

UCUENCA

Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Evaluación de la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas de extractos lipofílicos a partir del *Desmodium molliculum*”

Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Bioquímico Farmacéutico

Autoras:

Paola Lisbeth Cárdenas Macao

CI: 1400854988

Correo electrónico: pcardenasmacao@gmail.com

Yuli del Cisne Girón Castillo

CI: 1150148714

Correo electrónico: yulygc-98@hotmail.com

Tutor:

Dr. Fabian León Tamariz. PhD

CI:0102311610

Cuenca, Ecuador

17-octubre-2022

RESUMEN

Los productos naturales en general, son fuente importante para la obtención de compuestos bioactivos con el fin de mitigar problemas de salud pública, como lo es la resistencia bacteriana. Por consiguiente, en este trabajo de titulación se evaluó la actividad antibacteriana de extractos lipofílicos a partir del *Desmodium molliculum* sobre cepas bacterianas de *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 y *Salmonella Typhimurium* cepa ATCC 14028. Para la obtención de estos extractos se empleó como método principal la extracción por Fluidos Supercríticos (FSC), con modificación de condiciones extractivas, como la presión y cantidad de co-solvente (co-solvente 7%, 8,5% y 10%; presión 50 bar, 100 bar, 150 bar), a fin de determinar su posible influencia en la composición del extracto frente a un método estandarizado como la percolación. Se buscó determinar la presencia de posibles metabolitos relacionados con la actividad antibacteriana en los extractos lipofílicos mediante su identificación cualitativa por la técnica de Cromatografía de capa fina (TLC) de compuestos terpenoides (mono-sesquiterpenos y triterpenos) y fosfolípidos presentes en las diferentes condiciones obtenidas por FSC. Sin embargo, al comprobar la actividad antibacteriana mediante la técnica de microdilución en caldo, los extractos no presentaron la actividad antes mencionada, esto debido a que las biomoléculas de esta planta, presentan otras acciones biológicas y no necesariamente la actividad evaluada. Así también, la comparación de los métodos extractivos demostró las posibles ventajas de FSC sobre la percolación, puesto que, en las placas se observó mayor e intensidad de las bandas cromatográficas.

Palabras clave: Extractos lipofílicos. *Desmodium molliculum*. Actividad antibacteriana. Enterobacterias. Microdilución en caldo. Extracción por fluidos supercríticos.

ABSTRACT

Natural products are in general, an important source for obtaining bioactive compounds to mitigate different health problems, such as bacterial resistance. In this work, the antibacterial activity of lipophilic extracts of *Desmodium molliculum* on bacterial strains of *E. coli* strain ATCC 25922 and *S. Typhimurium* strain ATCC 14028 was evaluated. The main method used to obtain these extracts was Supercritical Fluid Extraction (SFE). Two of the extractive conditions, such as pressure and amount of cosolvent (cosolvent 7%, 8.5% and 10%; pressure 50 bar, 100 bar, 150 bar), were modified in order to evaluate their influence in extract composition. The obtained extracts were evaluated against percolation, a classical method. The presence of metabolites (mono-sesquiterpenes and triterpenes, and phospholipids) that could be related to the antibacterial property of the different lipophilic extracts obtained by SFE was determined using a qualitative identification method as Thin Layer Chromatography (TLC). In spite of the fact, that different extractive variables and extraction conditions were analyzed, when antibacterial activity by the broth microdilution technique was evaluated, the extracts did not present the mentioned activity. Considering the biological activity reported to this genus, the active biomolecules of this plant present other activities and not necessarily the evaluated activity. When the extractive methods were compared, TLC plates showed higher intensity on the bands corresponding to SFE.

Keywords: Lipophilic extracts. *Desmodium molliculum*. Antibacterial activity. Enterobacteriaceae. Broth microdilution. Supercritical fluid extraction.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
DEDICATORIA	12
AGRADECIMIENTO	14
INTRODUCCIÓN.....	15
Objetivos	17
Objetivo General.....	17
Objetivos Específicos.....	17
CAPÍTULO I.....	18
1. MARCO TEÓRICO.....	18
1.1. Resistencia bacteriana a antibióticos.....	18
1.1.1. Mecanismos de resistencia antibacteriana en enterobacterias.....	19
1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	21
1.1.3. <i>Salmonella Typhimurium</i>	21
1.2. La Naturaleza como fuente de terapias alternativas	22
1.3. Actividad antibacteriana de las plantas medicinales	22
1.3.1. <i>Desmodium molliculum</i>	23
1.4. Obtención de extractos vegetales	26
1.4.1. Preparación de extractos lipofílicos a partir de plantas.....	26
1.4.1.1. Percolación con hexano.....	26
1.4.1.2. Extracción mediante fluidos supercríticos.	26
CAPÍTULO II.....	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1. Materiales y equipos	29
2.2. Metodología experimental	29
2.2.1. Áreas de recolección.....	29
2.2.2. Recolección y preparación de la muestra vegetal.....	29
2.2.3. Obtención de extractos	30
2.2.3.1. Percolación con hexano.....	30
2.2.3.2. Extracción por Fluidos Supercríticos.....	31
2.2.4. Identificación de metabolitos secundarios TLC.....	31
2.2.5. Evaluación de la actividad antibacteriana por microdilución en placa	32
2.2.5.1. Preparación del inóculo	32
2.2.5.2. Preparación de control de antibióticos	33
2.2.5.3. Preparación de control positivo y control negativo	33
2.2.5.4. Evaluación de actividad antibacteriana	33

CAPÍTULO III.....	36
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
3.1. Placas TLC.....	36
3.1.1. Mono-Sesquiterpenos	36
3.1.2. Triterpenos.....	39
3.1.3. Fosfolípidos.....	41
3.2. Actividad antibacteriana	41
3.2.1. <i>Escherichia coli</i> cepa ATCC 25922 y <i>Salmonella</i> Typhimurium cepa ATCC 14028	41
CAPÍTULO IV	46
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
4.1. Conclusiones.....	46
4.2. Recomendaciones.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Desmodium molliculum</i>	25
Figura 2 Diagrama de fases entre sólido, líquido y gaseoso.....	27
Figura 3 Esquema de pipeteo de extratos lipofílicos mas inculo bacteriano	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción botánica y propiedades medicinales de <i>Desmodium molliculum</i>	25
Tabla 2 Datos de recolección de muestras botánicas	29
Tabla 3 Condiciones de extracción supercrítica	31
Tabla 4 Fases móviles y reveladores para placas TLC.....	32
Tabla 5 Distribución de extractos y controles en Microplaca de 96 pocillos fondo plano esteril	35
Tabla 6 Resultados de placas TLC en UV-visible de mono- y sesquiterpenos	37
Tabla 7 Resultados de placas TLC en λ 366 nm de mono- y sesquiterpenos	38
Tabla 8 Resultados de placas TLC en UV-visible de triterpenos.....	40
Tabla 9 Actividad frente a <i>E coli</i> y <i>S. Typhimurium</i> expresada como IC50 e IC90	42

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
AmpC	Serin betalactamasas
Bar	Unidad de medida de presión, 1 bar equivale a 1 atm
BLEE	Betalactamasas de Espectro Extendido
°C	Unidad de temperatura Celsius
CO₂	Dióxido de carbono
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CIM	Concentracióonn Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil sulfoxido
FSC	Flúidos supercríticos
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
ITU	Infecciones del tracto urinario
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBP	Proteínas de unión a penicilina
PBS	Buffer de fosfato salino
TLC	Cromatografía en capa fina
TSB	Caldo triptona- soja
UFC	Unidad formadora de colonias
UTM	Sistema de coordenadas universal transversal de Mercator

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Paola Lisbeth Cárdenas Macao en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas de extractos lipofílicos a partir del *Desmodium molliculum*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de octubre del 2022



Paola Lisbeth Cárdenas Macao

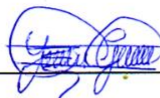
C.I: 1400854988

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yuli del Cisne Girón Castillo en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas de extractos lipofílicos a partir del *Desmodium molliculum*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de octubre del 2022



Yuli del Cisne Girón Castillo

C.I: 1150148714

Cláusula de Propiedad Intelectual

Paola Lisbeth Cárdenas Macao, autor/a del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas de extractos lipofílicos a partir del *Desmodium molliculum*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de octubre de 2022



Paola Lisbeth Cárdenas Macao

C.I: 1400854988

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yuli del Cisne Girón Castillo, autor/a del trabajo de titulación "Evaluación de la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram negativas de extractos lipofílicos a partir del *Desmodium molliculum*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de octubre de 2022



Yuli del Cisne Girón Castillo

C.I: 1150148714

DEDICATORIA

Dedico este trabajo especialmente a mi madre Guadalupe, por su apoyo incondicional y darme su ejemplo de dedicación y constancia diaria que me ha permitido alcanzar mis metas.

A mis hermanas: Jesenia y Fernanda, por su motivación y cariño en este proceso.

A mis sobrinos: Juan David, Matías, Dominic y Daniel, que son mi mayor alegría y motivación, sobre todo me han enseñado a ser optimista.

A mi querido Roger, porque su ayuda en este proceso ha sido fundamental.

A mis amigos, especialmente Yuli por ser parte de esta difícil aventura.

