.73
ECB3	15±2	6.33±0.58	21.33±0.58
ECB4	12.66±1.15	NA	7.00±1.00
ECB5	15.00±1.00	NA	16.00±1.00
ECB6	17.33±0.57	13.66±1.15	12.33±2.08
ECB7	13.33±0.57	NA	19.66±0.57
ECB8	20.66±1.15	NA	20.33±1.15
ECB9	15.00±2.00	6.33±0.58	21.33±0.58
ECB10	15.00±3.00	NA	20.33±0.57
ECB11	19.00±1.00	NA	14.33±1.15
ECB12	14.66±1.52	NA	20.33±1.52
ECB13	12.66±1.15	NA	NA
ECB14	10.66±1.15	NA	6.00±0.00
ECB15	17.66±3.78	NA	20.00±1.00
ECB16	12.00±4.58	6.33±0.57	19.00±1.73
ECB17	15.00±2.00	6.33±0.57	21.33±0.57
ECB18	13.00±1.73	6.66±0.57	16.66±0.57
ECB19	15.00±2.00	6.33±0.58	21.33±0.58
ECB20	10.33±2.51	NA	19.00±1.73
ECB21	16.66±2.51	6.33±0.57	5.5±0.00
ECB22	12.00±0.00	NA	NA

ECB23	15.33±2.08	5.00±0.00	27.66±2.08
ECB24	12.66±3.05	5.00±0.00	27.66±2.08
ECB25	11.66±1.52	5.00±0.00	7.33±0.57
ECB26	10.66±0.57	5.00±0.00	19.00±1.00
ECB27	11.66±1.52	5.00±0.00	NA
ECB28	15.66±0.57	5.00±0.00	28.66±2.30
ECB29	17.66±2.51	5.00±0.00	7.33±0.57
ECB30	16.00±2.00	5.00±0.00	29.00±1.73
ECB31	15.00±0.00	5.00±0.00	26.00±1.73
ECB32	20.00±0.00	5.00±0.00	26.33±2.31
ECB33	18.00±0.00	5.00±0.00	25.33±4.16
ECB34	19.00±1.73	5.00±0.00	6.33±0.58
ECB35	11.00±1.73	5.00±0.00	6.00±1.00
ECB36	14.67±1.53	5.00±0.00	16.67±2.89
ECB37	11.00±1.00	7.00±0.00	23.33±1.53
ECB38	18.00±0.00	5.00±0.00	6.33±0.58
ECB39	21.67±0.58	5.00±0.00	28.33±2.89
ECB40	10.67±3.79	5.00±0.00	22.33±0.58
ECB41	25.00±0.00	5.00±0.00	26.33±1.15
ECB42	10.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
ECB43	17.00±0.00	6.00±0.00	23.67±1.15
ECB44	10.33±0.58	6.00±0.00	7.00±0.00
ECB45	10.67±0.58	5.00±0.00	19.67±0.58
ECB46	14.33±1.15	5.00±0.00	20.00±0.00
ECB47	20.00±0.00	5.00±0.00	22.67±0.58
ECB48	18.00±1.73	5.00±0.00	5.00±0.00
ECB49	12.33±0.58	5.00±0.00	29.67±1.53
ECB50	15.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
ECB51	10.00±0.00	5.00±0.00	30.67±1.15
ECB52	17.00±0.00	5.00±0.00	29.00±1.73
ECB53	12.00±0.00	5.00±0.00	23.33±1.53
ECB54	17.33±2.52	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB55	20.00±3.00	5.00±0.00	27.67±2.52
ECB56	10.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00
ECB57	21.33±1.15	5.00±0.00	21.33±1.53
ECB58	20.00±0.00	5.00±0.00	5.00±0.00

ECB59	17.33±0.58	11.67±0.58	20.67±0.58
ECB60	14.33±3.21	5.00±0.00	23.00±1.00
ECB61	19.33±1.15	5.00±0.00	5.00±0.00
ECB62	19.00±3.61	5.00±0.00	20.33±0.58
ECB63	13.67±1.15	5.00±0.00	22.33±0.58
ECB64	15.67±1.15	5.00±0.00	5.00±0.00
ECB65	7.00±0.00	5.00±0.00	27.00±3.46
ECB66	18.67±1.15	5.00±0.00	25.67±2.89
ECB67	11.67±1.53	5.00±0.00	25.00±0.00
ECB68	12.00±0.00	7.00±0.00	8.00±1.00
ECB69	17.33±2.52	5.00±0.00	24.00±1.73
ECB70	12.00±4.58	6.33±0.58	19.00±1.73
ECB71	10.00±0.00	5.00±0.00	28.33±0.58
ECB72	17.00±0.00	5.00±0.00	25.00±0.00
ECB73	15.00±0.00	5.00±0.00	26.33±4.04
ECB74	27.67±2.52	5.00±0.00	21.00±1.00
ECB75	20.00±0.00	5.00±0.00	20.00±0.00
ECB76	19.00±1.73	10.00±0.00	10.00±0.00
ECB77	20.00±0.00	5.00±0.00	21.33±1.53
ECB78	19.00±1.73	5.00±0.00	25.00±0.00
ECB79	15.00±2.00	6.33±0.58	21.33±0.58
ECB80	21.33±1.15	5.00±0.00	22.67±2.52
ECB81	18.00±1.73	5.00±0.00	23.67±1.15
ECB82	12.67±0.58	5.00±0.00	13.33±1.53
ECB83	19.33±1.15	5.00±1.15	20.67±1.15
ECB84	16.33±1.15	10.00±0.00	9.00±1.73
ECB85	13.33±1.15	5.00±0.00	17.66±0.58
ECB86	21.00±1.00	5.00±0.00	20.33±2.52
ECB87	11.66±0.58	5.00±0.00	22.66±2.08
ECB88	11.33±0.58	5.00±0.00	20.00±0.00
ECB89	14.00±1.73	9.66±1.53	11.00±1.00
ECB90	12.00±4.58	6.33±0.58	19.00±1.73
ECB91	10.33±1.15	5.00±0.00	21.66±1.53
ECB92	11.33±0.58	5.00±0.00	20.00±0.00
ECB93	11.66±0.58	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB94	13.00±1.00	5.00±0.00	21.66±1.15

