

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE
ELCHE**

INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

**Caracterización analítica y funcional
de extractos con actividad
antimicrobiana obtenidos de plantas
del género *Cistus***

Tesis Doctoral

Laura Tomás Menor

Elche (Alicante), 2015



“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico, es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie





Dr. Antonio Ferrer Montiel, Director del *Instituto de Biología Molecular y Celular* de la Universidad Miguel Hernández.

DA SU CONFORMIDAD a la lectura de la Tesis Doctoral titulada: “Caracterización analítica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del género *Cistus*”, presentada por Dña. Laura Tomás Menor para optar al grado de Doctora, la cual ha sido realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Para que conste los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche (Alicante), a de de 2015.

Fdo. Dr.



Dr. Vicente Micol Molina, Catedrático de la Universidad Miguel Hernández en Bioquímica y Biología Molecular y **Dr. Enrique Barraji3n Catal3n**, Profesor Asociado de la Universidad Miguel Hern3ndez del departamento de Ingenier3a, 3rea de Farmacia y Tecnolog3a Farmac3utica.

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigaci3n que conduce a la obtenci3n del grado de Doctora: "Caracterizaci3n anal3tica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del g3nero *Cistus*" que es autora D3a. Laura Tom3s Menor ha sido realizado bajo su direcci3n en el Instituto de Biolog3a Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hern3ndez de Elche.

Para que consten los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche

(Alicante) a de de 2015.

Dr. Vicente Micol Molina

Dr. Enrique Barraji3n Catal3n

RESUMEN

La familia *Cistaceae*, conocida vulgarmente como “jaras”, comprende unas 150 especies que forman parte importante del ecosistema mediterráneo. En el presente trabajo se han estudiado cuatro de las especies más abundantes de esta familia localizadas en el territorio español (*Cistus salviifolius*, *C. clusii*, *C. albidus* y *C. ladanifer*), las cuales fueron recolectadas y utilizadas para la obtención de un total de catorce extractos a través de diversos métodos de extracción sólido-líquido, fraccionamiento mediante cromatografía líquida y métodos de secado. Tras un análisis de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos modelo, *E. coli* y *S. aureus*, y del contenido polifenólico de los mismos se seleccionaron aquellos extractos que presentaron la máxima capacidad antimicrobiana, así como un alto contenido polifenólico y un buen rendimiento de extracción.

Esta selección ha permitido identificar la potencialidad como antimicrobiano del extracto acuoso de *C. salviifolius*, el cual fue caracterizado por HPLC acoplado a espectrometría de masas identificando un total de 48 compuestos polifenólicos entre los que destacaron los elagitaninos y los flavonoles. Se realizó una selección de aquellos compuestos puros más abundantes en el extracto para abordar el estudio de los posibles efectos sinérgicos entre estos compuestos mediante la construcción del isoblograma a partir de las curvas dosis-efecto de los compuestos individuales, encontrando, por primera vez, varias combinaciones sinérgicas entre ácido elágico, punicalagina y derivados de flavonoles, interacciones que podrían explicar la potente actividad antimicrobiana del extracto.

Posteriormente, se realizó un análisis cinético de la evolución del crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* en presencia de varios extractos vegetales con el objetivo de encontrar un agente antimicrobiano de amplio espectro. Los resultados muestran que la inhibición de *S. aureus* estaría asociada con la presencia de elagitaninos, ácido elágico y flavonoles, probablemente glicosilados, y la inhibición de *E. coli* se correspondería más con la presencia de flavonoles, no encontrando extractos eficaces contra el hongo levaduriforme *C. albicans*. Por último, mediante la utilización de membranas modelo de *E. coli* y de *S. aureus*, se ha encontrado que el ácido elágico y las punicalaginas tienen un efecto directo desestabilizador de las membranas bacterianas mientras el mecanismo de acción de los flavonoles parece estar menos relacionado con este aspecto.

En conclusión, los resultados obtenidos en la presente memoria podrían sentar las bases para el diseño de nuevos agentes antisépticos para dermocosmética o incluso productos sanitarios frente a cepas clínicas hospitalarias patogénicas de *S. aureus* como MRSA.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio forma parte del Proyecto **PROMETEO/2012/007** denominado: **“Aumento de la actividad biológica y biodisponibilidad celular de polifenoles bioactivos mediante la utilización de nanopartículas”**, llevado a cabo en el Departamento de Biología Molecular y Celular con la colaboración de Aránzazu Morales del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, Olaf Tyc del Instituto Holandés de Ecología (NIOO-KNAW) (Wageningen, Netherlands) y Juan Carlos Rodríguez Jefe de microbiología y parasitología del Hospital General Universitario de Alicante.