Paola Cárdenas Macao

Este trabajo de titulación, les dedico a mis padres, por ser mi motor cada día y por ser mi fortaleza. Me han enseñado a ser fuerte y perseverante. A mi segunda madre, que siempre la llevo en el corazón. Y a todos mis demás familiares y amigos decirles que una palabra de apoyo puede cambiar el sentido de la vida.

A mis sobrinos, por enseñarme a ver la vida con amor y paz, y, por sobre todo de los momentos malos, sacar el positivo.

A mis hermanos, por apoyarme siempre y confiar en mí, amigos, primos y primas que siempre encuentran un motivo para verme sonreír y han seguido conmigo a pesar de los días buenos y malos.

Para mi compañera y amiga de tesis que tanto en la vida educativa como personal siempre me ha demostrado de manera sutil el verdadero significado de amistad sincera.

A Leo, por confiar en mí, brindarme su apoyo y amor.

Yuli del Cisne Girón Castillo

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud va dirigida para todos los que han contribuido día a día en nuestra formación como profesionales y buenas personas

Al Dr. Fabián León por haber confiado el desarrollo del presente trabajo y brindado su apoyo al demostrarnos que con constancia, disciplina y perseverancia todo se puede.

A mis docentes, y demás personas que nos acompañaron en este proceso educativo, les agradecemos por enseñarnos que antes de ser profesional, se debe ser buena persona y por impartir conocimientos que nos servirán para afrontar los retos que conlleva la vida laboral, y, por sobre todo ser un ejemplo de superación y motivación.

INTRODUCCIÓN

Con el pasar de los años, y a pesar de la introducción al mercado de nuevos antibióticos, se manifiesta una problemática evidente a nivel mundial relacionada con el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos. Actualmente, factores como el consumo indebido, la falta de compromiso en cumplir con el tratamiento, o el elevado costo de algunos medicamentos, han contribuido al desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos disponibles. En respuesta a esta situación, se ha impulsado la búsqueda, identificación y desarrollo de nuevas formulaciones, y la caracterización de nuevas especies vegetales, su estudio fitoquímico y el análisis de su potencial antibacteriano (Barreto & Bonilla, 2017).

El incremento de enfermedades causadas por bacterias patógenas es de preocupación general para la salud pública, sobre todo por el aumento de la resistencia de los patógenos, el impacto socioeconómico y vulnerabilidad de la población. Según la OMS (2015), las enfermedades por enterobacterias se consideran de importancia clínica, puesto que causan más de la mitad de la carga mundial de las enfermedades de transmisión alimentaria, 550 millones de personas se enferman y 230.000 mueren cada año. Dentro de este grupo se resalta *Escherichia coli*, identificada particularmente como responsable de ITU, se ha aislado en un 75-95% de los casos de cistitis aguda no complicada y como enteropatógena de enfermedades transmitidas por alimentos y/o aguas contaminadas; así también *Salmonella* Typhimurium, causante de salmonelosis, generando problemas gastrointestinales como vómito, diarrea, dolor abdominal, náuseas y fiebre (Guerrero et al., 2014; SEIMC, 2019; Varela et al., 2015)

Hoy en día, existen numerosos estudios relacionados al tema de investigación, en los que se ha probado principios activos provenientes de gran variedad de especies vegetales contra bacterias de interés clínico como *Escherichia. coli* y *Salmonella* Typhimurium en los que el objetivo ha sido probar su actividad antibacteriana. Diversos extractos de plantas medicinales

han sido utilizados por siglos como terapia alternativa; *Desmodium molliculum* estudiada en este proyecto, se ha usado ampliamente como medicamento tradicional en América durante varias generaciones. Pocos son los estudios que han demostrado la actividad antibacteriana de esta planta frente a algunas enterobacterias. En la búsqueda bibliográfica se evidencia la actividad antibacteriana contra *E. coli*, pero no contra *S. Typhimurium*. De ahí la importancia del análisis de plantas medicinales y cuánto se podría lograr si más investigadores se dedicaran a desentrañar la milenaria tradición herbolaria que con las herramientas adecuadas sería factible para mejorar la calidad de vida (Olascuagua et al., 2020; Barreto & Bonilla, 2017).

Objetivos

Objetivo General

Determinar la acción antibacteriana contra *E. coli* cepa ATCC 25922 y *S. Typhimurium* cepa ATCC 14028 de extractos lipofílicos de *Desmodium molliculum* obtenido por extracción de fluidos supercríticos.

Objetivos Específicos

- Comparar las características de los extractos obtenidos por percolación con hexano y por fluidos supercríticos mediante la optimización de factores extractivos como la presión y cantidad de co-solvente.
- Establecer semejanzas y diferencias básicas de los extractos mediante técnica de cromatografía en capa delgada (TLC).
- Evaluar la acción antibacteriana de extracto obtenido sobre cepas bacterianas de *E. coli* cepa ATCC 25922 y *S. Typhimurium* cepa ATCC 14028 mediante la técnica de microdilución en caldo.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Resistencia bacteriana a antibióticos*

La aparición global de bacterias resistentes y multirresistentes se ha propagado, adquiriendo nuevos mecanismos de resistencia. El factor más influyente es el uso inapropiado de antibióticos, dando como resultado una eficacia reducida de los fármacos haciendo que el tratamiento sea difícil, costoso o imposible (Wikaningtyas & Sukandar, 2016); (OMS, 2021). Durante el año 2019 se estimó aproximadamente 1,27 millones de muertes a nivel mundial, a consecuencia de infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos, asociando como patógenos principales a *Escherichia coli*, seguida de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Datos que demuestran una preocupante amenaza, que obliga de manera urgente a realizar acciones que mitiguen este problema de salud mundial (Zhang et al., 2021).

Los antibacterianos, son agentes terapéuticos que bloquean reacciones de las bacterias patógenas, causando su muerte y/o inhibiendo su multiplicación, sin embargo, varios factores les dan capacidad de evadir el efecto a esos agentes y así adquieran resistencia. La resistencia bacteriana puede ser de tipo intrínseca, es decir, es una característica propia de cierto grupo bacteriano, o de tipo extrínseca o adquirida, cuando las bacterias adquieren mecanismos de resistencia como consecuencia de mutaciones en el cromosoma o por la transferencia horizontal de genes de resistencia (Fica, 2014).

Según Munita & Arias (2016) indican que “*Las células bacterianas de una población sensible desarrollan mutaciones que afectan a la actividad del fármaco, provocando que éste sólo actúe sobre la población sensible y haya la sobrevivencia de la población resistente*”. Los cambios mutacionales solo se mantienen si son necesarios en presencia del fármaco, son irreversibles y escasos. Mientras que la transferencia horizontal de genes, se produce por el paso de material genético externo, ya sea por transformación, donde incorporan de forma natural ADN para desarrollar resistencia. También por transducción, que está mediada por

bacteriófagos que incorporan fragmentos de ADN con genes de resistencia. Y por conjugación, que implica el contacto de célula a célula y utiliza elementos genéticos móviles para compartir información. Los elementos genéticos móviles más importantes son los plásmidos, transposones e integrones; desempeñan un papel importante en el desarrollo y diseminación de la resistencia antibacteriana en las bacterias Gram negativas (Munita & Arias, 2016).

1.1.1. Mecanismos de resistencia antibacteriana en enterobacterias

El grupo de bacilos Gram negativos entéricos incluye diferentes géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más), comparten algunas características, como ser anaerobios o aerobios facultativos, fermentan hidratos de carbono, son móviles con flagelos, peritricos o no móviles. Además, están adaptadas a compartir material genético, por tanto, los genes de resistencia son captados y transferidos a plásmidos que pueden pasar de una célula a otra. Los mecanismos bioquímicos característicos y prevalentes de resistencia son de tipo enzimáticos, o por modificaciones en la pared celular o los sitios diana (Jawetz, Melnik & Adelberg, 2020; Partridge, 2015).

Mecanismos bioquímicos de resistencia antibacteriana:

1. *Producción de enzimas inactivadoras del fármaco*: las bacterias protegen su estructura al secretar enzimas, ya sean codificadas por su cromosoma o por su plásmido, que destruyen o inactivan el fármaco. Entre las más importantes están las betalactamasas, con distintas clases, como betalactamasas de espectro extendido (BLEE), cefalosporinasa cromosómica, AmpC o carbapemenasas. Estas hidrolizan el anillo β -lactámico que impide al fármaco unirse a proteínas de unión a penicilina (PBP) y realizar su actividad. Otro tipo de enzimas, modifican químicamente el fármaco añadiendo grupos acil, fosfato, acetil, ribosil, nucleotidil o glucosil, que también impiden la unión a proteínas por un impedimento esteárico (Blair et al., 2014; Bello & Dingle, 2018; Khameneh et al., 2016; Kumar & Chordia, 2017).
2. *Modificaciones en el sitio de unión*: para evitar el reconocimiento del fármaco, las bacterias generan una alteración o modificación en el sitio diana por mutaciones en el

gen. La modificación puede ser de tipo ribosomal o en la proteína de unión a penicilina (PBP), este proceso sucede con los aminoglucósidos, penicilinas y macrólidos (Blair et al., 2014; Bello & Dingle, 2018; Khameneh et al., 2016; Kumar & Chordia, 2017).