ECB95	11.33±0.58	5.00±0.00	6.66±0.58
ECB96	22.66±0.58	5.00±0.00	6.66±0.58
ECB97	13.33±1.53	5.00±0.00	22.33±2.52
ECB98	13.33±1.15	5.00±0.00	17.66±0.58
ECB99	11.66±1.15	5.00±0.00	28.33±0.00
ECB100	14.33±0.58	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB101	11.33±0.58	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB102	11.33±1.15	5.00±0.00	21.33±1.53
ECB103	11.00±1.00	5.00±0.00	20.00±0.00
ECB104	10.66±1.15	5.00±0.00	22.33±1.15
ECB105	11.00±1.00	5.00±0.00	22.00±0.00
ECB106	10.66±0.58	5.00±0.00	24.66±1.53
ECB107	11.66±0.58	5.00±0.00	22.33±2.52
ECB108	19.33±1.15	5.00±0.00	7.33±0.58
ECB109	11.66±0.58	5.00±0.00	22.33±2.52
ECB110	12.33±0.58	5.00±0.00	16.66±3.51
ECB111	13.33±1.53	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB112	11.00±1.73	5.00±0.00	20.00±0.00
ECB113	11.33±1.15	5.00±0.00	19.33±1.15
ECB114	16.66±3.51	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB115	18.66±1.53	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB116	13.33±1.53	5.00±0.00	27.33±2.52
ECB117	12.33±0.58	5.00±0.00	12.00±0.00
ECB118	25.00±0.00	5.00±0.00	24.33±1.15
ECB119	20.00±0.00	14.66±0.58	22.33±2.52
ECB120	20.00±0.00	5.00±0.00	27.66±2.52
ECB121	18.00±1.73	17.33±1.15	18.00±1.73
ECB122	22.00±0.00	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB123	21.00±1.73	18.66±1.15	13.33±0.58
ECB124	20.00±0.00	r14.33±1.15	24.00±1.73
ECB125	22.33±0.58	5.00±0.00	22.00±1.00
ECB126	21.33±1.15	5.00±0.00	7.00±0.00
ECB127	17.00±0.00	12.33±0.58	24.33±3.79
ECB128	20.00±0.00	5.00±0.00	6.33±0.58
ECB129	22.66±0.58	5.00±0.00	24.33±2.31
ECB130	26.66±1.53	5.00±0.00	17.33±0.58

ECB131	12.00±4.58	6.33±0.58	19.00±1.73
ECB132	24.33±1.15	15.33±1.53	22.33±4.04
ECB133	21.00±0.00	14.33±1.15	21.00±1.00
ECB134	25.00±0.00	6.33±1.15	19.33±1.15
ECB135	18.00±0.00	15±2	21.00±1.00
ATCC 25922	25.00±0.00	5.00±0.00	14.66±0.57

En la Tabla 3, el extracto metanólico de ruda presentó una media (Me=5 mm) menor, en comparación con el aceite esencial de clavo (Me=15 mm), debido a que existieron en su mayoría de las cepas un promedio de halos de inhibición de 5 mm, que después en la Figura 7 se observa una diferencia entre medianas entre promSA (aceite esencial de clavo), promRC (extracto metanólico de ruda) y promControl, por lo que al realizarse una prueba estadística si hay diferencias significativas (F=1.33, p=0.001) donde el aceite esencial de clavo presentó los mayores halos de inhibición, en comparación con el extracto de ruda.

