

Grao en Bioloxía

Memoria del Trabajo de Fin de grado

Elaboración del proyecto: Evaluación de la actividad antibiótica de extractos vegetales

Elaboración do proxecto: Avaliación da actividade antibiótica de extractos vexetais

Grant development: Evaluation of the antibiotic activity of plant extracts

Sara López Campoamor

Julio, 2020

*Director 1: Federico Pomar Barbeito
Codirector: María Ángeles Cid Blanco*

Introducción general

Resistencia bacteriana a antibióticos

En la actualidad y desde hace ya varios años, existe una preocupación creciente por la aparición de resistencias a los antibióticos por parte de numerosas bacterias. Tanto es así, que la literatura científica (aunque quizás no al ritmo deseado) trata continuamente de describir y buscar las causas y posibles soluciones a esta cuestión, ya que la resistencia a los antibióticos representa una enorme crisis de salud global y una de las amenazas más graves a las que el hombre debe hacer frente actualmente (Breijyeh *et al.*, 2020). La resistencia bacteriana se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie (Alós, 2014).

Este fenómeno aumenta sin control, limitando progresivamente las posibilidades de emplear antibióticos que en tiempos anteriores fueron efectivos, determinando un incremento en la tasa de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas tanto en los países subdesarrollados como en los más avanzados (Durich, 2000). La problemática es mayor en el caso de los países en vías de desarrollo, en los que la falta de recursos biosanitarios tiene como resultado un mayor ritmo de diseminación y una mayor probabilidad de que se establezcan endemismos.

La evolución de las bacterias es darwiniana: aquellas que mejor se adapten a los cambios del medio (en este caso, representados por los antibióticos) serán las supervivientes (Alós, 2014). En un primer momento, la preocupación por la resistencia a antibióticos se limitaba al sector hospitalario, en el que la presión selectiva de resistencia es muy alta por el continuo uso de varios tipos de antibióticos. Sin embargo, la diseminación de la resistencia no se limita al sector nosocomial. La presión selectiva de los antibióticos por uso masivo en los últimos 70 años ha contribuido a la diversificación genética de los genes de resistencia: haciendo una comparación del número actual de beta-lactamasas TEM, con al menos 187 descritas, con las que se conocían en 1982, antes de introducirse en la clínica las cefalosporinas de tercera generación, podremos comprobar cómo en aquel momento solo se conocían TEM-1 y TEM-2 (Alós, 2014). A pesar de que las infecciones que se dan en el sector hospitalario son, en buena parte de los casos, debidas a bacterias patógenas, las conocidas como bacterias oportunistas o comensales, que forman parte de las microbiotas naturales del entorno y del organismo humano, han aumentado su participación en estos procesos: por haber sido consideradas escasamente peligrosas inicialmente, no han sido creados antibióticos para combatirlas, por lo que son generalmente poco sensibles a los antibióticos actuales (Durich, 2000).

La resistencia bacteriana a la acción de los antibióticos ocurre, de forma general, por medio de tres mecanismos primarios que a menudo operan simultáneamente (Khameneh *et al.*, 2019). Estos son la modificación del fármaco, la modificación de la diana y la inactivación del fármaco (**Figura 1**) (Khameneh *et al.*, 2019).

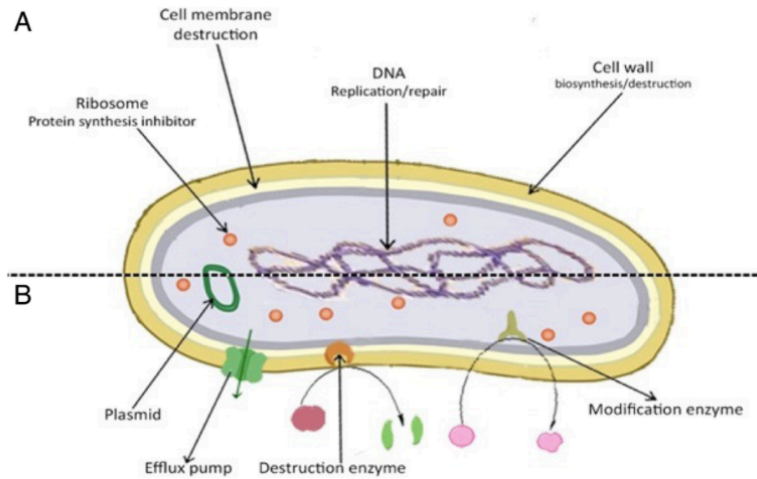


Figura 1. Representación esquemática de las dianas de antibióticos y antibacterianos en la célula bacteriana (A) y de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos (B) (Khameneh *et al.*, 2019).

Entre microorganismos, las mutaciones espontáneas en genes existentes o la adquisición de genes extraños dan lugar a la adquisición de resistencia a antibióticos (Cag *et al.*, 2016). Aunque los mecanismos genéticos y bioquímicos primarios llevan bastante tiempo siendo reconocidos, continúan descubriéndose nuevos factores (Livermore, 2003).

Búsqueda de nuevos antibióticos

Desde el descubrimiento de la penicilina, en 1928, se han ido introduciendo en la terapéutica nuevas familias de moléculas (**Tabla 1**) (macrólidos, aminoglicósidos, tetraciclinas, ...), algunas de las cuales se subdividen en generaciones por ser muy numerosas y poseer características ampliamente diferenciadas (Del Arco, 2014).

Tabla 1 Clasificación de los antibióticos		
Grupo		Fármacos comercializados en España
Betalactámicos	Penicilinas	Penicilina G Penicilina V Cloxacilina Amoxicilina Ampicilina (+ sulbactam) Amoxicilina (+ clavulánico) Piperacilina Piperacilina (+ tazobactam)
	Cefalosporinas	Primera generación: Cefadroxilo Cefalexina Cefazolina Segunda generación: Cefaclor Cefonicida Cefoxitina Cefuroxíma Tercera generación: Cefditoren Cefixima Cefminox Cefpodoxima Ceftazidima Ceftibuteno Ceftriaxona Cuarta generación Cefepima Aztreonam
	Monobactams	
	Carbapenems	Imipenem Meropenem Ertapenem
Macrólidos		Azitromicina Claritromicina Eritromicina Espiramicina Josamicina Midecamicina Roxitromicina Telitromicina
Lincosaminas		Lincomicina Clindamicina
Tetraciclina		Clortetraciclina Doxiciclina Minociclina Oxiletetraciclina Tetraciclina Tigeciclina

Grupo		Fármacos comercializados en España
Aminoglicósidos		Amikacina Espectinomina Estreptomina Gentamicina Kanamicina Neomicina Tobramicina
Anfenicóles		Cloranfenicol
Peptídicos	Polipeptídicos	Bacitracina Gramicidina
	Glucopéptidos	Vancomicina Teloplanina
	Lipopéptidos	Daptomicina
	Polimixinas	Polimixina B Colistina
Oxazolidinonas		Linezolid
Nitroderivados		Nitrofurantoina Nitrofurazona Metronidazol Tinidazol
Fusidanos		Ácido fusídico
Fosfonatos		Fosfomicina
Pleuromulinas		Retapamulina
Quinolonas		Ácido pipemídico Ciprofloxacino Levofloxacino Moxifloxacino Norfloxacino Ofloxacino
Sulfonamidas y diaminopiridinas	Sulfonamidas	Sulfadiazina Sulfametizol Sulfametoxazol Sulfanilamida
	Diaminopiridinas	Primetamina Trimetoprim
Otras		Mupirocina

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos (Del Arco, 2014).