3. *Alteración en la permeabilidad celular:* las porinas son proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que permiten el ingreso de moléculas hidrofóbicas; ya sea la pérdida o cambio funcional de las porinas llega a impedir el ingreso y acción del fármaco (Blair et al., 2014; Bello & Dingle, 2018; Khameneh et al., 2016; Kumar & Chordia, 2017).
4. *Bombas de eflujo:* son transportadores de sustancias tóxicas o fármacos, desde el interior de la célula hacia el exterior, la eliminación provoca la disminución de la concentración intracelular del fármaco, este mecanismo en parte es responsable de la resistencia intrínseca (Blair et al., 2014; Bello & Dingle, 2018; Khameneh et al., 2016; Kumar & Chordia, 2017).

La pared celular de las bacterias Gram negativas es más compleja. Tiene una capa de peptidoglicano cubierta por una membrana interna, y una membrana externa compuesta por una doble capa de fosfolípidos que está unida a la membrana interna por lipopolisacáridos (LPS), están formados por el lípido A, el polisacárido central, y la cadena del lado O, que son el punto clave que permite a las bacterias Gram negativas, ser más resistentes a extractos naturales con actividad antimicrobiana, puesto que la envoltura celular cumple la función de sitio diana para acción antibiótica, también es la vía de ingreso de una diversidad de compuestos al interior de la célula, entre ellos los componentes bioactivos. Para que suceda una acción antibacteriana se debe alcanzar una concentración suficientemente alta en sus sitios diana, para ello una gran variedad de antibacterianos deben atravesar las barreras físicas de la envoltura celular; mecanismos al que las bacterias se oponen alterando las vías de ingreso por cambios conformacionales de las membranas celulares, impidiendo así el ingreso del fármaco (Nazzaro et al., 2013).

Las moléculas hidrofílicas atraviesan la membrana externa mediante las porinas, que trabajan como canales transmembrana hidrofílicos, por lo que las bacterias Gram negativas

son resistencias a los antibacterianos de carácter hidrofóbico. No obstante, la membrana externa no es totalmente impermeable a moléculas hidrofóbicas, ya que, algunas pueden atravesar lentamente los canales (Nazzaro et al., 2013; Rathor, 2021).

1.1.2. *Escherichia coli*

Bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es el bacilo Gram negativo más importante como patógeno humano, implicado en infecciones nosocomiales, principalmente de tracto urinario y del tracto digestivo. La infección causada por esta bacteria se transmite de persona a persona, por agua y alimentos contaminados como, productos de carne poco cocida, leche cruda, y hortalizas crudas. Según el cuadro clínico y los factores de patogenicidad, se puede clasificar diferentes cepas como *E. coli* enterotoxigénica, enteropatógena, enterohemorrágica, enteroinvasiva y enteroagregativa (Apurba & Sandhya, 2019; Ryu et al., 2012). Es una de las principales bacterias que puede transmitir genes de resistencia a través de plásmidos y generar resistencia a tratamientos bacterianos. En la actualidad, se ha reportado alta resistencia de *E. coli* a cefalosporinas de 3° generación y quinolonas (OMS, 2021).

1.1.3. *Salmonella Typhimurium*

Salmonella entérica serovariedad Typhimurium es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, de origen alimentario que causa predominantemente salmonelosis en humanos por ingestión de alimentos y aguas contaminadas; generalmente presente en los huevos de pollo (Apurba & Sandhya, 2019; Bello & Dingle, 2018). En la última década, *S. Typhimurium* ha evolucionado y diseminado rápidamente por la adquisición de genes de resistencia a múltiples fármacos. Es la causa principal de intoxicaciones alimentarias, sobre todo en países occidentales y mayoritariamente en Estados Unidos; según datos publicados por el Centro para Control y Prevención de Enfermedades, mueren al año alrededor de 420 personas a causa de esta infección. Se ha reportado que es resistente a quinolonas y fluoroquinolonas (CDC, 2019; Wang et al., 2019).

1.2. La Naturaleza como fuente de terapias alternativas

El interés por el uso de la medicina tradicional desempeña un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de medicamentos terapéuticos modernos. Algunas plantas medicinales son la fuente de terapias coadyuvantes en los sistemas de salud, para prevenir y tratar enfermedades (Yadav et al., 2015; Jamshidi-Kia et al., 2018). Los metabolitos secundarios presentes en algunas plantas, poseen actividades biológicas y farmacológicas muy diversas, por ejemplo, varios tienen poderes antiinflamatorios, antiateroscleróticas, antitumorales, antimutagénicas, anticancerígenas, antibacterianas y antivirales, entre los principales (Yadav et al., 2015).

Los componentes químicos de las plantas son de naturaleza y estructura diversa, según su naturaleza pueden ser inorgánicos como el agua y minerales, mientras que los orgánicos pueden proceder del metabolismo primario o secundario del vegetal. Los compuestos procedentes del metabolismo primario, son esenciales para la supervivencia, entre ellos están los lípidos y ceras, aminoácidos y proteínas, glúcidos, ácidos nucleicos y compuestos nitrogenados. A diferencia, los metabolitos secundarios permiten la adaptación del vegetal al medio, generan productos bioactivos de interés farmacológico; provienen de tres rutas metabólicas principales, la ruta del ácido shikímico que da lugar a compuestos fenólicos, taninos, lignanos y cumarinas, algunos flavonoides y alcaloides; la ruta de los policétidos que genera antraquinonas y algunos flavonoides, y la ruta del ácido mevalónico principalmente sintetiza esteroides, terpenos y también algunos alcaloides (Kuklinski, 2000).

El estudio de las moléculas bioactivas presentes en los vegetales ha dado lugar al desarrollo de varios fármacos; un ejemplo representativo fue el aislamiento de la morfina del opio, usado como analgésico, o el descubrimiento de la quinina aislada de algunas especies del género *Cinchona* como antipirético, antipalúdico y analgésico en la malaria (Rathor, 2021).

1.3. Actividad antibacteriana de las plantas medicinales

Las plantas han desarrollado la capacidad de protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos, sintetizando diferentes metabolitos secundarios, algunos de

ellos responsables de actividad antibacteriana, propiedad asociada a componentes lipofílicos. Su naturaleza lipofílica les permite unirse a la pared bacteriana, gracias a diversos mecanismos, como la alteración o aumento de la permeabilidad; y como consecuencia producen la liberación de los componentes celulares, e inclusive inhiben procesos celulares como la transcripción de ADN, síntesis de proteínas y actividad enzimática (Rueda et al., 2018).

La familia de las fabáceas presenta una amplia cantidad de sustancias bioactivas con naturaleza química variada. Dentro de esta familia, se ha estudiado el género *Desmodium*, por su variabilidad de funciones y de compuestos fitoquímicos útiles con potencial antibacteriano:

- Los terpenoides: en general funcionan como repelente de insectos, y algunos tienen función antibacteriana, provocan cambios en la estabilidad y permeabilidad de la membrana bacteriana, al interferir con la disipación de la fuerza de los protones (Rodríguez, et al., 2017).
- Los flavonoides: pueden provocar lisis celular ya que tienen la capacidad de interactuar con proteínas intracelulares y formar complejos con estructuras de la pared celular bacteriana (Rodríguez, et al., 2017).
- Los alcaloides están presentes en altas concentraciones en algunas plantas de este género, su función se ha relacionado su posible inhibición, al detener la síntesis proteica, inducir la apoptosis e inhibir enzimas, ya que se intercala con el ADN bacteriano (Rodríguez, et al., 2017).

1.3.1. *Desmodium molliculum*

El *Desmodium molliculum* es una planta utilizada en la medicina tradicional, conocida como "manayupa", "pata de perro" o como "hierba del infante". Se reportan propiedades farmacológicas como cicatrizante, antiinflamatoria, antiasmática, hepatoprotectora,

antioxidantes, anticonceptivas y antibacterianas. Crece como planta rastrera, especialmente en climas cálidos y templados (Olascuagua et al., 2020).

Entre los metabolitos secundarios reportados o aislados de esta especie se mencionan, la presencia de taninos, esteroides triterpenos, flavonoides dentro de este grupo se encuentran los flavonoles, flavonas como la vitexina o isoflavonas como la genisteína y 5-o-metilgenisteína; también presenta saponinas esteroidales, compuestos fenólicos, alcaloides y carbohidratos. Sin embargo, los flavonoides y los alcaloides se consideran los principales componentes y responsables de la mayoría de las actividades de *Desmodium molliculum* (Barreto & Bonilla, 2017).

Tabla 1

Descripción botánica y propiedades medicinales de Desmodium molliculum

Orden	<i>Fabales</i>
Familia	<i>Fabaceae</i>
Género	<i>Desmodium</i>
Nombre científico	<i>Desmodium molliculum</i>
Nombre común	“pata de perro”, “hierba del infante”, “manayupa”, “chancas de comida” y “muña”.
Hábitat	Cultivos y pastizales. Climas cálidos y templados.
Distribución	Originaria de los Andes, sin embargo, se distribuye entre 1500 a 3500 msnm desde México hasta Sudamérica. En Ecuador se distribuye en varias provincias de la región interandina como Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha y Tungurahua.
Características botánicas	Hierba perenne; tallo poco ramificado; hojas compuestas alternas, con estípulas y flores sobre pedicelos distribuidas a lo largo de un eje, formando en conjunto un racimo.