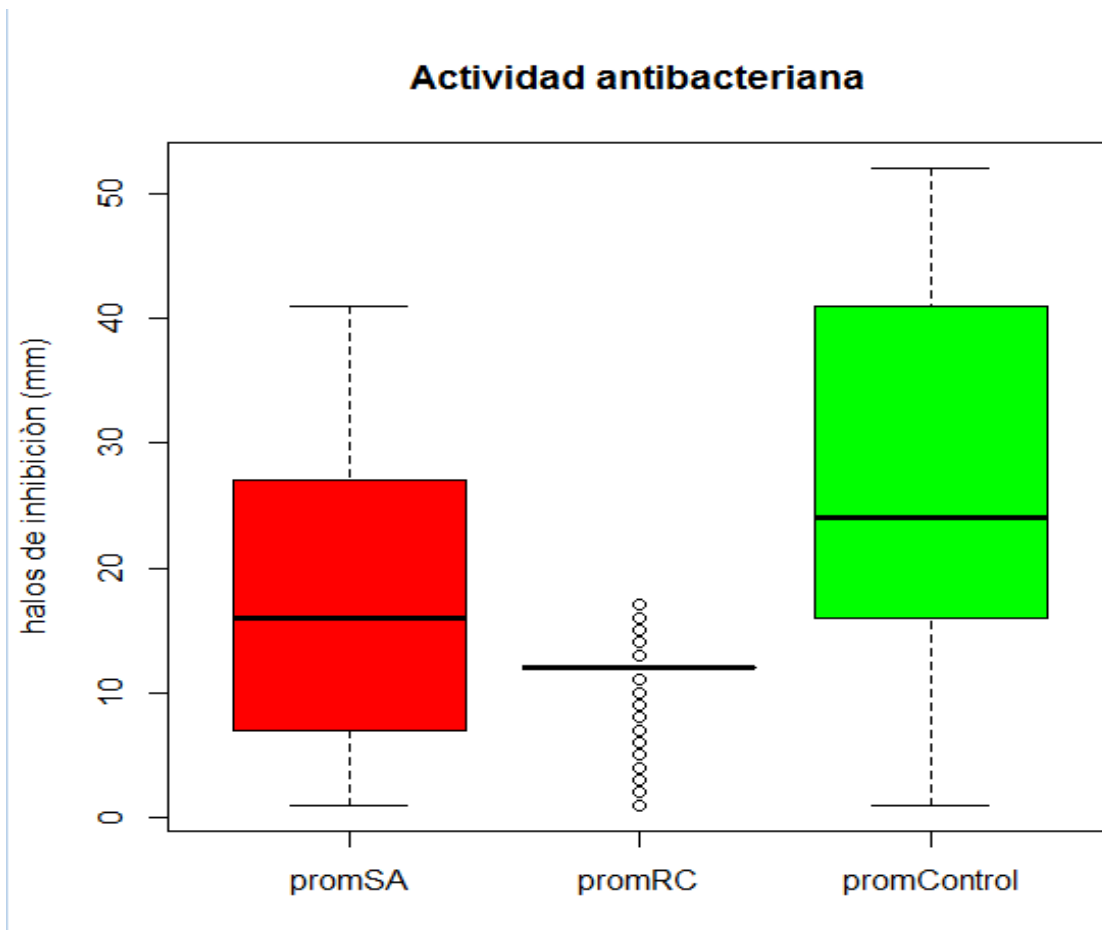


Figura 7. Gráfico de caja-bigote de los promedios de los halos de inhibición (mm), promSA (promedio de clavo), promRC (promedio de ruda), promControl (promedio del cloranfenicol).

8.2.2 Evaluación en dilución de caldo

Una vez que se observó qué cepas bacterianas fueron sensibles al extracto y/o al aceite esencial, se determinó la CMI y CMB para saber a qué concentración se inhibe el crecimiento de dichas bacterias. Tomando que para el aceite esencial la concentración del Stock fue de 80 mg/mL y para el extracto 100 mg/mL.

Los resultados obtenidos de la determinación de la CMI y CMB del extracto de *R. chalepensis* y al aceite esencial de *S. aromaticum* se encuentran en la Tabla 4, en la cual se observa que en la cepa 123 con clavo y ruda existe un comportamiento

similar. Sin embargo, la mejor cepa para realizar la cinética bacteriana es la 132 donde para *R. chalepensis* la es CMI: 0.78 mg/mL y CMB: 3.125 mg/mL y para *S. aromaticum* es CMI: 10 mg/mL y CMB: 80 mg/mL, ya que niveles más bajos de CMI y mayores zonas de inhibición equivalen a los niveles más altos de potencial antibiótico en una sustancia.^{10,11}

Tabla 4. Determinación de la CMI y CMB de las cepas más sensibles al extracto y al aceite esencial.

Bacteria <i>E. coli</i> BLEE	Unidad medida en mg/mL			
	<i>S. aromaticum</i>		<i>R. chalepensis</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
ECB39	20	40		
ECB41	20	>40		
ECB57	20	40		
ECB59			12.5	25
ECB74	20	40		
ECB80	20	40		
ECB86	20	40		
ECB96	20	40		
ECB118	20	40		
ECB119			25	50
ECB121			25	50
ECB122	10	40		
ECB123	20	40	25	50
ECB124			25	50
ECB125	20	>40		
ECB126	20	40		
ECB127			12.5	25
ECB129	20	40		
ECB130	20	40		
ECB132	10	80	1.56	3.125
ECB133	40	>40	12.5	25
ECB134	20	40		
ECB135			12.5	25

ATCC 25922	20	40	12.5	25
------------	----	----	------	----

8.2.3 Curva de crecimiento bacteriano

Después de haber determinado la CMI y CMB, se realizaron curvas de crecimiento bacteriano para saber en qué tiempo había un descenso drástico de la población, es decir, en qué periodo de tiempo el extracto y/o el aceite esencial actuaban como bacteriostático o bactericida.

El criterio para seleccionar la cepa bacteriana en las siguientes cinéticas fue usar aquella cepa más sensible; de ambas especies fue la cepa 132, es decir las cepas con las menores concentraciones determinadas para CMI y la CMB (las más sensibles), para el extracto metanólico de ruda se tomó una CMI= 1.56 mg/mL, $\frac{1}{2}$ CMI= 0.78 mg/mL, CMB= 3.125 mg/mL y para el aceite esencial de clavo se tomó una CMI=10 mg/mL, $\frac{1}{2}$ CMI= 5 mg/mL, CMB= 80 mg/mL.

En la Figura 8 se muestra la cinética bacteriana de la cepa 132 de *E. coli* BLEE con el aceite esencial de clavo, este con respecto al grupo Testigo que es la bacteria sola, $\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CMB tuvo una actividad bactericida hasta las 12 h, después existe un incremento en la población a las 24 h, lo cual permite definir a este aceite con efecto bacteriostático a unidosis.