El desarrollo de nuevas herramientas moleculares de la genómica y proteómica, como la PCR en tiempo real, la pirosecuenciación de ADN, la espectrometría de masas, los microarrays de ADN y la bioinformática, permite conocer de forma más estrecha la fisiología y estructura de las bacterias y sus mecanismos de resistencia a los antibióticos. Los estudios en este campo permiten identificar nuevos blancos farmacológicos y diseñar antibióticos específicos, suministrando tratamientos más acertados para combatir las infecciones producidas por bacterias (Garza-Ramos *et al.*, 2009).

En los últimos años, numerosos estudios nos han brindado la posibilidad de conocer algunos nuevos compuestos, tanto para bacterias gramnegativas como para grampositivas (Tabla 2). Para las primeras, destacan compuestos como el Ceftolozane-tazobactam y el Ceftazidime-avibactam. Para las grampositivas, recientemente se han desarrollado antibióticos como el Dalbavancin, el Tedizolid, el Ceftaroline y el Ceftobiprole (Escolà-Vergé *et al.*, 2020).

Table 1
Approved and potential indications of new antibiotics for the treatment of gram-positive and gram-negative bacteria infections.

Antibiotic	Approved indications	Potential indications
Ceftolozane-tazobactam	Complicated urinary tract infections	Multi-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections
Ceftazidime-Avibactam	Complicated intra-abdominal infections (associated with metronidazole) Hospital-acquired pneumonia (including those associated with mechanical ventilation) Complicated urinary tract infections	Serious infections caused by carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> type KPC or OXA-48
Dalbavancin	Complicated intra-abdominal infections Hospital-acquired pneumonia (including those associated with mechanical ventilation) Gram-negative bacteria infections with limited therapeutic options Skin and soft tissue infections	Catheter-related bacteraemia Endocarditis in the consolidation phase Osteoarticular infections
Tedizolid	Skin and soft tissue infections	Osteoarticular infections (especially if they are associated with prosthetic material) Central nervous system infections Mycobacterial Infections
Ceftaroline	Skin and soft tissue infections	Bacteraemia complicated by methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , including endocarditis
Ceftobiprole	Community-acquired pneumonia Community-acquired pneumonia Hospital-acquired pneumonia, excluding pneumonia associated with mechanical ventilation	Skin and soft tissue infections, including diabetic foot Catheter-related bacteraemia Fever whose focus is of non-hospital origin

Tabla 2. Nuevos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias grampositivas y gramnegativas (Escolà-Vergé *et al.*, 2020).

Además, actualmente existen antibióticos en desarrollo de los que algunos ejemplos son el Cefiderocol, nuevas quinolonas, el Nemonoxacin,...

Etnobotánica farmacológica

La atención sanitaria humana requiere que el descubrimiento de nuevos antibióticos ocurra de manera proporcionalmente rápida a la que aparecen nuevas resistencias, cada vez mayores, de los patógenos. Una de las posibles estrategias para lograr este objetivo es la localización de sustancias fitoquímicas bioactivas (Gottlieb *et al.*, 2002). Numerosos trabajos científicos sobre etnobotánica y fitofarmacología han querido demostrar, en los últimos años, cómo los efectivos mecanismos de respuesta contra patógenos que poseen las plantas pueden resultar útiles para el ser humano en su batalla contra las enfermedades infecciosas. Existe una enorme variedad de compuestos naturales derivados de plantas, de estructuras químicas muy diversas, que pueden proporcionarnos tanto nuevos mecanismos de acción antibiótica como nuevos objetivos dentro de las células bacterianas (Gorlenko *et al.*, 2020).

En tanto que se trabaja en el campo de la investigación de los compuestos fitoquímicos, el gran desafío de los científicos también es el de desligar la visión tradicional de las plantas medicinales de la meramente científica, de modo que el entendimiento de la etnobotánica se base en el método científico y no en el saber popular. Durante cientos o incluso miles de años, las personas han utilizado un conjunto bastante limitado de métodos para obtener metabolitos secundarios, que incluyen extracción, extrusión, destilación, infusión y fermentación, extracción de aceites esenciales y concentración.

Existen varios trabajos, como el libro de Plantas Medicinales de Pío Font Quer, en los que se recoge información sobre la obtención, propiedades, uso y preparación de remedios tradicionales a partir de plantas (**Figura 2**).



Capilera (*Adiantum capillus-Veneris*). (Original de Sierra.)

Virtudes y uso. Por la belleza de los rabillos de las frondes, que se han comparado a los pelos de una hermosa cabellera, y por la teoría del signo, se emplearon para conservar el cabello y acrecentar su salida y robustez.

En medicina se ha usado para combatir la tos y los catarros de las vías respiratorias. Según las antiguas farmacopeas hispanas, la conserva de este culantrillo se preparaba con 1 libra de la planta fresca, que se machacaba en un mortero de mármol, añadiéndole, si fuere necesario, un poco de agua hasta formar una masa blanda y muy tenue; y luego se le añadían 2 libras de azúcar y se removía fuertemente. Después de bien mezclado todo se guardaba para el uso.

Figura 2. Virtudes y uso de la capilera (*Adiantum capillus-veneris*) (Font Quer, 1961).

Identificar y desarrollar medicamentos eficientes y accesibles, a partir de compuestos vegetales activos que tengan efectos secundarios mínimos constituye el principal objetivo de la etnofarmacología (Abullais *et al.*, 2019). Las plantas parecen ser un pozo profundo para la búsqueda de nuevos antibióticos por numerosas características atractivas: están fácilmente disponibles y son baratas, los extractos o compuestos de fuentes vegetales a menudo muestran una alta actividad contra los patógenos y rara vez tienen efectos secundarios graves (Cyrill *et al.*, 2020). Además, han podido ser extraídos de las plantas una amplia variedad de compuestos químicos activos con mecanismos de acción y dianas celulares muy atractivos.

Los avances actuales en la investigación de bioscreening, incluidas las tecnologías ómicas (en primer lugar, la metabolómica), nos permitirán capturar e incluso identificar sustancias fitoquímicas activas en muy bajas cantidades, ampliando el conocimiento actual sobre los moleculares específicos que subyacen a sus efectos sobre objetivos bacterianos (Gorlenko *et al.*, 2020).