Nota: Datos obtenidos de Aguirre, Puglla, & Merino, (2014); Olascuagua et al., (2020).

Figura 1: *Fotografía Desmodium molliculum.*



Fuente: Autores

1.4. Obtención de extractos vegetales

El empleo o utilización de productos vegetales, en su mayoría implican la preparación de extractos que contienen los metabolitos o compuestos activos presentes en el vegetal. Para su obtención se han descrito diversos métodos o procesos, tanto a escala tradicional, artesanal, o incluso a nivel industrial. La mayoría de métodos utilizan diversos solventes, capaces según su polaridad, de extraer los elementos afines a partir de la matriz natural. Como ejemplo básico de esta metodología se puede mencionar a la maceración como el método esencial, a partir del cual se han desarrollado varias modificaciones encaminadas a mejorar la eficiencia en la extracción de los metabolitos naturales. Percolación, extracción por arrastre de vapor, método de Soxhlet, son ejemplos de procedimientos extractivos tradicionales. Extracción por fluidos supercríticos, acelerada por solventes, microondas, o ultrasonido, son ejemplos de metodologías modernas, más eficientes y menos contaminantes que las anteriores, razón por la cual han recibido el calificativo de tecnologías verdes.

A continuación, se presentan dos metodologías empleadas en la presente investigación, una tradicional como la percolación, y otra moderna como la de fluidos supercríticos.

1.4.1. Preparación de extractos lipofílicos a partir de plantas

1.4.1.1. Percolación con hexano

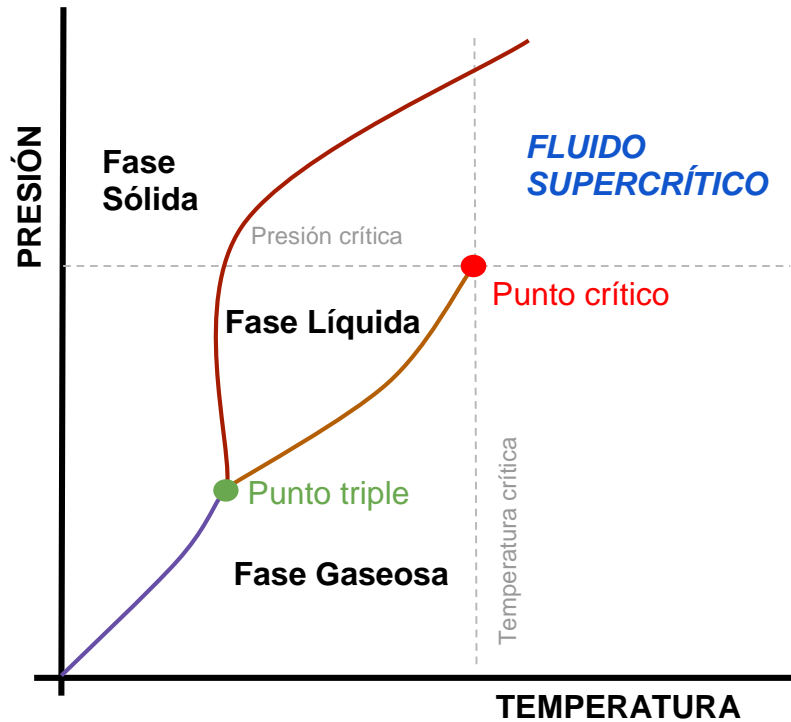
Es un método de extracción continua, realizado a temperatura ambiente. El solvente empleado se mantiene en contacto permanente con la droga pulverizada, misma que es humectada por nuevas proporciones de solvente en un solo sentido, condición que le permite ceder sus componentes solubles al aumentar la porosidad de la pared celular y la difusión de sustancias extraíbles hacia el exterior de las células. Su característica principal radica en la extracción casi completa de los principios activos, acción denominada “agotamiento de la droga”. La desventaja, por otro lado, es el elevado consumo de disolvente (Kuklinski, 2000).

1.4.1.2. Extracción mediante fluidos supercríticos.

Un fluido supercrítico se considera a un solvente que, en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico, posee una densidad similar a la de los líquidos, en

tanto que su viscosidad y difusividad son similares a la de los gases. El diagrama de **Figura 2** representa la relación entre presión y temperatura, y muestra la región en donde el solvente se encuentra en las condiciones antes mencionadas (Knez et al., 2019).

Figura 2: Diagrama de fases entre sólido, líquido y gaseoso.



Fuente: (Nahar & Sarker, 2012)

El método de extracción por FSC permite la extracción rápida, eficiente y con bajo impacto ambiental de compuestos termolábiles. Además, brinda la posibilidad de ajustar las propiedades físicas como viscosidad, densidad y variaciones entre presión y temperatura; siendo éstas las principales ventajas. El CO₂ supercrítico es un solvente utilizado con gran frecuencia por su característica no polar, lo que garantiza la extracción de compuestos no polares, de preferencia compuestos lipofílicos y volátiles, sin embargo, presenta baja afinidad por los compuestos polares. Para un mejor rendimiento extractivo de los principios activos, la adición de co-solventes como metanol, hexano, etanol, tolueno o isopropanol ayudan a mejorar la solubilidad (Knez et al., 2019; Manjare & Dhingra, 2019; Yousefi et al., 2019).

Mantener la temperatura supercrítica de extracción es importante para los compuestos termolábiles. La presión es un parámetro que permite mejorar el rendimiento de extracción, mediante el aumento, genera mayor compresión y ruptura de la célula vegetal lo que favorece la transferencia de masa y liberación de compuestos lipofílicos. Cuanto mayor es la presión, mayor es el poder disolvente y menor es la selectividad de extracción por tanto también hay extracción diferentes moléculas. Otro factor importante que genera efectos sobre la composición del extracto obtenido, es el uso de un co-solvente como el etanol, acetona, acetonitrilo, entre los principales. Estos solventes actúan como modificadores para aumentar la polaridad y el poder extractivo del solvente, lo que provoca la extracción de moléculas polares. Además, aumentar gradualmente la presión y el porcentaje de co-solvente contribuye a aumentar el rendimiento de extracción (Fornari, 2012; Scalia et al., 1999).

En el presente trabajo además de evaluar la actividad antibacteriana de *Desmodium molliculum*, busca que los compuestos de estudio no se vean alterados en su composición, puesto al amplio contenido de metabolitos de interés terapéutico. Una de las técnicas que más se acopla a mantener las características de los extractos lipofílicos, y de varios productos naturales; es FSC pues garantiza mantener la bioactividad de los mismos a comparación de técnicas convencionales, así también, permite la obtención de componentes termolábiles con alto rendimiento, en menor tiempo y sin pérdidas por deterioro o degradación. Características reflejadas gracias a la posibilidad de ajustar las condiciones de extracción de manera selectiva, tal como el aumento de la presión y porcentaje de co-solvente.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Materiales y equipos*

MMT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium)) (Sigma, Estados Unidos), TSB (caldo Triptona-Soja), DMSO (Dimetil sulfóxido) (Merck, Alemania). Los equipos utilizados se mencionan en cada procedimiento.

2.2. *Metodología experimental*

En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana sobre enterobacterias a partir de extractos lipofílicos de *D. molliculum* obtenidos por fluidos supercríticos y por percolación con hexano, se realizó una investigación de tipo observacional, experimental y descriptiva.

2.2.1. Áreas de recolección

Tabla 2

Datos de recolección de muestra botánica.

Lugar de recolección	Coordenadas		Fecha de recolección
	UTMX	UTMY	
San Bartolomé	17741055	9668236	06-03-2022
El Valle	17728146	9674594	06-03-2022
Barabon	17710701	9676140	08-03-2022
San Joaquín	17714823	9680850	08-03-2022 y 04-04-2022
Biblián (Cañar)	17735039	9699939	10-03-2022 y 04-02-2022

2.2.2. Recolección y preparación de la muestra vegetal

La planta se encuentra generalmente cerca a los caminos, enredada en otras plantas. Se recolectó manualmente en fundas de papel, evitando la destrucción de la especie. En el laboratorio se realizó la selección de las partes útiles de la planta (tallos secundario y hojas). Se procedió al lavado bajo agua corriente, luego se realizó un último enjuague con agua destilada por 10 minutos. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 horas sobre papel periódico sin impresión. Se pasó la biomasa a bandejas de secado de acero inoxidable

previamente sanitizadas y se colocaron en una estufa de secado (Pro-3, Cuenca, Ecuador) a 37°C hasta obtener peso constante. Posterior al secado, se mezclaron las muestras recolectadas y se extrajo continua y aleatoriamente porciones de muestra requeridas para obtener suficiente cantidad para la preparación de extractos. Las características taxonómicas de la especie vegetal fueron dadas por el departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca.

2.2.3. Obtención de extractos

Los procesos extractivos se realizaron en el laboratorio de Fitoquímica del grupo de plantas medicinales del departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca. La extracción se realizó por percolación con hexano y por fluidos supercríticos (FSC).