Quiero expresar mi gratitud a los Doctores y directores de la presente Tesis, Vicente Micol y Enrique Barrajón, por abrirme las puertas del laboratorio, permitirme la formación a este nivel de trabajo y poder comprobar de primera mano la capacidad que tienen ciertos compuestos naturales en la prevención de enfermedades.

A las empresas Monteloeder S.L y Endemich Biotech S.L, por aportar los extractos vegetales empleados en este trabajo y la materia prima para la realización de los mismos, además de aportarme algunos conocimientos de botánica y de etnofarmacología, respectivamente.

Y como no, acordarme de todas aquellas personas que han formado parte y que forman parte del Instituto de Biología Molecular y Celular, tanto a los técnicos, becarios como personas de otros grupos de investigación que me han apoyado y ayudado desinteresadamente, además de otras tantas personas que no me pongo a nombrar para no olvidarme de nadie. Gracias por enriquecerme diariamente en estos años de formación, tanto de forma directa como indirecta, lo cual, me ha hecho crecer personalmente y a nivel investigador.

En este apartado también quiero mencionar el apoyo inestimable de la familia, ya que sin su cariño, estímulo y comprensión, este trabajo tampoco hubiera sido posible.

Elche, 2015

Laura Tomás Menor

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral ha dado lugar a varios artículos científicos y una solicitud de patente de invención sobre la combinación sinérgica de polifenoles con actividad antibiótica frente a cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Los trabajos resultantes hasta la actualidad, se citan a continuación y en el ANEXO II se adjuntan los documentos al completo para que puedan ser consultados con más detenimiento.

1. Artículos publicados

TÍTULO: Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species

AUTORES (p.o. de firma): **LAURA TOMÁS-MENOR**, Aránzazu Morales-Soto, Enrique Barraji3n-Catal3n, Cristina Rold3n-Segura, Antonio Segura-Carretero, Vicente Micol.

REFERENCIA REVISTA: Food and chemical toxicology 55 (2013) 313-322

Índice de impacto: 3,210

TÍTULO: The promiscuous and synergic molecular interaction of polyphenols in bactericidal activity: an opportunity to improve the performance of antibiotics?

AUTORES (p.o. de firma): **LAURA TOMÁS-MENOR**, Enrique Barraji3n-Catal3n, Antonio Segura-Carretero, Nuria Mart3, Domingo Saura, Jorge Joven, Javier A. Men3ndez, Vicente Micol (the Bioactive Food Components Platform).

REFERENCIA REVISTA: Phytotherapy Res 29 (2015) 446-473

Índice de impacto: 2,397

TÍTULO: Phytochemicals in essential oil and extracts derived from Rockroses (*Cistus*) plants: Characterization and uses. Essential Oils in Food Production, Preservation, Flavour and Safety.

AUTORES (p.o. de firma): Enrique Barraji3n-Catal3n, Aránzazu Morales-Soto, **LAURA TOMÁS-MENOR**, Nuria Mart3 Bru3a, Domingo Saura L3pez, Antonio Segura-Carretero, Vicente Micol.

REFERENCIA LIBRO: Aceptado, pendiente de publicaci3n. Elsevier, 2015.

2. Artículos pendientes de publicación

TÍTULO: Microbial kinetics assays tested by AlamarBlue® from various extracts plants with different main compounds.

AUTORES (p.o. de firma): **LAURA TOMÁS-MENOR**, Olaf Tyc, Paolina Garbeva, Enrique Barraji3n-Catal3n, Vicente Micol.

REFERENCIA REVISTA: Redactando actualmente el art3culo

TÍTULO: Interaction study of the *Cistus salvifolius* main polyphenolic compounds in bacterial model membranes

AUTORES (p.o. de firma): **LAURA TOMÁS-MENOR**, Enrique Barraji3n-Catal3n, Vicente Micol.