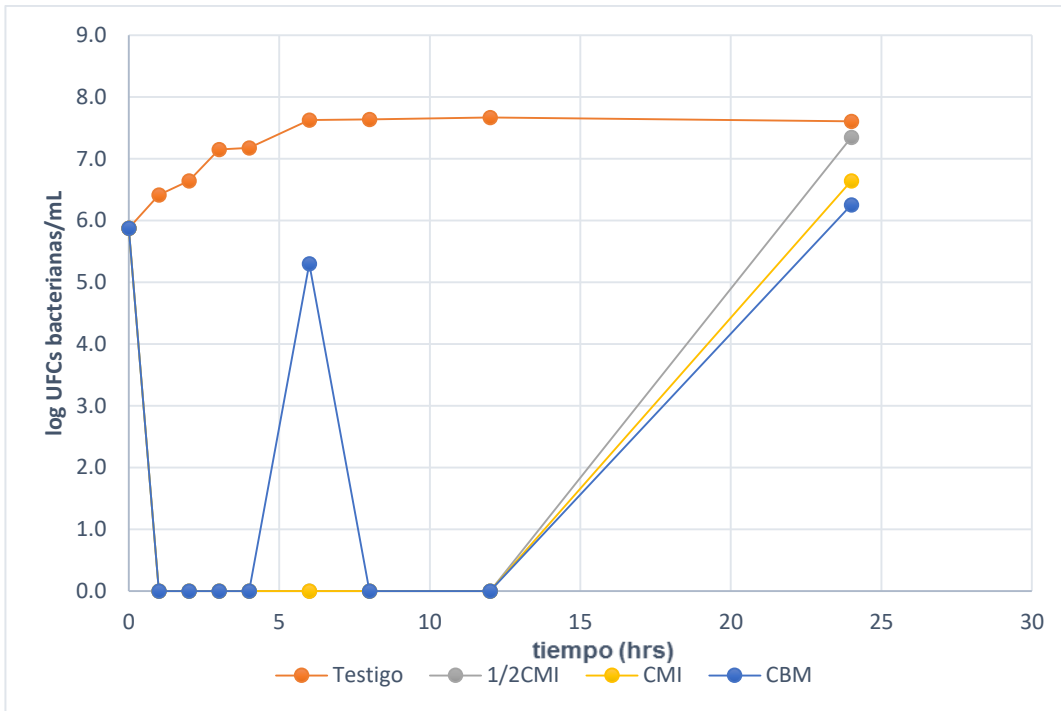


Figura 8. Cinética bacteriana de la cepa 132 ante el aceite esencial de clavo.

En la Figura 9 se muestra que el extracto metanólico de ruda con respecto al grupo Testigo que es la bacteria sola, 1/2 CMI, CMI y CBM tuvieron oscilaciones en resultados al llegar hasta las 12 h, la disminución del crecimiento bacteriano se muestra evidentemente hasta las 24 h, lo cual permite definir a este aceite con efecto bacteriostático a unidosis.

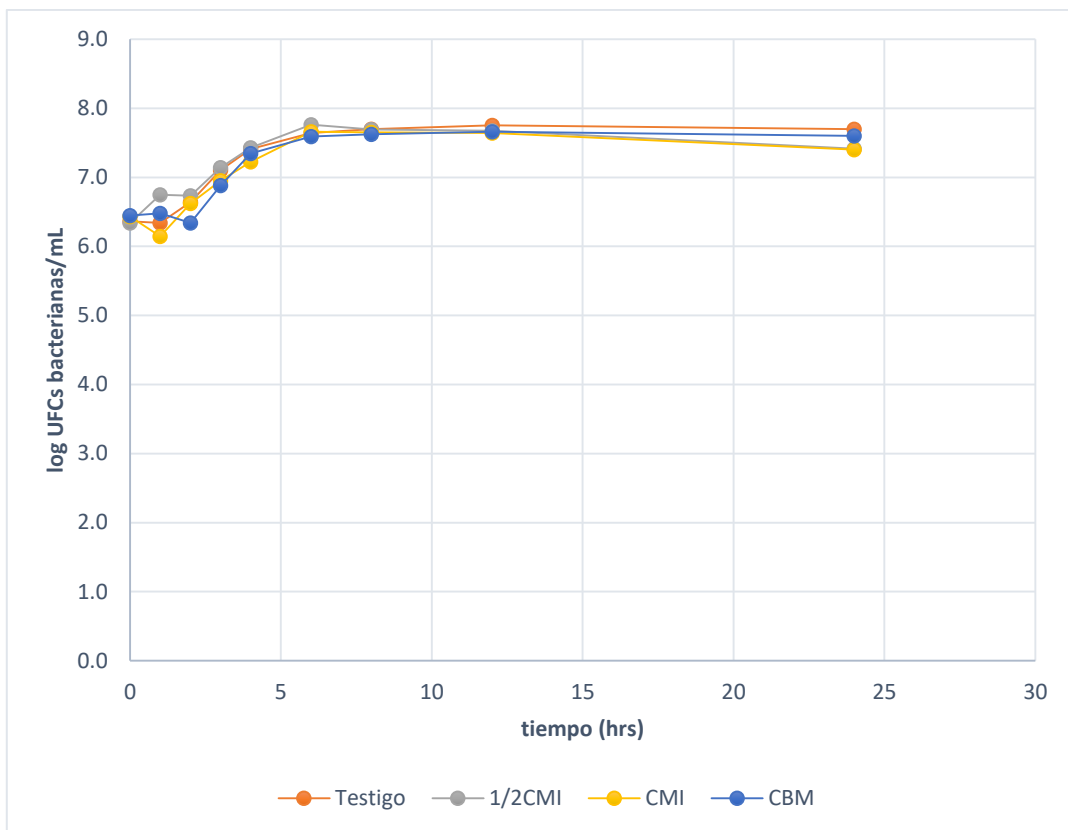


Figura 9. Cinética bacteriana de la cepa 132 con el extracto metanólico de ruda.

8.2.4 Detección molecular de genes

Para el caso de la extracción del DNA plasmídico se ocuparon las cepas más sensibles (Tabla 4), de las que para el gen blaTEM-20 solo resultaron positivas 6 cepas; y para el caso del gen blaSHV-2 las cepas resultaron negativas. En la Figura 10 se muestran los resultados positivos donde el gen se presenta a 225pb.