El interés en estas sustancias recae, además, en que poseen varios mecanismos a la hora de evitar la resistencia bacteriana, bloqueando las bombas de flujo celulares, atenuando la virulencia bacteriana, interrumpiendo la formación de biopelículas e impidiendo la comunicación entre bacterias.

En este TFG se plantea el uso de tres especies vegetales, taxonómicamente diferentes, para evaluar sus posibles efectos antibióticos contra dos especies bacterianas típicamente causantes de enfermedades infecciosas, sumándose a la búsqueda de alternativas farmacológicas en compuestos fitoquímicos.

La investigación que se propone ha sufrido una serie de modificaciones debido a la situación de Estado de Alarma existente en España durante los primeros meses del 2020, a raíz la crisis sanitaria derivada de la pandemia mundial de la COVID-19. Inicialmente, en el trabajo se realizaría de forma experimental la evaluación de la actividad antibiótica de extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de *Pseudoscleropodium purum*, *Cladonia arbuscula* y *Cytisus scoparius* en cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además, se evaluaría también la posible actividad sinérgica de los extractos en combinación con antibióticos, además de realizarse un análisis de su composición. Este estudio se realizaría a lo largo del curso académico 2019/2020, comenzando el procedimiento experimental en el primer semestre. En marzo de 2020, cuando se establece el Estado de Alarma, sólo se había podido realizar la recolección de las muestras vegetales y las extracciones alcohólicas previstas. Teniendo en cuenta que buena parte del procedimiento experimental no se ha podido completar, se decidió transformar el trabajo experimental en un nuevo trabajo tipo proyecto, pero manteniendo el tema principal del trabajo. En él, se realizará una revisión sobre la aparición de resistencias a antibióticos y la búsqueda de nuevos compuestos, haciendo especial hincapié para ello en la etnobotánica farmacológica, además de proponerse un procedimiento experimental del que se esperan extraer conclusiones sobre la importancia de las plantas como fuente de búsqueda de compuestos con efectos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Seguiremos como modelo de solicitud de proyecto de investigación las convocatorias de Proxectos Emerxentes de la Xunta de Galicia, que estuvieron en vigor en el año 2014 y que incluía los siguientes apartados:

ÍNDICE DE LA SOLICITUD DE PROYECTO

- 1. Contenido del proyecto: estado del arte de la investigación propuesta (pág. 10).**
- 2. Contenido del proyecto: objetivos del proyecto (pág. 14).**
- 3. Contenido del proyecto: interés para el avance del conocimiento y de la sociedad (pág.14).**
- 4. Contenido del proyecto: plan de difusión y explotación de resultados (pág. 15).**
- 5. Viabilidad del proyecto: plan de trabajo y metodología (pág. 16).**
- 6. Viabilidad del proyecto: plan de trabajo (etapas, recursos asignados, cumplimiento de objetivos, cronograma...) (pág. 16).**
- 7. Previsión presupuestaria: destino de la ayuda solicitada (pág. 19).**
- 8. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad (pág. 20).**
- 9. Conclusiones o hechos que se pretende alcanzar (pág. 20).**
- 10. Bibliografía (pág. 21)**

SOLICITUD DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

RESUMEN

El proyecto que se propone tiene como principal objetivo la evaluación de la actividad antibiótica de extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de tres especies vegetales de uso medicinal tradicional (*Pseudoscleropodium purum*, *Cladonia arbuscula* y *Cytisus scoparius*) en cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además, la propuesta plantea la evaluación de la posible actividad sinérgica de los extractos en combinación con antibióticos de habitual uso clínico contra infecciones causadas por estas especies bacterianas. Con el fin de obtener información sobre la composición de los extractos, se propone realizar un análisis preliminar de los mismos mediante HPLC-DAD-MS.

SUMMARY

The proposed project has as main objective the evaluation of the antibiotic activity of hiroalcholic extracts obtained from three vegetal species of traditional medical use (*Pseudoscleropodium purum*, *Cladonia arbuscula* and *Cytisus scoparius*) in cultures of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Moreover, the proposal raises the evaluation of the possible synergistic activity of the extracts in combination with habitual clinical use antibiotics against infections caused by this bacterial species.

With the purpose of obtaining information about the composition of the extracts, it is proposed to perform a preliminary analysis of these through HPLC-DAD-MS.

PALABRAS CLAVE

Resistencia antibióticos, nuevos antibióticos, fitofarmacología, extractos vegetales, actividad antibiótica, metabolitos secundarios, actividad sinérgica, HPLC-DAD-MS.

KEY WORDS

Antibiotic resistance, new antibiotics, phytopharmacology, plant extracts, antibiotic activity, synergistic activity, secondary metabolites, HPLC-DAD-MS.

1. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA

A principios del siglo XXI, una de las causas más importantes de muerte en la humanidad continúan siendo las enfermedades infecciosas (Lozano *et al.* 2010). La introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de los cuarenta del siglo XX, supuso una de las intervenciones más importantes para su control y aumentó en varios años la esperanza de vida de la población (Alós, 2014).

El uso masivo de antibióticos y la aparición exponencial de resistencias bacterianas ha acarreado una gran cantidad de informes gubernamentales y de agencias en defensa de un menor y mejor uso de los antibióticos, de la mejora del control de infecciones y del desarrollo de nuevos antibióticos (Livermore, 2003). Sin embargo, el escaso o nulo interés social y político en la problemática de las resistencias a antibióticos, la dificultad en la identificación de moléculas activas frente a nuevas dianas pero, sobre todo, su baja rentabilidad relativa frente a otras clases de fármacos, así como la incierta y arbitraria regulación por parte de las autoridades a la hora de evaluar la eficacia de nuevas sustancias, son la causa de la enorme reducción en el ritmo de comercialización de nuevos antibióticos (García-Rey, 2010).

El desarrollo de la ciencia en el siglo XXI ofrece nuevos enfoques, permitiendo no solo descubrir e identificar cantidades muy pequeñas de los compuestos producidos por plantas, sino también producirlos en cantidades suficientes para caracterizar de manera rigurosa sus propiedades, tales como la bioactividad (Gorlenko *et al.*, 2020). De estos objetivos surge la disciplina de la metabolómica, ofreciendo paradigmas y metodologías que permiten realizar análisis exhaustivos y obtener pequeñas cantidades de compuestos activos de interés a partir de extractos vegetales. Además, las nuevas técnicas y estrategias favorecen un menor gasto energético y temporal en los procesos experimentales, además de ser en muchas ocasiones alternativas más ecológicas.