REFERENCIA REVISTA: Redactando actualmente el art3culo

3. Solicitud de patente Espa3ola

T3tulo de la invenci3n: Combinaci3n sin3rgica de polifenoles con actividad antibi3tica eficaz frente a cepas de bacterias resistentes a antibi3ticos (**Nº de solicitud:** P201301181)

AUTORES: **LAURA TOMÁS MENOR**, Enrique Barraji3n Catal3n, Juan Carlos Rodr3guez D3az, Mar3a Aznar Cerd3n, Vicente Micol Molina, Manuel Valero Roche, Salud Vegara G3mez, Domingo Saura L3pez, Nuria Mart3 Bru3a, Jorge Joven Maried, Javier Men3ndez Men3ndez, Antonio Segura Carretero.



ÍNDICE



I. Introducción	1
I.1. La problemática actual de la resistencia antibiótica.....	3
I.2. El reino vegetal como alternativa para la generación de nuevos antimicrobianos.....	6
I.3. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica.....	8
<i>I.3.1 Dilución en caldo.....</i>	10
<i>I.3.2 Dilución en agar.....</i>	11
<i>I.3.3 Difusión en disco.....</i>	12
I.4. Avances recientes en el cribado de productos naturales como antimicrobianos.....	14
I.5. Estudios de interacción sinérgica.....	15
I.6. Clasificación y estructura de los compuestos polifenólicos.....	18
I.7. Identificación de los compuestos polifenólicos y cuantificación de los mismos	24
I.8. Los polifenoles como antimicrobianos.....	37
I.9. Papel de la interacción de los polifenoles con las membranas biológicas.....	39
<i>I.9.1 Composición lipídica de la membrana.....</i>	41
<i>I.9.2 Organización y dinámica de las biomembranas.....</i>	42

I.9.3 Fluidez de la membrana y orden lipídico.....	43
I.9.4 Sistemas modelo de membrana	45
I.9.5 Técnicas utilizadas para el estudio de las membranas biológicas.....	47
I.10. Plantas del género <i>Cistus</i>	51

II. Hipótesis de partida y objetivos.....59

III. Material y métodos.....65

III.1. Recolección de plantas y preparación de muestras.....	67
III.2. Obtención de los extractos y fraccionamiento	67
III.3. Identificación de los compuestos por cromatografía.....	69
III.3.1 Determinación de compuestos fenólicos de las diferentes muestras de <i>Cistáceas</i> por RRLC-ESI-TOF-MS.....	69
III.3.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios del mejor extracto analizado.....	70
III.4. Determinación de fenoles totales y de flavonoides.....	72
III.5. Determinación de la capacidad antioxidante.....	73

<i>II.5.1</i> Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox.(Ensayo TEAC).....	75
<i>II.5.2</i> Método FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER).....	76
<i>II.5.3</i> Método ORAC (OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY).....	77
<i>II.5.4</i> Método TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES).....	78
III.6. Determinación de la capacidad antimicrobiana.....	80
<i>III.6.1</i> Ensayos de sinergia.....	82
<i>III.6.2</i> Ensayos de cinética bacteriana.....	84
III.7. Estudio de interacción de fitoquímicos con sistemas modelo de membranas.....	86
<i>III.7.1</i> Análisis cuantitativo de la concentración lipídica.....	86
<i>III.7.2</i> Preparación de liposomas	86
<i>III.7.3</i> Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	87
<i>III.7.4</i> Ensayo de liberación de contenidos	88
<i>III.7.5</i> Coeficiente de partición.....	88
<i>III.7.6</i> Tamaño de partícula.....	89
IV. Resultados.....	93

CAPÍTULO PRIMERO

Correlación entre la actividad antibacteriana y la composición de los extractos derivados de diversas especies de *Cistus* localizadas en España.....95

IVa.1. Actividad antibacteriana y cuantificación de polifenoles.....96

IVa.2. Análisis semicuantitativo de la composición de extractos de *Cistus* usando RRLC-ESI-TOF-MS y correlación con la actividad antibacteriana.....98

IVa.3. Estudio de la actividad antibacteriana y antioxidante de la fracción polifenólica del extracto de *C.salviifolius* y estudio de la influencia de la estacionalidad en su composición103

IVa.4. Estudio en detalle de la composición de los extractos acuosos de *C. salviifolius* utilizando RRLC-ESI-TOF-MS.....106

CAPÍTULO SEGUNDO

Actividad sinérgica antimicrobiana frente a *S. aureus* de los principales polifenoles derivados de *C. salviifolius*.....113

IVb.1. Cuantificación de los polifenoles de *C. salviifolius* S2a y elección de los compuestos para los estudios de sinergia.....115