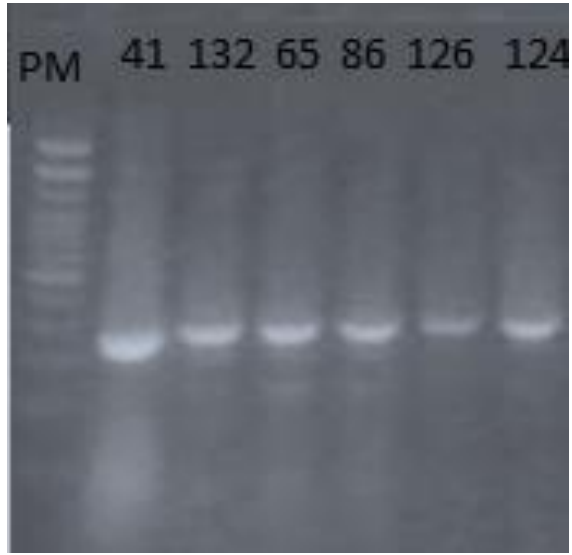


Figura 10. Gen de resistencia blaTEM-20 en DNA plasmídico de cepas *E. coli* BLEE.

9. Discusión

En los últimos años, numerosas investigaciones se han encaminado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales como búsqueda para encontrar alternativas terapéuticas para combatir infecciones causadas por bacterias multiresistentes. Dentro de ellas, un considerable número de estudios han sido llevados hacia la evaluación de la actividad antiinflamatoria, antioxidante o antimicrobiana de extractos y otros productos de plantas medicinales y aromáticas. Dentro del grupo de estas plantas, se han identificado una serie de moléculas con actividad contra diferentes géneros y especies de bacterias y hongos de importancia clínica para los humanos, convirtiéndose en una alternativa para el desarrollo y la formulación de nuevos fármacos antimicrobianos con menores efectos secundarios, mayor espectro de acción y menor costo que los disponibles actualmente para el tratamiento de las infecciones microbianas⁴⁹ de fácil adquisición por la comunidad y usadas desde épocas prehispanicas ya en ciertas zonas rurales por las personas para combatir malestares.

En el municipio de El Oro como en otros lugares de nuestro país el clavo y la ruda en té son utilizados para el tratamiento infecciones bucales, dolores abdominales, etc. Además, la ruda ha sido reportada por tener actividad antibacteriana, con actividad antiacetilcolinesterasa, antioxidante, ansiolítica, antifúngica, antihiper glucemiante, por varios autores (Ouerghemmi; Khadhri; Castro-Bolaños; Loizzo; Meléndez).⁵⁰⁻⁵⁴ En cuanto al clavo se han reportado actividades anticancerígenas, neuroprotector, hepatoprotector, antimicrobiano (Venugopal; Shekar; Jose; Sathiskumar).⁵⁵⁻⁵⁸

Además que en infecciones causadas por microorganismos como *E. coli*, el sistema inmunitario responde mediante diversas reacciones de defensa generando radicales libres que son sustancias oxidantes que inhiben el crecimiento de los microorganismos causantes de la enfermedad. Estos compuestos oxidantes (como el peróxido de hidrógeno,) también afectan a las células del humano, por lo cual se

consideró pertinente evaluar la actividad antioxidante. Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.⁶⁵ Teniendo que para el caso del extracto metanólico de ruda tiene una actividad antioxidante media (CA50) de 115 µg/mL de acuerdo con el criterio de Al-Fatimi⁴⁴, este valor corresponde al rango de mediana actividad antioxidante, que están relacionadas con la concentración de compuestos fenólicos y flavonoides.

Todas y cada una de las propiedades biológicas que presentan el clavo y la ruda se deben a los metabolitos secundarios que son sintetizados por las mismas. Estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros, es decir, para su éxito ecológico (Araujo, 2008)⁶⁶. Por tal motivo, estos productos se sometieron a CG-EM para saber cuáles son los compuestos responsables de las diferentes actividades biológicas que se muestran en la Tabla 1 y 2 donde el extracto metanólico presentó índoles e indolizinas y el aceite esencial presentó a eugenol, cariofileno, los cuales han sido reportados por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

En la evaluación de la actividad antibacteriana de la ruda y clavo, se puede observar que el extracto metanólico de ruda presentó una media menor (promRC=5 mm), en comparación con el aceite esencial de clavo (promSA=15 mm), debido a que existieron en su mayoría de las cepas un promedio de halos de inhibición de 5 mm por lo que si hay diferencias significativas ($F=1.33$, $p=0.001$) observándose en el la Figura 7, es decir, el aceite esencial de clavo presentó los mayores halos de inhibición, en comparación con el extracto de ruda.

Lo anterior confirma entonces que los halos de inhibición fueron de mayor diámetro para *S. aromaticum*, al menos para la prueba en placa-agar, esto puede deberse a las diferencias estructurales y composición de los grupos bacterianos y la susceptibilidad de cada cepa al extracto y aceite probados, las Gram negativas en donde estructuralmente presenta una membrana más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga et

al; Gros et al.; Nikaido y Nakae).^{59,45,60} Además, los mecanismos de resistencia que han desarrollado las bacterias son muy variados y van desde bombas de flujo que disminuyen la concentración del antibiótico en el interior de la bacteria, hasta modificaciones y cambios en la molécula blanco, sitio al cual se une el antibiótico, también se presentan en algunos mecanismos de resistencia, variaciones de la membrana plasmática, que no permiten el paso del antibiótico y la creación de enzimas que hidrolizan el antibiótico volviéndolo inactivo⁸.

En la determinación de la CMI y CMB, el extracto y aceite esencial de la ruda y el clavo tuvieron actividad en las cepas más sensibles, mostrándose mayor sensibilidad en la cepa 132 mostradas en la Tabla 4.