Interceptadas las sustancias de interés, son importantes el aislamiento, la purificación y la caracterización detallada de los metabolitos activos de los extractos vegetales. Los avances recientes en plataformas de química analítica, como la espectrometría de masas suministrada con cromatografía de gases/líquidos o electroforesis capilar, y la resonancia magnética nuclear (RMN), han llevado al desarrollo de herramientas altamente eficientes para el análisis del metaboloma, permitiendo una caracterización detallada y, en última instancia, la descripción estructural de los metabolitos (Gorlenko *et al.*, 2020).

Se ha descubierto que metabolitos secundarios de origen vegetal actúan de manera concreta respecto a algunos patógenos. La siguiente tabla ofrece una serie de ejemplos de interés para los objetivos de este trabajo (**Tabla 3**):

Pathogen	Substance	Group	Plant Source	MIC*, µg/mL	Mechanism
<i>Escherichia coli</i>	quercetin	flavonoids	<i>Capparis spinosa</i>	300	efflux pump inhibitor
	epigallocatechin gallate		<i>Camellia sinensis</i>	200 µM	
	(+)-Catechin hydrate		<i>Camellia sinensis</i>	>2000	
	genistein		<i>Glycine max</i>	>2000	
	protocatechuic acid	phenolic acids	<i>Scrophularia frutescens</i>	>2000	
	gallic acid		<i>Vitis rotundifolia</i>	>2000	
	hydroquinone	phenol	<i>Vaccinium myrtillus</i>	>2000	
	resveratrol	polyphenol	<i>Vitis vinifera</i>	1300	
	eugenol		<i>Syzygium aromaticum and Eugenia caryophyllis</i>	>2000	
	thymol	terpenoids	<i>Thymus capitatus; Tyhmus vulgaris</i>	8; 800	
<i>Enterococcus faecalis</i>	taxifolin	flavonoids	<i>Pinus roxburghii</i>	128	efflux pump inhibitor
	eriodictyol		<i>Eriodictyon californicum</i>	256	
	naringenin		<i>Citrus paradisi</i>	256	
	piperine	alkaloid	<i>Piper nigrum</i>	100	
	aegelinol	coumarins	<i>Ferulago campestris</i>	16	
agasyllin	<i>Ferulago campestris</i>		32		
<i>Staphylococcus aureus (including MRSA)</i>	osthole		<i>Cnidium monnieri, Angelica archangelica and Angelica pubescens</i>	125	DNA gyrase inhibitor
	sophoraflavanone B		<i>Desmodium caudatum</i>	15.6–31.25	direct interaction with peptidoglycan
	genistein	flavonoids	<i>Glycine max</i>	100 µM	efflux pump inhibitor
	chrysopentín		<i>Artemisia absinthemum</i>	6.25	efflux pump inhibitors
	quercetin		<i>Capparis spinosa</i>	75	
	kaempferol	<i>Moringa oleifera, Sambucus nigra, Aloe vera</i>	125		
	apigenin, kaempferol, rhamnetin, quercetin, myricetin		in many plants	>150	
	luteolin	organosulfur compounds	<i>Reseda luteola</i>	75	DNA and protein synthesis inhibitor
	allicin		<i>Allium sativum</i>	32, 64	
	farnesol	terpenes	<i>Vachellia farnesiana</i>	20 (MBC)	cell membrane disturbance
	nerolidol		<i>Cannabis sativa</i>	40 (MBC)	
	thymol	terpenoids	<i>Thymus capitatus</i>	6.5	cell membrane disturbance
	carvacrol		<i>Thymus capitatus</i>	7	disintegration of the outer membrane
	plumbagin	naphthoquinone	<i>Plumbago zeylanica</i>	4–8	DNA gyrase inhibitor
	aegelinol, agasyllin	coumarins	<i>Aegle marmelos, Ferulago asparagifolia Boiss</i>	5–25	
cinnamaldehyde	<i>Cinnamomum spp.</i>		2	cell membrane disturbance	

Tabla 3. Compuestos vegetales que demuestran actividad antibiótica contra importantes patógenos humanos (Gorlenko *et al.*, 2020).

Como podemos observar en la **Tabla 3**, los mecanismos de acción de los compuestos con actividad antibiótica son bastante diversos. Estos incluyen la disrupción de las funciones de la membrana plasmática y su estructura (incluyendo el sistema de flujo), interacción con proteínas de membrana (ATPasas entre otras), interrupción de la síntesis de ADN y sus funciones, desestabilización de la fuerza motriz de protones por

fuga de iones, prevención de la síntesis de enzimas, inducción de la coagulación de constituyentes citoplasmáticos e interrupción de la comunicación celular normal (quorum sensing) (Gorlenko *et al.*, 2020).

Aunque de estos procesos experimentales se obtengan resultados satisfactorios *in vitro*, la actividad bactericida o bacteriostática no tiene por qué extrapolarse a los resultados obtenidos *in vivo*. Por esta razón, es necesario conseguir compuestos fitoquímicos activos con concentraciones mínimas inhibitorias lo suficientemente bajas (además de no tóxicas) para realizar un buen uso de ellas en humanos.

Tanto el espectro antibacteriano de los antibióticos existentes como la optimización de la prevención de bacterias resistentes pueden aumentarse mediante la combinación de productos fitofarmacéuticos y medicamentos modernos. Además, la combinación puede ser útil para reducir la toxicidad del fármaco. El resultado de la combinación puede ser sinérgico, aditivo o antagonista, dependiendo de la forma de la que interactúen las drogas. Varios experimentos *in vitro* han demostrado cómo la combinación de extractos de plantas y antibióticos posee un efecto sinérgico, lo que resulta en una disminución significativa en los niveles de MIC para los antibióticos (Abullais *et al.*, 2019).

El mecanismo de acción sinérgica se explica por: (1) modificación de sitios activos en células bacterianas, (2) inhibición de enzimas que catalizan la degradación o modificación de antibióticos, (3) aumento de la permeabilidad de la membrana e (4) inhibición de bombas de eflujo (**Figura 3**) (Stefanovic, 2017).

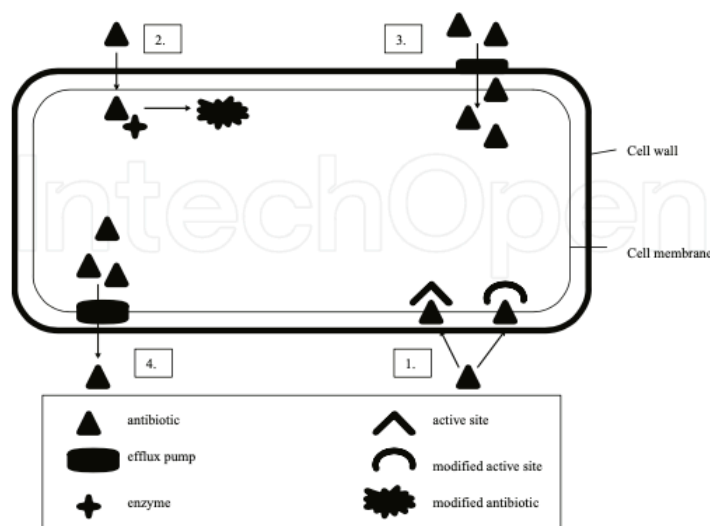


Figura 3. Mecanismos de actividad antibacteriana sinérgica (Stefanovic, 2017).