IVb.2. Estudio isoblográfico del efecto sinérgico de los polifenoles seleccionados derivados del extracto S2a de *C. salviifolius*.....118

CAPÍTULO TERCERO

Ensayos de cinética bacteriana.....127

IVc.1. Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano.....129

<i>IVc.2.</i> Análisis de la composición de los extractos analizados por HPLC-DAD-MS/MS.....	137
<i>IVc.3</i> Correlación entre la composición polifenólica de los extractos y la cinética observada.....	139

CAPÍTULO CUARTO

Interacción de los compuestos principales del extracto de <i>C. salviifolius</i> en membranas modelo bacterianas.....	145
<i>IVd.1</i> Efecto de diferentes tampones en el tamaño de partícula.....	147
<i>IVd.2.</i> Efecto de los principales compuestos de <i>C. salviifolius</i> sobre el comportamiento termotrópico en membranas modelo bacterianas.....	149
<i>IVd.3.</i> Afinidad de los diferentes compuestos polifenólicos por la membrana.....	153
<i>IVd.4.</i> Permeabilización de vesículas formadas por lípidos de MSA y <i>E. coli</i> mediante compuestos polifenólicos.....	156

V. Discusión.....161

VI. Conclusiones.....177

Bibliografía.....185

**Anexo I: resultados
preliminares.....211**

**Anexo II: artículos científicos derivados
de la presente tesis
doctoral.....223**



ABREVIATURAS

AE, ácido elálgico;

A1, extracto de *Cistus albidus* acuoso/liofilización;

A2, extracto de *Cistus albidus* acuoso/SDY;

A3, extracto de *Cistus albidus* hidroalcohólico/SDY;

AAPH, 2,2-azo bis-(2-amidino propano) dihidrocloruro;

ABTS, 2,2,-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato);

AH, entalpía de transición (cantidad de energía absorbida para el cambio de fase);

APD, siglas en inglés para el detector de fotodiodo de avalancha;

AUC, siglas en inglés de área bajo la curva;

BHT, butil hidroxi tolueno;

C1, extracto de *Cistus clusii* acuoso/liofilización;

C2, extracto de *Cistus clusii* acuoso/SDY;

C3, extracto de *Cistus clusii* hidroalcohólico/SDY;

Ca⁺⁺, calcio;

CBM, concentración mínima bactericida;

CF, carboxifluoresceína;

CIM₅₀, concentración mínima inhibitoria requerida para reducir el crecimiento de la población microbiana al 50%;

CL, cardiolipina;

DAD, siglas en inglés de diode array detector;

DLS, siglas en inglés para el estudio de la dispersión de luz dinámica;

DMSO, dimetil sulfóxido;

DO, densidad óptica;

DSC, siglas en inglés de calorimetría diferencial de barrido;

dw, siglas en inglés de peso seco;

ECDC, siglas en inglés para el European Centre for Disease Prevention and Control;

Abreviaturas

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético;

EMA, siglas en inglés para la Agencia Europea del Medicamento;

ESCMID, siglas en inglés para la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases;

ESI, siglas en inglés de ionización por electrospray;

EUCAST, siglas en inglés para el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing;

EYPC, lecitina natural de yema de huevo;

FICI, siglas en inglés para el índice de concentración inhibitoria fraccionada;

FL, fluoresceína;

FRAP, siglas en inglés sobre la capacidad reductora férrica;

FT, siglas en inglés para la fracción no retenida durante el proceso de purificación de un extracto;

(g), tiempo de duplicación microbiana;

GAE, siglas en inglés para los equivalentes de ácido gálico;

gr, gramos;

h, hora;

HA, *Hibiscus arnottianus*;

HEPES, ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico;

HHDP, ácido hidroxidifénico;

HPLC, siglas en inglés de High performance liquid chromatography;

HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS, cromatografía líquida de alta resolución con un detector diodo-array acoplado a un electrospray por trampa de iones para determinar la masa;

HR, *Hypoxis rooperi*;

HS, *Hibiscus sabdariffa*;

HSP, extracto purificado polifenólico de *Hibiscus sabdariffa*;

INT, reactivo de p-violeta yodonitrotetrazolio;

IT, siglas en inglés para la trampa de iones;

(k), crecimiento microbiano durante la fase exponencial;

Abreviaturas

KM, Kanamicina;

Kp, coeficiente de partición;

L0, fase líquido-ordenada;