Es importante mencionar que los agentes antimicrobianos se pueden clasificar como bacteriostáticos o bactericidas. Los agentes bacteriostáticos inhiben la multiplicación, de tal manera que solo hay un descenso drástico de la población bacteriana para que el sistema inmune acabe con ellos después de haber tomado el antibiótico. Los agentes bactericidas tienen una acción letal sobre los microorganismos bacterianos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados.⁶¹

En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la ruda y clavo tienen un efecto inhibitorio en bacterias *E. coli* multiresistentes y con efecto bacteriostático aunque en mayor medida el aceite esencial de clavo, pues como se observa en la Figura 8 hasta el tiempo de 12 h se observa una disminución de la población bacteriana en unidosis, aunque la CMI y CMB son mayores con respecto al extracto metanólico de ruda que se observan en la Figura 9.

El efecto bacteriostático por parte de la ruda y el clavo se podría deber a que las bacterias pertenecientes a *E. coli* han creado medidas de supervivencia como lo son las enzimas llamadas betalactamasas de espectro extendido que son enzimas inactivantes,⁶² lo cual podría interferir en el efecto de este tipo de productos

naturales pues la bacteria tiene membranas de alta selectividad, lo que le permite repeler compuestos tóxicos para la misma. Si bien es cierto que existe un comportamiento sinérgico entre todos los compuestos del extracto y del aceite esencial, y que es la causa principal del comportamiento bactericida a cierto punto de la cinética, se debe tomar en cuenta que la genética de la población bacteriana no es igual.⁶³

Un antibiótico útil debe poseer toxicidad selectiva, es decir, la inhibición selectiva del crecimiento de los microorganismos sin dañar al hospedero y poder reconocer las células diana bacterianas como la pared celular, los ribosomas, los ácidos nucleicos y la membrana celular, para así poder inhibir el crecimiento o lisar las células.⁶⁴

Por lo anterior, la presencia de ciertos metabolitos como lo son; el eugenol en el estudio de Ajiboye et al.²⁹ es uno de los componentes que muestra actividad antimicrobiana, obteniendo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.06 mg/mL, alterando la permeabilidad de la membrana y causando el aumento de enzimas de estrés oxidativo como lo es catalasa y superóxido dismutasa, a su vez el cariofileno en el estudio de Danham, et al.⁶⁷ muestra una actividad antimicrobiana en Gram positivos y Gram negativos como *E. coli*.

En un estudio de Ouerghemi et al.⁵⁰ los extractos metanólicos de ruda inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* multiresistentes. Por otro lado, la eficacia de estos extractos frente a las bacterias podría deberse en parte a su composición fenólica. De hecho, varios estudios atribuyeron el efecto inhibitor de los extractos de plantas contra patógenos bacterianos a su composición fenólica.⁶⁸⁻⁶⁹

El efecto inhibitor de los compuestos fenólicos podría explicarse por la adsorción a las membranas celulares, la interacción con las enzimas, el sustrato y la privación de iones metálicos.⁷⁰

Con esta investigación se valida experimentalmente el uso de la ruda y clavo en México, por tal motivo, es importante preservar y difundir estos conocimientos para un uso sustentable de estos, ya que son muy usadas en nuestro país.

Toda la información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida en una única molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente. Dicha molécula se denomina cromosoma bacteriano. Muchas bacterias poseen además DNA extracromosómico, también circular y cerrado, denominado DNA plasmídico por estar contenido en los plásmidos. Aunque el DNA plasmídico no porta información genética esencial para la vida de la bacteria, sí porta genes que le confieren nuevas propiedades fenotípicas y que en algunos casos le son útiles para su adaptación al crecimiento en determinados ambientes.

Muchas bacterias potencialmente patógenas para el hombre, solo son capaces de comportarse como tales cuando portan un plásmido que contiene genes que le permiten expresar moléculas de adhesión a los tejidos del huésped o sintetizar sustancias tóxicas para éste. En otros casos, los plásmidos contienen genes que codifican enzimas capaces de degradar algunos antibióticos, permitiendo que la bacteria sobreviva a la acción de los mismos. La adquisición de DNA plasmídico por una cepa bacteriana, puede realizarse por medios distintos a la conjugación como transformación, la transducción mediada por fagos o la incorporación en el cromosoma, como veremos más adelante.⁷²

Asimismo también se observó si estas cepas multiresistentes portaban en su DNA plasmidico genes de resistencia a betalactamasas de espectro extendido como blaTEM-20 y blaSHV-2 presentadas en la Figura 10 debido a que el principal gen implicado en la producción de β -lactamasas en *E. coli* uropatógena es blaTEM, comparándolo con la presencia de blaSHV-2, además de presentarse co-existencia de ambos genes,⁷³ además que la presencia de los genes blaSHV, blaTEM entre otros en bacilos Gram negativos aislados de muestras hospitalarias indica

una probable capacidad de movilizarse y transferirse horizontalmente, lo que les confiere un claro potencial epidémico en el ámbito hospitalario y en la comunidad.⁷⁴

En este sentido, en este proyecto solo se encontró la presencia del gen blaTEM-20 en DNA plasmídico en las cepas más sensibles (25) fueron positivas 6 (28%), para el gen blaSHV-2 no se encontró de las 25 cepas alguna positiva.

10. Conclusiones

- El aceite esencial de clavo y el extracto metanólico de ruda tienen actividad antibacteriana en cepas multiresistentes de *E. coli* BLEE.
- El aceite esencial de clavo y el extracto metanólico de ruda tienen actividad bacteriostática, más efectivo en el aceite hasta las 12h.
- El extracto metanólico tiene una mediana actividad antioxidante (CA50) de 115 µg/mL.
- El aceite esencial de clavo contiene sesquiterpenos como el cariofileno y eugenol que es un alilbenceno.
- El extracto metanólico de ruda contiene índoles e indolizinas.
- Las cepas de *E. coli* BLEE en su DNA plasmídico portan el gen blaTEM-20 en un 28% de las cepas más sensibles y no el gen blaSHV-2.