Un procedimiento experimental típico para estudiar la actividad la actividad sinérgica de extractos vegetales y antibióticos consistiría en la preparación de extractos a partir de plantas seleccionadas y de la evaluación tanto de forma conjunta como separada de su actividad antibiótica (**Figura 4**).

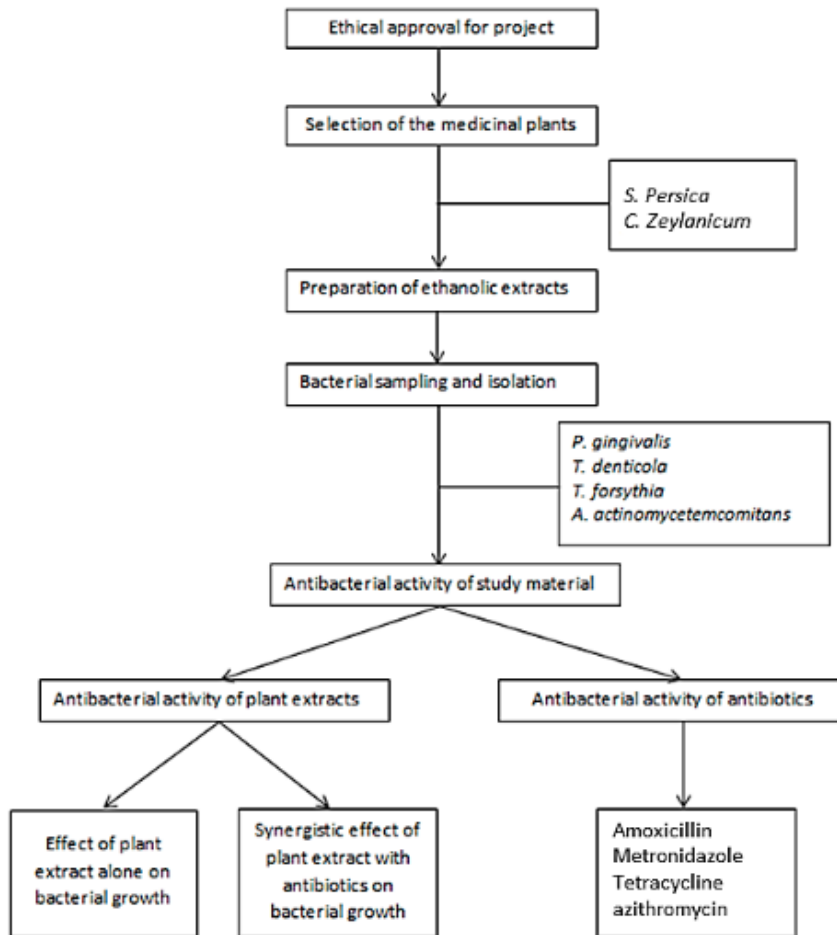


Figure 1. Flow chart of the study design.

Figura 4. Procedimiento experimental en un estudio de actividad sinérgica (Abullais *et al.*, 2019).

En España, existen algunas iniciativas como el “Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos” de la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). Las bases sobre las que se asienta y sus objetivos son compatibles en gran medida con el proyecto que se presenta: se trata de un plan que revisa cómo desde la introducción clínica de los antibióticos se produce un alto incremento de las resistencias bacterianas, sus causas y consecuencias y la configuración de estrategias concretas enfocadas a la prevención de las resistencias y la búsqueda de nuevos antibióticos.

En el plano internacional, existen numerosos estudios científicos en los que se revisa y evalúa la actividad antibiótica de metabolitos secundarios y demás compuestos bioactivos provenientes de plantas, además de sus efectos sinérgicos en combinación con antibióticos. Por ejemplo, Chung (2020) realiza recientemente una revisión de diversos trabajos que testan la capacidad terapéutica sinérgica de los triterpenoides tetracíclicos (urano, lupano y oleanos) contra infecciones por *Staphylococcus aureus* en su trabajo “Novel targets of pentacyclic triterpenoids in *Staphylococcus aureus*: A Systematic review”. Wagner y Efferth (2017), en su estudio “Introduction: Novel hybrid combinations containing synthetic or antibiotic drugs with plant-derived phenolic or terpenoid compounds”, realizan también una revisión sobre los efectos de la combinación de compuestos fenólicos/terpenoides con fármacos sintéticos/antibióticos (Wagner & Efferth, 2017), revelando una mejora de su actividad por la combinación. En estudios experimentales como “Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria”, Ahmed *et al.* (2019) ensayan y determinan la existencia de varios compuestos con actividad bacteriostática y bactericida en varios aceites esenciales extraídos de plantas.

2. OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo principal de este proyecto es evaluar la presencia de compuestos con actividad antibiótica en plantas de uso medicinal tradicional. Para ello, se establecen los siguientes subobjetivos:

1. Optimizar la extracción hidroalcohólica de compuestos bioactivos vegetales.
2. Evaluar de la actividad antibiótica de los extractos en cultivos en placa de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
3. Evaluar de la actividad sinérgica de los extractos vegetales en combinación con antibióticos.
4. Estudiar de manera preliminar la composición de los diferentes extractos.

3. INTERÉS PARA EL AVANCE DEL CONOCIMIENTO Y DE LA SOCIEDAD

Atendiendo a la rapidez con la que la literatura científica refleja la aparición de nuevas resistencias a antibióticos, junto con la dificultad existente para obtener nuevos tipos, la etnobotánica farmacológica parece representar una buena alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos con efectos terapéuticos ante enfermedades infecciosas.

El uso de las plantas con fines medicinales por el hombre es una práctica con siglos de antigüedad. Es necesario rescatar la parte más práctica de la medicina tradicional sobre el uso de las plantas con fines curativos, pero siempre tras un riguroso ensayo clínico de

cara a conseguir concentraciones mínimas inhibitorias de los compuestos eficaces, no tóxicas, etc. Esto último constituye uno de los objetivos del “Plan Estratégico de la OMS sobre Medicina Tradicional”.

Aunque ya existen varios estudios dedicados a la investigación en etnobotánica farmacológica que sitúan a las plantas como un sumidero de fármacos de gran interés, como ya comentábamos anteriormente, la inversión en este campo es insuficiente debido a la baja rentabilidad que supone la búsqueda de nuevos antibióticos para las empresas farmacéuticas. Los beneficios económicos son bajos en comparación con los que supone la investigación sobre enfermedades relacionadas con la obesidad, que conllevan muchas otras afecciones cardiovasculares y que afectan a buena parte del mundo. Dicho esto, podríamos afirmar que cualquier pequeño avance podría suponer una mejora en este campo.