L1, extracto de *Cistus ladanifer* acuoso/liofilización;

L2, extracto de *Cistus ladanifer* acuoso/SDY;

L2P, extracto de *Cistus ladanifer* acuoso purificado;

L3, extracto de *Cistus ladanifer* hidroalcohólico/SDY;

LALLS, siglas en inglés para el “Low Angle Laser Light Scattering”;

LB, medio general de crecimiento bacteriano (Luria Broth);

LC 10, *Lippia citriodora* (10% verbascósido);

LC 32, *Lippia citriodora* (32% verbascósido);

L-DPPG, dipalmitoilfosfatidiglicerol;

Log10, logaritmo en base 10;

LUVs, vesículas lipídicas unilamelares grandes;

L α , fase líquido-cristalina o fluida;

L β , fase gel;

M, miricetina;

m/z, relación masa/carga;

MeOH, metanol;

Mg⁺⁺, magnesio;

Min, minutos;

MLVs, vesículas lipídicas multilamelares;

MRSA, *Staphylococcus aureus* meticilin resistente;

MS, masa;

MS/MS, fragmentación de iones moleculares;

MSSA, *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina ;

NCCLS, siglas en inglés del *Commitee for Clinical Laboratory Standard*;

NE, valor no encontrado;

nm, nanómetros;

Abreviaturas

OMS, Organización Mundial de la Salud;

ORAC, siglas en inglés sobre la capacidad de captación de radicales peroxilo;

P, punicalagina;

p/v, relación peso/volumen;

PBP2a, proteína de unión a penicilina 2a;

PBS, tampón fosfato salino;

PC, fosfatidilcolina;

PCS, siglas en inglés de espectroscopia de correlación de fotones;

PDA, siglas en inglés de photodiode array;

PE, fosfatidiletanolamina;

PG, fosfatidilglicerol;

PI, fosfatidilinositol;

Po/a, coeficiente de partición octanol/agua;

PS, fosfatidilserina;

Q, quercetina aglicona;

Q3G, quercetina-3-glucoside;

RRLC, siglas en inglés para la cromatografía líquida de rápida resolución;

RRLC-ESI-TOF-MS/MS, cromatografía líquida de rápida resolución acoplada a un electrospray para determinar la masa con tiempo de vuelo;

s, segundo;

S1, extracto de *Cistus salviifolius* acuoso/liofilización;

S2, extracto de *Cistus salviifolius* acuoso/SDY;

S2a, extracto de *Cistus salviifolius* acuoso purificado;

S2b, extracto de la fracción no retenida durante la purificación del *Cistus salviifolius* acuoso purificado;

S3, extracto de *Cistus salviifolius* hidroalcohólico/SDY;

S4, extracto de *Cistus salviifolius* acuoso/SDY (recolectado en agosto);

SDY, siglas en inglés para el secado por spray drying o atomización;

SFM, esfingomiélna;

Abreviaturas

SUVs, vesículas lipídicas unilamelares pequeñas;

TBARS, siglas en inglés para las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico;

Tc, temperatura de transición;

TE, siglas en inglés de equivalentes de Trolox®;

TEAC, siglas en inglés sobre la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox®;

Tm, temperatura de transición de fase gel a líquido cristalino;

TOF, siglas en inglés para analizadores de tiempo de vuelo;

TR, tiempo de retención;

UFC, unidades formadoras de colonias;

URF, unidades relativas de fluorescencia;

UV-Vis, ultravioleta-visible;

v/v, relación volumen/ volumen;

w/w, siglas en inglés para una relación peso/peso;

YEPD, medio de cultivo con los requerimientos específicos para hongos (Yeast extract peptone dextrose).





I. Introducción

I.1. La problemática actual de la resistencia antibiótica

La presencia de nuevos compuestos o combinaciones de compuestos con actividad antibiótica que finalmente llegan a la clínica ha sufrido un claro estancamiento. Si se observa el descubrimiento de las diferentes familias de antibióticos a lo largo de los años (figura 1), se puede comprobar como las principales familias fueron descubiertas en el siglo pasado. Si bien es cierto, a comienzos del presente siglo todavía surgieron las familias de lipopéptidos y las oxazolidinonas, familias que cubrieron un hueco de 30 años con ausencia de nuevos tratamientos. No obstante, la generación de resistencias bacterianas como selección natural para resistir a estos tratamientos antibióticos convencionales, hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas con poder bacteriostático o bactericida.