11. Perspectivas

- Aislar los componentes responsables de la actividad antibacteriana de ambas especies y determinar su estructura química.
- Determinar si existe un sinergismo, antagonismo al mezclar ambas especies en cepas multiresistentes de *E. coli* BLEE.
- Determinar si en DNA cromosomal las cepas multiresistentes de *E. coli* BLEE portan el gen blaTEM-20 y blaSHV-2.

Referencias

1. Acosta-Pérez, G., Ibáñez-Cervantes, G., Bello-López, J. M., Hernández, J. M., Hernández-Montañez, Z., Giono-Cerezo, S., & León-Avila, G. Structural diversity of class 1 integrons in multiresistant strains of *Escherichia coli* isolated from patients in a hospital in Mexico City. *Current Microbiology*. 2015; 71(4): 501-508.
2. Alcaráz, LE, Fusco, MR, Mattana, CM, et al. Antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Ligaria cuneifolia* and *Tripodhantus flagellaris*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2015; 27(11): 1.
3. Andrews, JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; 48(1): 5-16
4. Begun, J, Costi D, Sifri, S Goldman, et al. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infection and Immunity*. 2005; 73(2): 872-7.
5. Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2015; 35(2): 247-272.
6. Critchley, IA, Blosser-Middleton, RS, Jones, et al. Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against gram-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47(5):1689-1693.
7. Panilio, A. L., Culver, D. H., Gaynes, R. P., Banerjee, S., Henderson, T. S., Tolson, J. S. and Martone, W. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 1992; (10):582-6.
8. Muñoz, K., Arango, G., Jaramillo, M. Los antibióticos y su situación actual. *Vitae. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 2004; 11:21-33.
9. Dartois, V, Sanchez-Quesada, J, Cabezas, E, et al. Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49(8):3302-3310.
10. Dryla, A, Prustomersky, S, Gelbmann, D, et al. Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in

- acutely infected patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2005; 12(3):387-398.
11. Rates, SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*. 2001; 39(5): 603-613.
 12. García, C, Martínez, A, Ortega, J, et al. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*. 2010; 2(9): 86-96.
 13. Haddadin, AS, SA Fappiano, PA Lipsett. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate Medical Journal*. 2002; 78(921): 385- 92.
 14. Prescott. Microbiología. Madrid, España: McGraw-Hill- Interamericana. Cuarta Edición. 2000; 493- 495
 15. Karuppiah, P, & Rajaram, S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012; 2(8): 597-601.
 16. Kuskoski, EM, Asuero, AG, Troncoso, et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2005; 25(4): 726-732.
 17. González Osorio, M. D. C., Mendoza Medellín, A., Pavón Romero, S., Becerril Plata, R., & Vilchis Quiroz, A. Resistencia a cefalosporinas de tercera y cuarta generación en enterobacterias productoras de infecciones nosocomiales y caracterización preliminar de los plásmidos involucrados. *CIENCIA ergo sum*. 2008; 15(1).
 18. Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. V., de Oliveira, A. G. & Kobayashi, R. K. Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7.
 19. Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S. Jacquez, P. y López, M. E. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. 1994; 218.

20. Magaña, P. y Villaseñor, J. La flora de México ¿se podrá conocer completamente? *Ciencias*. 2002; 66: 24-26.
21. Bautz, C., Bohuslavizki, K. H., Hänsel, W., & Koppenhöfer, E. Effects of *Ruta* on the excitation process in myelinated nerves. *Planta Medica*. 1989; 55(07), 649-649.
22. Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*. 2009; 58(11), 1454-1462.
23. Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*. 2004; 135(4), 1893-1902
24. Pandey, Pinkee, Mehta, Archana and Hajra, Subhadip. Antidiarrhoeal activity of ethanolic extracts of *Ruta graveolens* leaves and stem. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2012; 5(4), 65-68.
25. Pandey, P., Mehta, A., & Hajra, S. Evaluation of antimicrobial activity of *Ruta graveolens* stem extracts by disc diffusion method. *Journal of Phytology*. 2011; 3(3).
26. Pathak, S., Multani, A. S., Banerji, P., & Banerji, P. *Ruta* 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer. *International Journal of Oncology*. 2006; 23(4), 975-982.
27. Ruiz, L. D., Valenzuela, R. B., Ruiz, O. D., Vega, M. S., & Flores, P. G. Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nova Scientia*. 2017; 9(19), 273-290.
28. El-Maati, M. F. A., Mahgoub, S. A., Labib, S. M., Al-Gaby, A. M., & Ramadan, M. F. Phenolic extracts of clove (*Syzygium aromaticum*) with novel antioxidant and antibacterial activities. *European Journal of Integrative Medicine*. 2016; 8(4), 494-504.
29. Ajiboye, T. O., Mohammed, A. O., Bello, S. A., Yusuf, I. I., Ibitoye, O. B., Muritala, H. F., & Onajobi, I. B. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum*

- seed: Studies on oxidative stress biomarkers and membrane permeability. *Microbial Pathogenesis*. 2016; 95, 208-215
30. Pelaez Loyola, LM, & Zavala Obando, SM. Efecto del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale* (jengibre) en el crecimiento de cepas patógenas de *Streptococcus pyogenes*. 2016.
31. Zobel, A. M., Lynch, J. M., Murphy, K. E., & Wierzchowska-Renke, K. Differences in antimicrobial activity of natural products removed from plant surface and interior of *Ruta graveolens* L. and *Brassica oleracea* L. *Herba Polonica*. 1997; 4(43), 334-337.
32. Pastrana-Puche, Y. I., Paula, C. D. D., & Gallo-García, L. A. Evaluation of natural antimicrobial substances in the conservation of sinuana oatmeal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 2017; 18(2), 321-334.
33. Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S., & Lu, Y. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial Pathogenesis*. 2017; 113, 396-402.
34. Domínguez. A. X. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa. México. 1973; 3-17.
35. Vanden Berghe, D. A. & Vlietnick A. J. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. *Methods in Plant Biochemistry, Assay for Bioactivity*. 1997; 6: 47-69.
36. Ávila A., J. G. Actividad Anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la Medicina Tradicional Purepecha. UNAM. México. 1996
37. Koneman, W. E. Diagnóstico Microbiológico. Médica Panamericana. México. 1996; 439.
38. Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I. Antimicrobial activity of cashew Apple flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993; 41:1106-1109.
39. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. y Ginsberg H.S. Tratado de microbiología 4ta edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona. 1996; 1559.