2.2.3.1. Percolación con hexano

Para la obtención del extracto, se pesaron 10 g de la droga seca y triturada, se colocó en un frasco de vidrio para humectar con 25 mL de hexano por un periodo de 15 horas. Posterior a la humectación, se pasó la droga al equipo de percolación con el solvente hasta saturarla (1 cm sobre el nivel de la droga) y se dejó en maceración por 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se procedió a recolectar las fracciones de extracto asegurando un goteo constante (20 gotas por minuto), la fracción A se recolectó en un tubo tapa rosca, corresponde al 75% del peso inicial de la droga (7,5 ml), se continuó recolectando en tres fracciones adicionales con volumen similares a la primera fracción para lograr el agotamiento.

- **Concentración del extracto:** Las fracciones obtenidas por percolación fueron concentradas en el rotavapor Heidolph laborota 4000 Efficient (Schwabach, Alemania) con ayuda del baño María a temperatura de 28°C logrando la eliminación de todo el solvente. El extracto concentrado en el balón se redisolvió con la fracción A del percolado usando el baño ultrasónico Cole- Parmer 8893 (Illinois, Estados Unidos). Finalmente, se dispensó en tubos el extracto disuelto y se eliminó el solvente restante en el concentrador al vacío Rapid Vap de LABCONCO (Kansas, Estados Unidos)

2.2.3.2. *Extracción por Fluidos Supercríticos*

Para la obtención de extractos lipofílicos mediante Fluidos Supercríticos se utilizó un equipo MV-10 Waters (Milford, Estados Unidos). Se pesó 2 g de la droga seca y previamente triturada, se colocaron en los cartuchos de extracción. El equipo se configuró para extracción con ciclos de 2 min de duración dinámica y 1 min de duración estática para un total de 10 ciclos. Con la finalidad de evaluar la posible influencia de este método extractivo sobre la composición del extracto, y su posible acción farmacológica, se modificaron cuatro variables extractivas, a saber, presión, porcentaje y flujo de co-solvente, flujo de dióxido de carbono como solvente. La temperatura de extracción se mantuvo fija a 40°C para todas las condiciones de extracción, como se observa en la **Tabla 3**.

Tabla 3

Condiciones de extracción supercrítica.

Condiciones usadas				
Co-solvente Porcentaje	Velocidad de flujo de etanol (mL/min)	Velocidad de flujo de CO ₂ (mL/min)	Presión (bar)	Temperatura (°C)
7,0 %	0,35	4,65	50, 100, 150	40
8,5 %	0,43	4,58	50, 100, 150	40
10,0 %	0,5	4,5	50, 100, 150	40

- **Concentración del extracto:** Los extractos lipofílicos obtenidos por FSC se concentraron con N₂ hasta eliminación total del co-solvente y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis.

2.2.4. **Identificación de metabolitos secundarios TLC**

Se empleó placas cromatográficas de sílica gel (MERCK, Darmstadt, Alemania) previamente activadas a temperatura de 100 °C por una hora. Se sembró las placas utilizando los extractos lipofílicos obtenidos por FSC bajo las condiciones de presión 50 bar con co-solvente 7,0%, 10,0% y a presión 150 bar con co-solvente 7,0%, 10,0%. Además, se evaluó el extracto obtenido por percolación con hexano. Se evaluó la presencia de terpenoides y fosfolípidos. Los patrones, fases móviles y reveladores empleados se indican en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Fase móvil y reveladores para placas TLC

Muestras	Patrones	Metabolito	Fase móvil	Revelador
150/10% * 150/7% 50/10% 50/7% Percolación	Tujona Citral B-pineno Farnesol Trans-cariofileno	Mono- sesquiterpenos	Tolueno: Ac. de etilo (85:15%, v/v/v)	Liberman
	Escina Aloin Rhein Ácido Oleanólico Asiaticoside	Triterpenos	Tolueno: cloroformo: etanol (40:40:10%, v/v/v)	Anisaldehido: H ₂ SO ₄
	Lecitina Ac. Oleico Ac. Esteárico	Fosfolípidos	Cloroformo: metanol: agua (66:25:4%, v/v/v)	Yodo Molibdato de amonio

Nota. Las muestras usadas son cuatro condiciones de extracción por FSC y una muestra por percolación.

* **150 y 50** se refieren a la condición de presión de CO₂ (bar); **el porcentaje** se refiere a la cantidad de co-solvente (etanol).

2.2.5. Evaluación de la actividad antibacteriana por microdilución en placa

2.2.5.1. Preparación del inóculo

Para la preparación de las suspensiones bacterianas se debe tomar de un criostock dos décimas superiores a la concentración bacteriana final (en microtécnicas en caldo es de 5×10^4 UFC/mL), por lo tanto, de un criostock a concentración de 5×10^6 UFC/mL, tomó 236 uL de *E. coli* ATCC 25922 con 9.764 mL de TBS + Tween 80, así también, se tomó 33 uL de *S. Typhimurium* ATCC 14028 con 9.967 mL de TBS + Tween 80, para un volumen final de 10 mL. Se tomó 100 uL de la suspensión bacteriana y distribuyó en todos los pocillos de la microplaca (excepto en el control negativo), para obtener una concentración final de inóculo de 5×10^4 UFC/mL cuando se agregó los 100 uL de la dilución (extracto lipofílico + TSB+ tween 80)

2.2.5.2. Preparación de control de antibióticos

La preparación del control de antibióticos se realizó acorde a las cepas bacterianas utilizadas, es así que para *E. coli* ATCC 25922 se utilizó Amikacina a 250 mg/mL de concentración y para *S. Typhimurium* ATCC 14028 se utilizó Gentamicina a 140 mg/mL de concentración. Las diluciones se realizaron según el punto de corte para cada antibiótico, 32 ug/mL y 8 ug/mL respectivamente (CLSI, 2021). En la microplaca se colocó 100 uL de las diluciones del antibiótico y se agregó 100 uL del inóculo correspondiente. En la **Fuente:**

Autores

Tabla 5 se identifica como CA.

2.2.5.3. Preparación de control positivo y control negativo

Para el control positivo se colocó 100 uL de caldo (TSB + DMSO + Tween 80) + 100 uL de la suspensión bacteriana. Para el control negativo se colocó 200 uL solo de caldo. En la **Fuente: Autores**

Tabla 5 se indica como C+ y C- para control positivo y control negativo respectivamente.

2.2.5.4. Evaluación de actividad antibacteriana

Para solución inicial (SI) se pesó 64 mg del extracto lipofílico de *Desmodium molliculum* obtenido tanto por FSC y percolación, se disolvió con DMSO y TSB + Tween 80 para obtener un volumen final de 1 mL hasta formar una emulsión (baño de ultrasonido y homogeneización por 30 min). Se añadió DMSO para mejorar la solubilidad de los extractos, la concentración final fue de 0.035 % (Rango aceptado hasta 1%).

De la misma solución inicial (SI) se tomó 40 uL, se agregó 960 uL de TSB + Tween 80 por triplicado, y se identificó como solución madre (SM). Posteriormente, se preparó diluciones tomando volúmenes de 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 uL de la solución madre y se completó el volumen a 200 uL, procedimiento que se realizó por triplicado (n=3). Luego, se tomó 100 uL de cada una de las diluciones y se colocó en una microplaca estéril de 96 pocillos de fondo plano (Thermo Fisher, USA). Se añadió 100 uL de inóculo bacteriano de

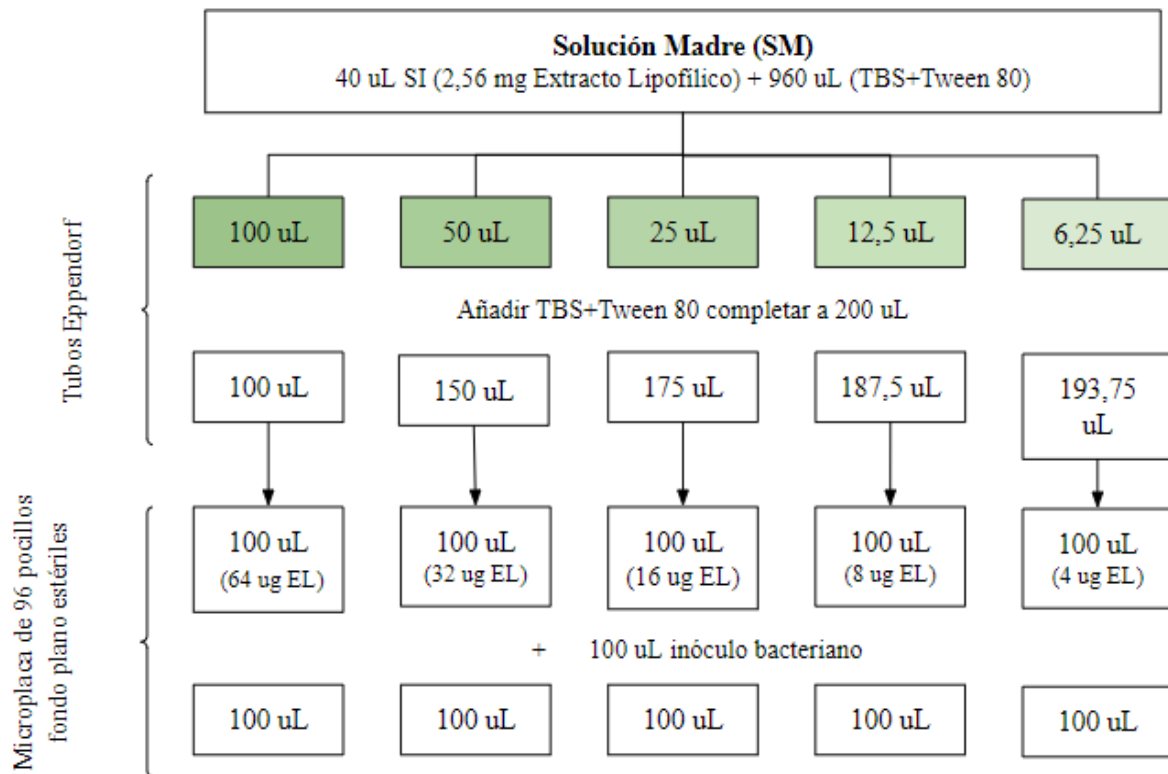
concentración de 1×10^5 UFC/mL. El control positivo (Inóculo + caldo) y negativo (Solo caldo) se colocaron en la primera columna, y el control de antibiótico en la columna final. Se incubó la microplaca por 22 horas a 37°C con homogeneización constante, tras el periodo de incubación, se añadieron 10 uL de MTT (2,5 mg/ mL en PBS) a cada pocillo y se incubó por 30 min a 37°C. Finalmente se realizó la lectura a 450 nm en el equipo BioTek Synergy H1 PLate Reader ELISA (Winooski, Estados Unidos). La **Figura 3** esquematiza este procedimiento.