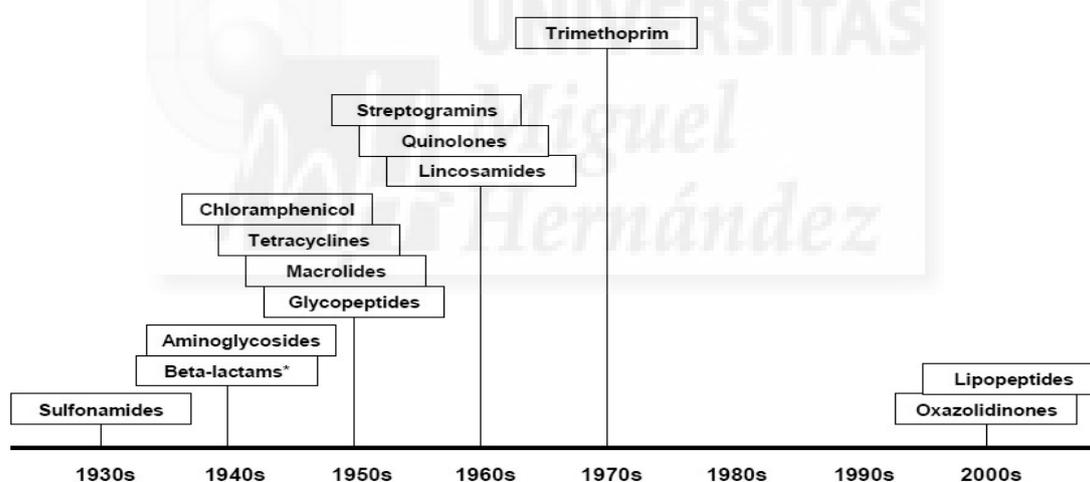


Figura 1. Fecha del descubrimiento de las diferentes familias de antibióticos que existen actualmente (ECDC, 2009).

El informe sobre “Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012” (ECDC, 2012), que recoge los datos de resistencia antibiótica durante el periodo comprendido entre los años 2009-2012 en 30 países de la UE, revela que existe una creciente tendencia al alza de resistencias antimicrobianas. Esta tendencia, se observa no sólo para los países que partían con porcentajes altos de resistencia en informes anteriores, sino también para los que tenían valores relativamente bajos.

Entre las resistencias a antibióticos más destacables en las bacterias Gram-negativas, se encuentran las resistencias a antibióticos beta-lactámicos, cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos.

En cuanto a las bacterias Gram-positivas, el patógeno principal causante de resistencias es el *Staphylococcus aureus meticilin resistente* (MRSA), que a pesar de que en los últimos 4 años ha reducido significativamente su población infectiva, sigue siendo una prioridad de salud pública capaz de inducir una gran variedad de infecciones, como la osteomielitis, endocarditis invasora, artritis séptica y septicemia, y cuyo impacto en Europa se sitúa por encima del 25% del recuento del total de cepas aisladas en pacientes hospitalarios, en siete de los 30 países muestreados con una media de 17,8% (figura 2).