La formulación del “Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos” de la AEMPS, como se comentaba en la *Introducción general*, tiene por objetivo incentivar la prevención de la resistencia bacteriana haciendo un buen uso de los antibióticos y la búsqueda de nuevos compuestos. Este proyecto, además de basarse en un análisis general de la situación actual en materia de resistencia y búsqueda de nuevos antibióticos, propone la posibilidad de que estos sean obtenidos de extractos vegetales, consiguiendo nuevos fitoquímicos capaces de mostrar actividad antibiótica *in vitro* para posibles ensayos *in vivo*.

Un proyecto como el que se presenta supone un buen incentivo a la hora de concienciar a la sociedad y a la comunidad científica sobre la importancia y eficiencia de la búsqueda de alternativas farmacológicas en el reino vegetal para la mejora de los avances biosanitarios humanos.

4. PLAN DE DIFUSIÓN Y EXPLOTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados más destacados del proyecto serán presentados en congresos y jornadas internacionales como el “World Congress and Exhibition on Antibiotics and Antibiotic Resistance (Roma, 2021)”, además de congresos organizados periódicamente por la FEMS (Federation of European Microbiological Societies) y la ASM (American Society for Microbiology). También se plantea su presentación en congresos nacionales como los que organiza periódicamente la SEMC (Sociedad Española de la Microbiología Clínica) o en la “Jornada del Día Europeo Para el uso Prudente de los Antibióticos” de la AEMPS. Las conclusiones de la investigación que se propone podrán ser publicadas, en su modalidad Open Access, en revistas científicas como “Journal of Ethnopharmacology”, “Biomed Research International”, “Phytotherapy” o “Industrial Crops and Products”.

5. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO

EQUIPO DE TRABAJO

El proyecto será desarrollado por parte del grupo de investigación en Biología Evolutiva (GIBE) de la UDC en colaboración con el Grupo de Estudio y Aplicaciones de las Microalgas, que cuentan con las instalaciones y equipos de laboratorio necesarios para la realización de los ensayos del procedimiento experimental, mientras que el análisis preliminar de la composición de los extractos obtenidos tendrá lugar en una unidad de Técnicas Cromatográficas (<https://www.sai.udc.es/es/unidades/UTC>) de los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI). En total participarán en el proyecto 3 investigadores senior y 2 estudiantes de doctorado.

PLAN DE TRABAJO

El proyecto que se presenta tendrá una duración de un año, dividiéndose en dos etapas con la siguiente división de tareas:

Primer semestre:

-Recogida, secado y preparación de los extractos hidroalcohólicos de muestras de las plantas seleccionadas. Las muestras de material vegetal se tomarán de individuos maduros en otoño, a comienzos del primer semestre de trabajo.

Segundo semestre:

-Evaluación de la actividad antibiótica de los extractos vegetales en cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como representantes de bacterias gram-negativas y gram-positivas, respectivamente.

-Evaluación de la actividad sinérgica de la combinación de los extractos con antibióticos de habitual uso clínico en tratamiento de infecciones causadas por las bacterias escogidas para los ensayos.

-Determinación de la composición de los extractos vegetales por HPLC-DAD-MS.

-Elaboración de publicaciones e informes.

6. VIABILIDAD DEL PROYECTO: PLAN DE TRABAJO (ETAPAS, RECURSOS ASIGNADOS, CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS, CRONOGRAMA...)

CRONOGRAMA

	Primer semestre			Segundo semestre		
Recogida de muestras de las plantas seleccionadas	■	■				
Secado y trituración	■	■				
Preparación de los extractos hidroalcohólicos			■			
Evaluación de la actividad antimicrobiana				■		
Evaluación de la actividad sinérgica				■		
Determinación de la composición de los extractos					■	
Elaboración de informes y publicaciones						■

METODOLOGÍA

Material vegetal

Se utilizarán plantas del medio local, dos criptógamas (un musgo y un líquen) y una fanerógama. Las especies elegidas para los ensayos del proyecto que se presenta son: *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) M. Fleishch, *Cladonia arbuscula* Flot. Wallr. y *Cytisus scoparius* (L.) Link. Estas especies han sido elegidas en base a su diferente posición filogenética, por tratarse de especies características del medio local de A Coruña y, principalmente, su facilidad de obtención. Otra razón para su elección es que se trata de especies de las que no existe apenas información en la literatura científica sobre la evaluación de compuestos con actividad antibiótica derivados de ellas.

Su recolección tendrá lugar en el Campus da Zapateira, por su cercanía a las instalaciones en las que se encontrará el laboratorio (Facultade de Ciencias, UDC).

Inicialmente, se pesará el material fresco en una balanza y se secará durante 48 horas a 40 °C en una estufa, anotando nuevamente el peso del material seco. El material vegetal seco se molerá con un molinillo de café y se pesará nuevamente, evitando pérdidas cuantificables.

Preparación de los extractos alcohólicos

Los extractos alcohólicos se obtendrán mediante la incubación del material pulverizado con una solución de metanol al 80% (proporción 1:5 p:v) durante 24 horas a 40 °C, en continua agitación. Tras ello, y previo filtrado al vacío, se eliminará el metanol mediante el uso de un rotavapor, para a continuación extraer los metabolitos de la fase acuosa mediante una partición con volúmenes iguales acetato de etilo. Tras dos extracciones sucesivas y habiendo eliminado el agua residual con sulfato de sodio anhidro, se evaporarán a sequedad los extractos obtenidos, de nuevo en rotavapor, para finalmente resuspender los compuestos extraídos en un mililitro de metanol grado HPLC y se guardarán a 4 °C hasta su uso posterior.

Preparación de los extractos acuosos

Los extractos acuosos se obtendrán mediante la incubación del material pulverizado con una solución de agua destilada (proporción 1:5 p:v) durante 24 horas a 40 °C, en continua agitación. Tras ser filtradas al vacío, se extraerán del agua los metabolitos utilizando acetato de etilo por medio de una partición por volúmenes iguales. Se realizarán dos extracciones y se eliminará el agua residual con sulfato de sodio anhidro para después realizarse una evaporación a sequedad de los extractos en el rotavapor, resuspendiendo finalmente los compuestos obtenidos en un mililitro de agua destilada. Los extractos se conservarán a 4 °C para su utilización.

Preparación de cultivos y controles

Se prepararán cultivos bacterianos en medio líquido: TBS (Trypticase Soy Broth). Se cultivará por duplicado de *Staphylococcus aureus*, incubándose durante 24 horas a 37 °C, mientras que *Escherichia coli* será cultivada, también por duplicado, e incubada durante 18-72 horas a 37 °C.