La distribución de los extractos y controles en la microplaca de 96 pocillos se detalla en la **Fuente: Autores**

Tabla 5. Cada extracto lipofílico se identificó de acuerdo a la condición utilizada, por ejemplo, en la **Fuente: Autores**

Tabla 5 C1 hace referencia al extracto de *Desmodium molliculum* a condición de extracción a presión de 50 bar y co-solvente al 7%, C2 hace referencia de una presión de 50 bar y co-solvente al 8,5 % y C3 hace referencia de una presión de 50 bar y co-solvente al 10 %. Este procedimiento, anteriormente detallado, se realizó con cada una de las condiciones de extracción.

Figura 3: Esquema de pipeteo de extractos más inóculo bacteriano.



Fuente: Autores

Tabla 5

Distribución de extractos y controles en Microplaca de 96 pocillos fondo plano estériles.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control positivo ^a	C1 ^c	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	C1	Control de antibiótico ^d
B		C1	C1	C1	C1	C1						
C												
D		C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	
E	Control negativo ^b	C2	C2	C2	C2	C2						
F												
G		C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3	
H		C3	C3	C3	C3	C3						

^a **Control positivo:** Contiene caldo (TSB+DMSO+Tween 80) e inóculo bacteriano.

^b **Control negativo:** Contiene solo caldo (RSB+DMSO+Tween 80)

^c **C1:** Extracto lipofílico de *Desmodium molliculum*, de A1 a A6 en diluciones consecutivas.

^d **Control de antibiótico:** Diluciones consecutivas de Amikacina y Gentamicina.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Placas TLC

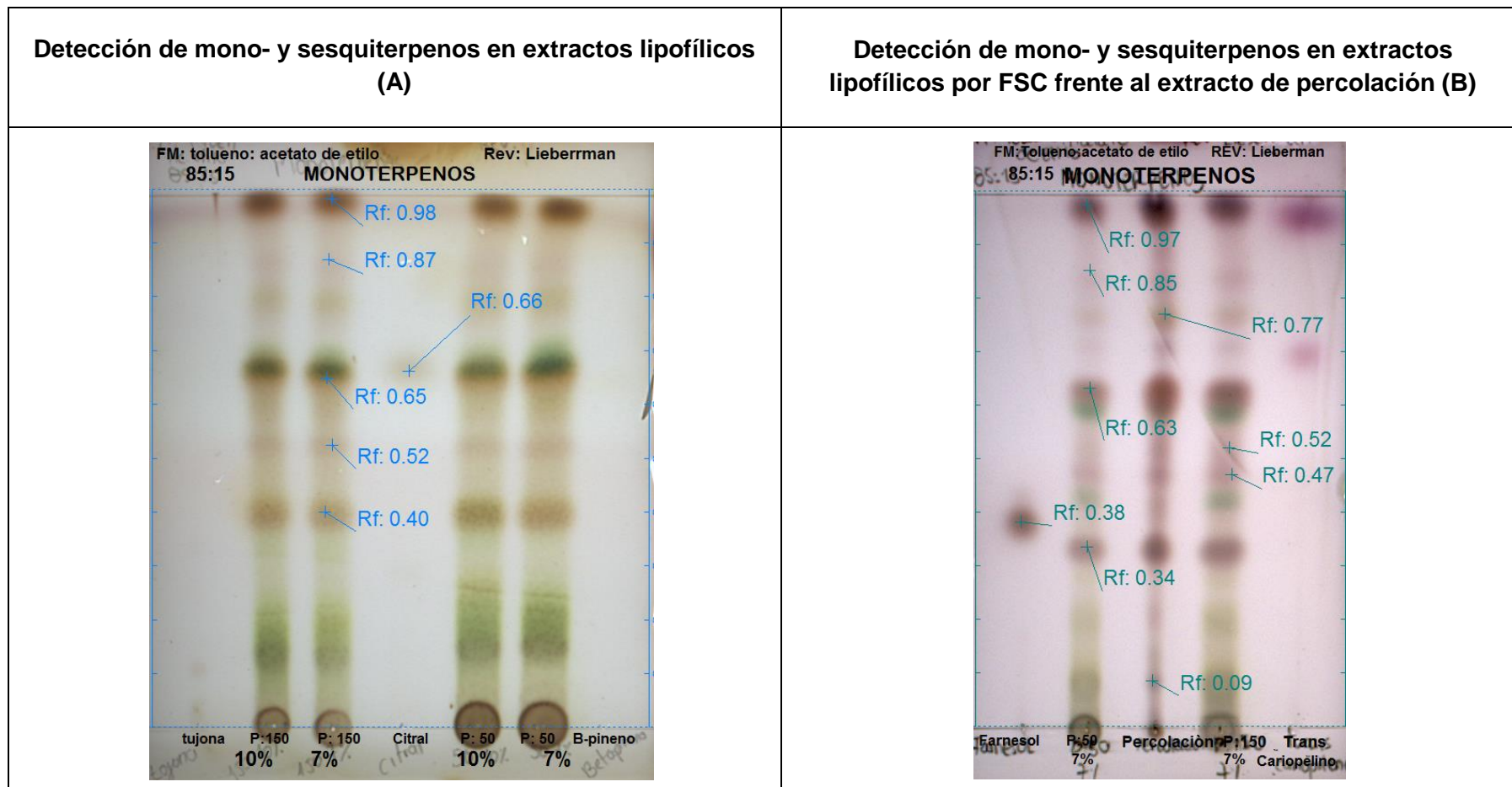
3.1.1. Mono-Sesquiterpenos

Los mono- y sesquiterpenos en UV-visible se observan de color marrón oscuro a gris débil y a λ 366 nm se observan de color arena o gris claro, usando el reactivo de Lieberman como revelador (Wagner et al., 1995). En la **Tabla 6 (A)** se evidencia distintas bandas de color marrón oscuro correspondiente a la placa cromatográfica de monoterpenos, lo que podría indicar la presencia de compuestos terpenoides en los extractos obtenidos a diferentes condiciones. Todas las condiciones 150/10%, 150/7%, 50/10%, 50/7% presentaron bandas con $R_f = 0.98, 0.87, 0.66, 0.52, 0.40$, además de coincidir el R_f de 0,66 con el citral. En la **Tabla 6 (B)** también se evidencian bandas cromatográficas que podrían indicar la presencia de monoterpenos, tanto en el extracto por FSC y el extracto por percolación con $R_f = 0.97, 0.85, 0.77, 0.63, 0.52, 0.47, 0.34, 0.09$. Se puede observar la mayor intensidad en la banda cromatográfica correspondiente a FSC en comparación a la percolación para la mayoría de analitos presentes como se observa en la Figura 5.

La **Tabla 7 (A)** muestra la evaluación de mono- y sesquiterpenos a λ 366 nm, se observa las bandas cromatográficas correspondientes a las condiciones 150/10%, 150/7%, 50/10%, 50/7% de color gris claro lo que podría indicar la presencia de compuestos terpenoides, todas las condiciones presentaron bandas cromatográficas con $R_f = 0.98, 0.87, 0.66, 0.52, 0.40$. La **Tabla 7 (B)** también se evidencian bandas cromatográficas que podrían indicar la presencia de monoterpenos, tanto en el extracto por FSC y el extracto por percolación con $R_f = 0.97, 0.71, 0.47, 0.38, 0.33$. Al igual que a luz visible, bajo UV, se pudo observar la presencia de mayor cantidad de analitos en los extractos correspondientes a la FSC.

Tabla 6

Resultados de placas TLC en UV-visible de mono- y sesquiterpenos.