40. Okusa, P., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 112, 476-481.
41. Murillo, F. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. *Revista Tecnológica*. Alfa Editores Técnicos. 2006; 27.
42. Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuela-Reventós, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 1996; 299, 152-178.
43. Ramamoorthy, P. and Bono, A. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2007; 2(1), 70-80.
44. Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M., Burton, G. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 1985; 25-31.
45. Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G. Bioquímica. 3a ed. Addison Wesley. España. 2002; 166-170.
46. Birnboim, H. C., and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979; 7:1513–1523.
47. Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. and Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 111, 657-666.
48. Mesa, A., Bueno, J. y Betancour, L. Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española Quimioterapia*. 2004; 17: 325-331.
49. Ouerghemmi, I., Rebey, I. B., Rahali, F. Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R. & Tounsi, M. S. Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017; 25(2), 350-359.

50. Khadhri, A., Bouali, I., Belkhir, S., Mokded, R., Smiti, S., Falé, P., & Serralheiro, M. L. M. In vitro digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharmaceutical Biology*. 2017; 55(1), 101-107.
51. Castro Bolaños, C. M. Actividad sedante y ansiolítico del extracto etanólico de las hojas de *Ruta chalepensis* L. "Ruda" en ratones. 2018
52. Loizzo, M. R., Falco, T., Bonesi, M., Sicari, V., Tundis, R., & Bruno, M. *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) leaf extract: chemical composition, antioxidant and hypoglycaemic activities. *Natural Product Research*. 2018; 32(5), 521-528.
53. Meléndez, M. Efecto antihiper glucemiante del extracto metanólico de ruda (*Ruta graveolens*) en un modelo experimental de ratas hiperglicémicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*. 2011; 52(2), 119-126.
54. Venugopal, K., Rather, H. A., Rajagopal, K., Shanthi, M. P., Sheriff, K., Illiyas, M. & Maaza, M. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017; 167, 282-289.
55. Shekhar, S., Yadav, Y., Singh, A. P., Pradhan, R., Desai, G. R., Dey, A. B., & Dey, S. Neuroprotection by ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* in Alzheimer's disease like pathology via maintaining oxidative balance through SIRT1 pathway. *Experimental Gerontology*. 2018.
56. Jose, S. P., Ratheesh, M., Asha, S., Krishnakumar, I. M., Sandya, S., & Girish, K. B. Hepato-protective Effect of Clove Bud Polyphenols (*Syzygium aromaticum* L.) (Clovinol®) by Modulating Alcohol Induced Oxidative Stress and Inflammation. *Journal of Food Research*. 2017; 7(1), 10.
57. Sathishkumar, M., Saroja, M., & Venkatachalam, M. Green synthesis, Characterization and Antimicrobial activity of ZnS using *Syzygium aromaticum* extracts. *International Journal of ChemTech Research*. 2017; 10(9), 443-449.

58. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers. S., De Bruney, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 79: 213-220.
59. Nikaido, H, y Nakae, T. The outer membrane of gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 2009; 20:163-250.
60. Mandingan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. Brock Biología de los microorganismos. Pearson Addison Wesley. 2009; 12: 873-906.
61. Elliot, T. Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management. *British Medical Bulletin*. 1999; 55(1), 259-276.
62. Fernández, F., López J., Ponce L. y Machado C. Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 2003; 32 (1): 44-48.
63. Levinson, W. Microbiología e Inmunología Médicas. Mc Graw Hill. España, S.A. U. 2004; 8: 662.
64. Céspedes, T., Sánchez, D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología*. 2000; 14: 55-60.
65. Araujo, J. y Salas, R. Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. 2008; 42.
66. Dahham, S. S., Tabana, Y. M., Iqbal, M. A., Ahamed, M. B., Ezzat, M. O., Majid, A. S., & Majid, A. M. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules*. 2015; 20(7), 11808-11829.
67. N.G. Baydar, G. Özkan, O. Sagdiç. Total phenolic contents and antibacterial activities of grapes (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*. 2004; 15: 335-339.
68. M.R. Vaquero, M.R. Alberto, M.M. de Nadra. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. 2007; 18: 93-101.
69. A. Scalbert. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991; 30: 3875-3883.

70. Yang, G., & Chen, D. Alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* and their antiviral and antifungal effects. *Chemistry & Biodiversity*. 2008; 5(9), 1718-1722
71. Betancor, L., Gadea, M. P., Flores, K., & Instituto de Higiene. Facultad de Medicina. Genética bacteriana. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). Temas de Bacteriología y Virología Médica. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR. 2008; 3: 65-90.
72. Franco, Y. G., Angarita, M. C. G., Gutiérrez, M. A. P., & Trejos-Suárez, J. Identificación genotípica de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (blaTEM y blaSHV) en *Escherichia coli* uropatógena. *Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES*. 2016; 3(1. S1), 15.
73. Velandia, D. P. L., Caycedo, M. I. T., Orduz, L. M. C., & Quiroga, C. F. P. Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*. 2016; 3(2), 107-126.
74. Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J. S., Motoa, G., & Garzon, M. Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing community-onset urinary tract infections in Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016; 34(9), 559-565.