Los controles, por su parte, serán placas que únicamente contendrán el cultivo y a las que no se les añadirá extracto vegetal.

Evaluación de la actividad antibiótica de los extractos

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) y bactericidas (CMBs) de los extractos vegetales se determinarán por medio de la técnica de dilución en caldo, utilizando tubos o microplacas (microdilución) que contendrán concentraciones crecientes del extracto vegetal (Ramírez y Castaño, 2009): 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 y 100. Se realizarán diluciones en serie dobles transfiriendo 100 microlitros de solución de una fila a otra (Stefanovic, 2017). A cada placa de cultivo se le añadirán los volúmenes anteriormente determinados de cada extracto y se medirá el crecimiento radial de las colonias de forma sucesiva durante 3 días, incubando las placas a la temperatura adecuada que se reflejaba anteriormente.

Se prepararán controles a los que se añadirá metanol, con una concentración final en el medio equivalente a la que se realicen los cultivos con los extractos alcohólicos.

Evaluación de la actividad sinérgica de los extractos en combinación con antibióticos

Para evaluar los efectos sinérgicos, se emplearán antibióticos de uso clínico habitual contra *E. coli* y *S. aureus*. Se utilizarán Ciprofloxacino para *E. coli* y Vancomicina para *S. aureus*.

Los discos de los antibióticos se impregnarán con 5 microlitros del extracto correspondiente (Abullais *et al.*, 2019) (haciendo uso de la CMI adecuada), de modo que todos los extractos sean ensayados en cada cultivo y con el antibiótico correspondiente. El control consistirá en placas cultivadas que dispondrán únicamente del antibiótico.

Finalmente, se realizará una comparación de la medida de los halos de inhibición del tratamiento combinado, de los controles y de las placas a las que únicamente se les añadieron los extractos. Si las zonas del tratamiento combinado son mayores que las de los extractos vegetales junto con la del correspondiente antibiótico, se interpretará como sinergismo; si las zonas de tratamiento combinado son iguales que las de los extractos vegetales junto con la del correspondiente antibiótico, se interpretará como efecto aditivo; si las zonas del tratamiento combinado son menores que las de los extractos vegetales junto con la del correspondiente antibiótico, se interpretará como efecto antagonista (Abullais *et al.*, 2019).

Determinación de la composición de los extractos

Se realizará una evaluación preliminar de la composición de los extractos vegetales por medio de HPLC-DAD-MS. Basándonos en el comportamiento espectral de cada compuesto y realizando comparaciones con las bases de datos existentes se podrá evaluar la presencia de diferentes tipos de compuestos, cuantificando la presencia de alcaloides, flavonoides, estilbenos etc.

7. PREVISIÓN PRESUPUESTARIA. DESTINO DE LA AYUDA SOLICITADA

La metodología experimental del proyecto que se presenta requiere la realización de un alto número de ensayos para la obtención de resultados significativos, por lo que será necesaria la contratación de un técnico de laboratorio a tiempo completo durante el año de duración del estudio.

Por otro lado, destacar que el alto presupuesto otorgado al material fungible se debe a que el proyecto que se presenta necesitará de la compra de una amplia gama instrumental, destinada tanto a la fase de realización de los extractos vegetales (en la que destaca la adquisición de disolventes de precio elevado, como es el metanol grado_HPLC) y la fase en la que se trabajará con los cultivos bacterianos.

Será necesaria la adquisición de material técnico de laboratorio como puntas, probetas, pipetas, disolventes (metanol grado_HPLC, acetato de etilo, agua destilada), antibióticos, medio de cultivo, placas Petri, tubos de ensayo, material para la realización de las microdiluciones en caldo (caldo Wilkins-Chalgren, microplacas...), asas de siembra, bolsas de autoclave... Se contará también con material de asistencia sanitaria (botiquines) y de limpieza (jabón, guantes, etc.), además de correr con los gastos del

material fungible informático, como cartuchos de tinta y toners para impresora. Por último, una parte del presupuesto de material fungible también irá destinado a los gastos referidos a material de oficina (fotocopias, papel, archivadores, sobres, folios, bolígrafos, etc.).

CONCEPTOS	Primer semestre	Segundo semestre
Personal contratado	7.500 €	7.500 €
Equipamiento científico-técnico	0	0
Material bibliográfico indispensable para la realización del proyecto	0	0
Material fungible	4.000 €	2.000 €
Ayudas de coste de desplazamiento	500 €	2.000 €
Análisis de los extractos por HPLC-DAD-MS		500 €
Publicación Open Access		2.000 €
Costes indirectos (máximo 20%)	2.400 €	2.800 €
TOTAL	14.400 €	16.800 €

*Presupuesto calculado en función de las tarifas clase A publicadas por el Servicio de Apoyo a la Investigación de la UDC.

8. IMPLICACIONES ÉTICAS Y/O DE BIOSEGURIDAD

En lo que respecta a los aspectos éticos referidos a la investigación que se propone, al no ser necesaria la utilización de animales, OMG, ni tampoco de personas ni de sus datos, no es necesario que estas implicaciones sean evaluadas por un comité de ética. Por otro lado, en lo referido a la bioseguridad, los riesgos que el personal puede asumir en la manipulación de los cultivos bacterianos serán solventadas con el uso del equipamiento e instrumental de laboratorio adecuados, cumpliendo en todo momento con las medidas de higiene y seguridad recogidas en el Servicio de Prevención de Riesgos de la UDC. En adición a ello, se debe destacar que los investigadores componentes del equipo poseen una amplia experiencia de cara al trabajo en condiciones de seguridad.

9. CONCLUSIONES O HECHOS QUE SE PRETENDE ALCANZAR

Este proyecto está enfocado esencialmente a la detección de compuestos con actividad antibiótica en las tres especies de plantas propuestas. Para ello, se espera que los extractos obtenidos a partir de las mismas muestren, no solo actividad antibiótica por separado, sino que además aumenten su espectro antibacteriano en combinación con antibióticos, mostrando actividad sinérgica. Además, con el análisis preliminar de la composición de los extractos vegetales, se espera identificar metabolitos secundarios responsables de dicha actividad, suponiendo un avance para conocimiento y la sociedad en el campo de la fitofarmacología.