Rf: Factor de retención, FM: Fase móvil, Rev: Revelador

* P: 150 y 50 se refieren a la condición de presión de CO₂ (bar); el porcentaje 7% y 10% se refiere a la cantidad de co-solvente (etanol).

Tabla 7

Resultados de placas TLC en λ 366 nm de mono- y sesquiterpenos.

Detección de mono- y sesquiterpenos en extractos lipofílicos (A)	Detección de mono- y sesquiterpenos en extractos lipofílicos por FSC frente al extracto de percolación (B)
<p>FM: tolueno: acetato de etilo 85:15 Rev: Liebermann MONOTERPENOS</p> <p>Rf: 0.98 Rf: 0.87 Rf: 0.66 Rf: 0.65 Rf: 0.52 Rf: 0.40</p> <p>Tujona P:150 10% P:150 7% Citral P:50 10% P:50 7% B-pineno</p>	<p>FM: Tolueno:acetato de etilo 85:15 REV: Lieberman MONOTERPENOS</p> <p>Rf: 0.97 Rf: 0.71 Rf: 0.47 Rf: 0.38 Rf: 0.33</p> <p>Farnesol P:50 7% Percolación P:150 7% Trans-Cariopelino</p>

Rf: Factor de retención, FM: Fase móvil, Rev: Revelador

* P: 150 y 50 se refieren a la condición de presión de CO₂ (bar); el porcentaje 7% y 10% se refiere a la cantidad de co-solvente (etanol)

3.1.2. Triterpenos

Los triterpenos en UV-visible se observan de color azul-violeta y rojo -violeta usando Anisaldehído/ácido sulfúrico como revelador (Wagner et al., 1995). La **Tabla 8 (A)** presenta la evaluación de triterpenos de los extractos lipofílicos en la placa cromatográfica de las condiciones 150/10%, 150/7%, 50/10%, 50/7% con bandas de color azul violeta correspondiente a los Rf: 0.56, 0.47 y 0,21. La **Tabla 8 (B)** también se evidencian bandas cromatográficas que podrían indicar la presencia de triterpenos, tanto en el extracto por FSC y el extracto por percolación con Rf= 0.77, 0.60, 0.53, 0.41, 0.14. Además, los Rf= 0.50, 0.53 y 0.77 coinciden tanto en percolación con FSC, aunque con algunas con mayor intensidad en percolación y otras las separadas en FSC, sin embargo, en estas condiciones se vuelve a observar una mayor cantidad de bandas cromatográficas en los extractos de FSC.

Tabla 8

Resultados de placas TLC en UV-visible de triterpenos.

Detección de triterpenos en extractos lipofílicos (A)	Detección de triterpenos en extractos lipofílicos por FSC frente al extracto de percolación (B)
<p>FM: Tolueno: Cloroformo: Etanol 40:40:10 TRITERPENOS Rev: Anisaldehido H₂SO₄</p> <p>Rf: 0.56 Rf: 0.47 Rf: 0.21 Rf: 0.06</p> <p>Escina P:150 10% P:150 7% Aloin P:50 10% P:50 7% Rhein</p>	<p>FM: Tolueno: Cloroformo: Etanol 40:40:10 TRITERPENOS REV: Anisaldehido H₂SO₄</p> <p>Rf: 0.57 Rf: 0.60 Rf: 0.53 Rf: 0.41 Rf: 0.14 Rf: 0.77</p> <p>A. Oleanolico P:50 Percolación 7% P:150 Percolación 7% Asiaticoside</p>

Rf: Factor de retención, **FM:** Fase móvil, **Rev:** Revelador

* **P: 150 y 50** se refieren a la condición de presión de CO₂ (bar); **el porcentaje 7% y 10%** se refiere a la cantidad de co-solvente (etanol).

3.1.3. Fosfolípidos

Cuando se revela la placa cromatográfica con yodo sublimado las bandas se observan de color café o amarillo oscuro que pueden indicar la presencia de compuestos con insaturaciones en su estructura. Al utilizar solución reveladora de molibdato de amonio, se observan bandas de color azul oscuro principalmente en compuestos que tienen en su estructura residuos de fósforo (Cuzco, 2015). No se tiene evidencia fotográfica de las placas cromatográficas, pero, en el revelado con yodo se observaron bandas de color café y amarillo oscuro correspondiente a los Rf de 0.90 en todas las condiciones 150/10%, 150/7%, 50/10%, 50/7% incluidas los patrones de Ácido oleico y Lecitina lo que indicaría que hay fosfolípidos presentes en el extracto lipofílico, además los Rf de 0.83, 0.77 y 0.56 también presentan coloración amarilla oscura para todas las condiciones. En la placa cromatográfica revelada con molibdato de amonio no se observan bandas de color azul oscuro.

3.2. *Actividad antibacteriana*

Se obtuvieron 10 condiciones de análisis para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos lipofílicos de *Desmodium molliculum* por la técnica de microdilución en caldo.

3.2.1. *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 y *Salmonella* Typhimurium cepa ATCC 14028

Los extractos lipofílicos de *Desmodium molliculum* obtenidos por FSC y por percolación con hexano, evaluados mediante técnica microdilución en caldo para determinar su actividad antibacteriana no demostraron actividad frente a *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Los valores de IC50 y IC90 se reportaron como mayores a la concentración usada, se presentan a continuación.

Tabla 9

Actividad antibacteriana frente a E. coli y S. Typhimurium expresada como IC50 e IC 90.

Condiciones de extracción por FSC *	IC 50	IC 90	
P: 50/ Co 7%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 50/ Co 8,5%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 50/ Co 10%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 100/ Co 7%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 100/ Co 8,5%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 100/ Co 10%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 150/ Co 7%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 150/ Co 8,5%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
P: 150/ Co 10%	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO
Condición de extracción	IC 50	IC 90	
Percolación	> 64 ug/mL	> 64 ug/mL	INACTIVO

* **P:** condiciones de presión 150, 100 y 50 bar; **%:** porcentaje de co- solvente a 7, 8.5 y 10 %.

La familia de las *Fabaceae* agrupa géneros con cantidades importantes de compuestos terpenoides, muchos de ellos han demostrado ser los responsables de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Los mono-sesquiterpenos de los extractos lipofílicos analizados, pertenecientes a este grupo y visualizados por TLC, presentaron coloración correspondiente a la información dada por Wagner y sus colaboradores (1995), donde indican que los mono-sesquiterpenos presentan bandas cromatográficas de coloración marrón oscuro a gris ya sea observados en Visible o en λ 366 nm. El análisis de los triterpenos muestra una cantidad menor, sólo dos bandas de coloración azul-violeta característico de estos compuestos. Sin embargo, las bandas de coloración verde olivo o gris azulada en las dos placas (mono-sesquiterpenos y triterpenos) indican que *Desmodium molliculum* si presenta cantidades significativas de terpenoides en general. Además, por el mismo método se observó la presencia de fosfolípidos en la especie vegetal puesto que son moléculas abundantes en la membrana de las células vegetales y cumplen funciones biológicas importantes para el funcionamiento.

Con el fin de mejorar el rendimiento de extracción y comparar si hay un cambio al modificar variables en la técnica por FSC, se aumentó la presión de CO₂ y el % de co-solvente. Fornari (2012) describe que la extracción por FSC permite el ajuste de condiciones para mejorar el rendimiento extractivo sobre todo para obtener extractos tanto con características polares como apolares, es decir una mezcla de compuestos que constituyen un extracto lipofílico. Pereira y Meireles (2010) también indican que para compuestos de naturaleza lipofílica se podría aumentar la presión gradualmente desde 100 hasta 400 bar, pero, tomando en cuenta que al aumentar la presión también se pueden extraer compuestos que a la larga pueden ser interferentes: como las ceras, pigmentos o clorofilas. Por lo tanto, en este trabajo experimental solo se aumentó la presión hasta 150 bar. Sin embargo, la modificación de dichas variables no evidencia cambios significativos en la composición de los extractos obtenidos a presión de 50 bar y la presión 150 bar; tampoco hay cambios al aumentar el % de etanol (co-solvente); esto se demuestra visualmente por la técnica de TLC.

La extracción por percolación se usó como técnica tradicional en comparación con FSC; mediante el análisis en TLC se evidenció mayor cantidad de bandas cromatográficas o analitos en las placas, así como, también una mayor intensidad en los extractos obtenidos por FSC en general. Si bien, el método cromatográfico utilizado no es cuantitativo, si permitió detectar esta diferencia. Además, al disminuir la presión de extracción en FSC, estas bandas cromatográficas tendieron a ser más débiles, o incluso a desaparecer en comparación con los extractos obtenidos por percolación (Román et al., 2016).

Algunos estudios realizados sobre especies del género *Desmodium* demuestran propiedades antibacterianas y antifúngicas, es así que Kofogoue y colaboradores (2022) describe la actividad antibacteriana a partir de extractos metanólicos de *Desmodium uncinatum* resultando ser moderadamente activos contra *E. coli* y *S. aureus*. También, Borchardt y sus colaboradores (2008) en el estudio titulado “Actividad antimicrobiana de plantas nativas de Minnesota y Wisconsin” demostraron a *Desmodium illinoense* como potencialmente activo contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Sin embargo, otros estudios no publicados en los que analizaron extractos etanólicos y metanólicos de *Desmodium molliculum* no demostraron ser activos, por tal razón, se buscó como alternativa extraer compuestos de carácter lipofílico, ya que esta propiedad está asociada a causar efectos sobre la membrana y pared bacteriana que podría provocar la muerte o inhibición de las mismas.