This project is focused essentially in the detection of compounds with antibiotic activity in the three proposed plant species. For this, it is expected that the obtained results from these show, not only antibiotic activity by itself, but also that it increases the antibacterial spectrum in combination with antibiotics, showing synergistic activity. Furthermore, with the preliminary analysis of the vegetal extracts, it is expected to identify secondary metabolites responsible of said activity, meaning a big advancement for knowledge and society in the field of phytopharmacology.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abullais Saquib, S., Abdullah Aqahtani, N., Ahmad, I., Kader, M. A., Saeed Al Shahrani, S. & Asiri, A. A. (2019). Evaluation and Comparison of Antibacterial Efficacy of Herbal Extracts in Combination with Antibiotics on Periodontal pathobionts: An *in vitro* Microbiological Study. *Antibiotics*, 8(3), 89.

doi:10.3390/antibiotics8030089

Alós, J-I. (2014). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 33(10), 692-699.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>

Arland T. Hotchkiss, Jr, Núñez, A., Strahan, G. D., Chau, K. C., White, A. K., Marais, J. P. J, ... Khoo, C. (2015). Cranberry Xyloglucan Structure and Inhibition of Escherichia coli Adhesion to Epithelial Cells. *Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5622-5633.

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00730

Brejyeh, Z., Jubeh, B. & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340.

Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B. & Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. *Annals or Translational Medicine*, 4(17), 326.

<http://dx.doi.org/10.21037/atm.2016.09.14>

Cárdenas, L. L., Merchán, A. M. & López, D. P. (2019). New antibiotics against bacterial resistance. *Revista Chilena de Infectología*, 23(4), 382-387.

<http://dx.doi.org/10.22354/in.v23i4.807>

Chung, P. Y. (2020). Novel targets of pentacyclic triterpenoids in Staphylococcus aureus: A systematic review. *Phytomedicine*, 73(2020), 152933.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152933>

Del Arco, J. (2014). Antibióticos: situación actual. *Farmacia Profesional*, 28(5), 29-33.

- Díez, M. A., Gallego M. C., Méndez, S., Sáenz de Buruaga, S. y Salinas, S. (2014). *Farmacia Profesional*, 28(2), 32-37.
doi:10.3390/moleculas25061340
- Dzotam, J. K. & Kuete, V. (2017). Antibacterial and Antibiotic-Modifying Activity of Methanol Extracts from Six Cameroonian Food Plants against Multidrug-Resistant Enteric Bacteria. *Biomed Research International*, vol. 2017, 19.
<https://doi.org/10.1155/2017/1583510>
- Echevarria Zarate, J. (1998). Resistencia bacteriana. *Revista Médica Herediana*, 9(2), 53-55.
- Elkhair, E. A., A El-Bashiti, T., A Masad, A. & Abu Draz, S. W. (2020). Antibacterial Effect of Some Palestinian Plant Extracts against Clinical Multidrug-Resistant Gram- Negative Bacteria: A possible synergism with antibiotics. *Bangladehs Journal of Medical Science*, 19(3), 509-519.
<https://doi.org/10.3329/bjms.v19i3.45869>
- Escolà-Vergé, L., Los-Arcos, I. & Almirante, B. (2019). New antibiotics for the treatment of infections by multidrug-resistant microorganisms. *Medicina Clínica*, Barcelona, 154(9), 351-357
- Esmael, A., Hassan, M. G., Amer, M. M., Abdelrahman, S., Hamed, A. M., Abd, raboh, H. A. & Foda, M. F. (2020). Antimicrobial activity of certain natural-based plant oils against the antibiotic-resistant acne bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2020), 448-455.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.006>
- Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Vera y Cuspinera, G. G., Mendoza-de-Gives, P. y González-Cortázar, M. (2016). Actividad antihelmíntica *in vitro* de tres especies vegetales utilizadas tradicionalmente en Tabasco, México. *Polibotánica*, número 41, 91-100.
DOI:10.18387/polibotanica.41.6
- Fernández García, L. (2019). *Study of tolerance, persistence and resistance mechanisms in nosocomial pathogens: search of new treatments targets* (Tesis doctoral). Universidad de A Coruña, A Coruña.
- Font Quer, P. (1961). *Plantas Medicinales*. Barcelona: Ediciones Península.
- García, J., García-Galán, M. J., Day, J. W., Boopathy, R., White, J. R., Wallace S. & Hunter, R. G. (2020). A review of emerging contaminants (EOCs), antibiotic resistant

bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs), in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. *Bioresource Technology*, 307(2020), 123228.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123228>

Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J. y Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, Cuernavaca 51(3), 439-446.

Gorlenko, L. C., Kiselev, H. Y., Budanova, E. V., Zamyatnin, A. Z. & Ikryannikova, L. N. (2020). Plant Secondary Metabolites in the Battle of Drugs and Drug-Resistant Bacteria: New Heroes or Worse Clones of Antibiotics? *Antibiotics*, 9(4), 170. doi:10.3390/antibiotics9040170

Gottlieb, O. R., de M. B. Borin, M. R. & S. de Brito, N. R. (2002). Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality? *Phytochemistry*, 60, 145-152.

Granda, S., Barter, D. M. & Laxminarayan (2014). Economic burden of antibiotic resistance: how much do we really know? *Clin Microbiol Infect*, 20(10), 973-979. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12798>

Khameheh, B., Iranshahy, M., Shoheili, V. & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1), 118.

Lazo Arispe, G. F., Mamani Flores, E., Vargas Logroño, E., Camacho Aguilar, J. R. y Sahonero Ampuero, O. (2013). Sensibilidad y resistencia en el antibiograma del *Staphylococcus aureus* en pacientes del Hospital Clínico Viedma. *Revista Científica Ciencia Médica*, 16(2), 15-17.

Livermore, D. M. (2003). Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clinical Infectious Diseases Society of America*, 36(1), 11-23.

Marin Castañi, M. y Ramírez, L. S. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technia*, 15(42), 263-268.

Olarte-Luis, T, Cáceres-Galínez, D. y Cortés, J. A. (2018). Nuevas cefalosporinas. *Revista Chilena de Infectología*, 35(5), 465-475.

Oromí Durich, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. Elsevier, Barcelona, 36(10), 367-370.

Saldarrina Quintero, E., Echeverri-Toro, L. y Opsina Opsina, S. (2015). Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en un hospital de cuarto nivel. *Revista Chilena de Infectología*, 19(4), 161-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.infect.2015.04.003>

Sanabria, L., Segobia, E.A., González, N., Alcaraz, P. y de Bilbao V. N. (2009). Actividad larvicida de extractos vegetales acuosos en larvas de *Aedes aegypti* (primeros ensayos). *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 7(2), 26-11.

Sánchez Merino, J. M., Guillán Maquieira, C., Fuster Foz, C., Madrid García, F. J., Jiménez rodríguez, M. y García Alonso, J. (2003). Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* en infecciones urinarias extrahospitalarias. *Actas urológicas españolas*, 27(10), 783-787.

Stefanovic, O. D. (2018). Synergistic Activity of Antibiotics and Bioactive Plant Extracts: A Study Against Gram-Positive and Gram- Negative Bacteria. *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*, 2, 23-48.
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72026>

Wagner, H. & Efferth (2017). Introduction: Novel hybrid combinations containing synthetic or antibiotic drugs with plant-derived phenolic or terpenoid compounds. *Phytomedicine*, 37(2017), 1-3.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.020>