El enfoque principal de esta investigación fue evaluar si *Desmodium molliculum* presenta actividad antibacteriana mediante la técnica de microdilución en caldo, técnica que permite determinar la CIM del extracto analizado (Eloff, 2019). Si bien hay varias investigaciones sobre la susceptibilidad que tiene *E. coli* ATCC 25922 y *S. Typhimurium* ATCC 14028 frente a extractos vegetales, es importante mencionar que en su mayoría se debe a los metabolitos presentes en aceites esenciales de dichas plantas, pues debido a la hidrofobicidad les permite difundirse a través de la membrana lipídica y alterarla (Nazzaro et al., 2013). Sin embargo, los extractos lipofílicos de la especie vegetal analizada no demostraron actividad a ninguna de las concentraciones recomendadas por la CLSI (2020).

Varios factores podrían haber limitado el objetivo de esta investigación, errores sistemáticos y autónomos, o factores propios de la composición de la especie vegetal, por ejemplo, gran cantidad de pigmento o el posible contenido de compuestos resinosos que no facilitaron la manipulación adecuada del extracto. Sin embargo, es importante rescatar que el método por FSC ofrece ventajas considerables frente a métodos tradicionales, es un método innovador en virtud sus propiedades no tóxicas, inertes, económicas y amigables con el medio ambiente, es así, que ha ganado relevancia durante las últimas décadas como tecnología prometedora en varios campos, especialmente en la industria farmacéutica.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Finalizado este trabajo de titulación se puede concluir que:

Los extractos lipofílicos de *Desmodium molliculum* obtenidos por fluidos supercríticos, evaluados mediante la técnica de microdilución en caldo, no presentaron potencial antibacteriano frente a las especies *E. coli* cepa ATCC 25922 y *S. Typhimurium* cepa ATCC 14028.

La modificación de las variables de presión y co-solvente no presentó un efecto observable en relación a la actividad biológica evaluada en el presente trabajo. Puede ser necesario ampliar los rangos estudiados, fundamentalmente en lo relacionado a la presión utilizada.

La técnica de cromatografía en capa fina, demostró que el método de extracción por FSC es más eficiente que el método por percolación con hexano para la extracción de mayor cantidad de analitos de la matriz natural, además, al ser un método limpio que no implica la utilización de solventes, nos permite concluir su mayor valía frente al método tradicional, a pesar de no obtener resultados respecto a la actividad biológica.

4.2. Recomendaciones

- Para conseguir optimizar el rendimiento, se debe tomar en cuenta el modificar otras variables como el número de ciclos dinámicos y estáticos lo que facilita mayor saturación de la droga.
- Ampliar el rango de estudio respecto a la presión a ser utilizada para la extracción
- Continuar estudiando de la familia de las *fabáceas* y el género *Desmodium* especialmente, si bien no presentan actividad antibacteriana, presentan diversos metabolitos secundarios que le dan otras propiedades farmacológicas importantes con grandes capacidades terapéuticas.

- A pesar que se identificó los metabolitos secundarios mediante TLC es importante realizar el análisis por HPLC de los extractos lipofílicos para tener una estimación exacta en cuanto a su composición cualicuantitativa.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, Z., Puglla, C., & Merino, B. (2014). Plantas medicinales de la zona andina de la provincia de Loja. *Herbario y Jardín Botánico "Reinado Espinosa"*.
- Apurba, S., & Sandhya, B. (2019). *Essentials of Medical Microbiology* (Second Edition). JAYPEE BROTHERS MEMDICAL PUBLISHERS.
- Barreto, D., & Bonilla, P. (2017). Secondary metabolites in ethanolic extract of leaves of *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. (Manayupa). *Ciencia e investigación UNMSM*, 20(1), 3-8.
- Bello, A., & Dingle, T. C. (2018). What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Newsletter*, 40(20), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.10.001>
- CDC. (2019). *Questions and Answers | Salmonella | CDC*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>
- Eloff, J. N. (2019). Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2519-3>
- Fica, C. (2014). Resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos, cocáceas Gram positivas y anaerobios. implicancias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 432–444. [https://doi.org/10.1016/s0716-8640\(14\)70060-4](https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70060-4)
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, M. R., & Reglero, G. (2012). Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1250, 34–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.051>
- Guerrero, P., Galán, F., Gutiérrez, D., & Guerrero, I. (2014). Enterobacteriaceae infections. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(55), 3276-3282. [doi:doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70768-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70768-1)
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Kloei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1), 1-7. [doi:10.15171/JHP.2018.01](https://doi.org/10.15171/JHP.2018.01)

- Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E. (2020). *Microbiología médica* (28 ed.). México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Knez, Ž., Pantić, M., Cör, D., Novak, Z., & Hrnčič, M. (2019). Are supercritical fluids solvents for the future? *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 141(107532). doi:doi.org/10.1016/j.cep.2019.107532
- Kofogoue, A. C., Tchinda, C. F., Mbaveng, A. T., & Kuete, V. (2022). Antibacterial and antibiotic-potentiating activities of *Desmodium uncinatum*, *Neoboutonia glabrescens*, *Ternstroemia cameroonensis* and eight other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant bacteria expressing active efflux pumps. *Investigational Medicinal Chemistry and Pharmacology*, 5(1), 1–16. <https://doi.org/10.31183/imcp.2022.00062>,
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones Omega.
- Kumar, A., & Chordia, N. (2017). Bacterial Resistance Against Antibiotics. *Drug Resistance in Bacteria, Fungi, Malaria, and Cance. Springer, Cham*, 171-192. doi:doi.org/10.1007/978-3-319-48683-3_7
- Manjare, D., & Dhingra, K. (2019). Supercritical fluids in separation and purification: A review. *Materials Science for Energy Technologies*, 2(3), 463-484. doi:doi.org/10.1016/j.mset.2019.04.005
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., Coppola, R., & de Feo, V. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Olascuagua, K., Rubio, S., Valdiviezo, J., & Blanco, C. (2020). *Desmodium molliculum* (Kunth) DC (Fabaceae); Perfil etnobotánico, fitoquímico y farmacológico de una planta andina peruana. *Ethnobotany Research and Applications*, 19(14), 1-13. doi:dx.doi.org/10.32859/era.19.19.1-13

- OMS. (2015). *Un informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria*. Obtenido de WHO/ World Health Organization: <https://www.who.int/es/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- OMS. (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Partridge, S. R. (2015). Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology*, 47(3), 276–284. <https://doi.org/10.1097/pat.0000000000000237>
- Pereira, C., & Meireles, M. (2009). Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 340–372. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>
- Scalia, S., Giuffreda, L., & Pallado, P. (1999). Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21(3), 549–558. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(99\)00152-1](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(99)00152-1)
- SEIMC, (2019). Procedimientos en Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(10), 685. (número 14b, 2.a edición 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.10.001>
- Rathor, L. (2021). Medicinal Plants: A Rich Source of Bioactive Molecules Used in Drug Development. *Evidence Based Validation of Traditional Medicines*, 195–209. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8127-4_10
- Rodríguez Pava, C. N., Zarate Sanabria, A. G., & Sánchez Leal, L. C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *Nova*, 15(27), 119. <https://doi.org/10.22490/24629448.1963>
- Rueda, E., Juvera, J., Romo, I., & Holguín, R. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia*

solanacearum. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 20.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v0i20.995>

Ryu, S. H., Park, S. G., Choi, S. M., Hwang, Y. O., Ham, H. J., Kim, S. U., Lee, Y. K., Kim, M. S., Park, G. Y., Kim, K. S., & Chae, Y. Z. (2012). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 152(1–2), 14–18.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003>

Varela, Z., Lavallo, L., & Alvarado, D. (s.f.). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
[doi:doi.org/10.14482/sun.32.1.8598](https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598)

Wang, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., & Yue, M. (2019). Antibiotic Resistance in *Salmonella* Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00985>

Wagner, H., Blatt, S., & Zgainski, E. M. (1995). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (Segunda ed., Vol. 1). Springer.

Wikaningtyas, P., & Sukandar, E. (2016). The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(1), 16-19. [doi:10.1016/j.apjtb.2015.08.003](https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.08.003)

Yadav, D., Jhariya, M., Sinha, R., & Kumar, A. (2015). Documentation and ethnobotanical importance of medicinal plants found in Sarguja District. *Journal of Plant Development Sciences (An International Monthly Refereed Research Journal)*, 7(5), 439-446.
Obtenido de <http://jpds.co.in/wp-content/uploads/2014/03/Vol.-7-5.pdf#page=69>

Yousefi, M., Rahimi-Nasrabadi, M., Pourmortazavi, S., Wysokowski, M., Jesionowski, T., . . . Mirsadeghi, S. (2019). Supercritical fluid extraction of essential oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 192-193. [doi:doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.038)

Zhang, H., Zhou, W., Wang, J., & Cai, Y. (2021). Efficacy and safety of oritavancin for the treatment of acute bacterial skin and skin-structure infections: a systematic review and

meta-analysis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25, 380–389.

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.04.013>