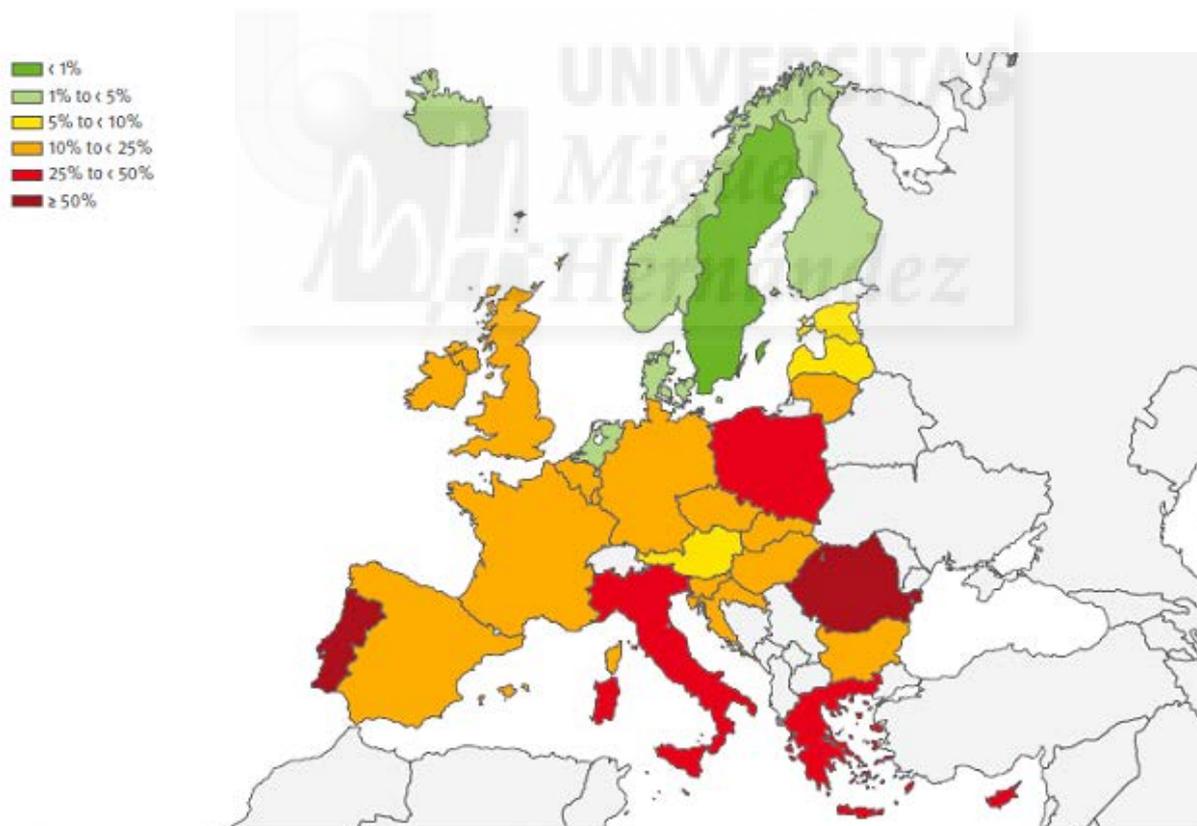


Figura 2. Porcentaje de cepas aisladas en pacientes hospitalarios con resistencia antibiótica a *Staphylococcus aureus* por país europeo. En rojo y naranja se observan las regiones más afectadas (ECDC, 2012).

Actualmente existe un antibiótico de elección para el tratamiento de cepas de MRSA, la clindamicina (antibiótico semi-sintético derivado del antibiótico natural lincomicina y cuyo mecanismo de acción es inhibir la síntesis de proteínas inhibiendo la translocación ribosomal). Aún así, este tratamiento es efectivo sólo para el 7,5% de los casos tratados.

El Staphylococcus aureus por tanto, queda situado entre una de las principales bacterias causantes de infecciones nosocomiales. Su forma resistente y más concretamente el *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), ha sido la más importante causa de infección antimicrobiana resistente asociada a problemas de salud en todo el mundo y que sigue sumando un gran número de enfermos afectados en hospitales (ECDC, 2012).

Según informes de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), el gasto sanitario adicional provocado por los microorganismos resistentes a antibióticos, excede el billón y medio de euros en Europa (Unión Europea más Noruega e Islandia) (ECDC, 2009). Además, las infecciones por MRSA pueden prolongar la estancia hospitalaria en el mejor de los casos y en un alto porcentaje causar mortalidad, debido principalmente a un retraso en la iniciación de la terapia y sobre todo a un ineficaz tratamiento. Debido a esto, es actualmente el patógeno resistente identificado con más frecuencia en hospitales de muchas partes del mundo, incluyendo no sólo a Europa, sino también América, África y el lejano Oriente.

Pero, ¿a qué se debe esta resistencia? *S. aureus* adquiere resistencia a la meticilina y al resto de antimicrobianos beta-lactámicos a través de la integración en el cromosoma bacteriano del gen *mecA* (exógeno a la bacteria). Dicho gen codifica la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a). El PBP2a, se encarga de catalizar la reacción de transpeptidación del peptidoglicano que permite la síntesis de la pared celular.

Sin embargo, y con la nueva incorporación en el cromosoma bacteriano del gen *mecA*, el PBP2a tendrá incapacidad para interactuar con antibióticos y por tanto, la bacteria será resistente favoreciendo la evolución de patógenos multirresistentes que proceden de la especie *S. aureus* y para los cuales como ya se ha comentado, existen tratamientos limitados (Crisostomo et al., 2001; Hiramatsu K et al., 1997; ECDC, 2002; Appelbaum et al., 2006)

Esta situación que supone un problema de relevancia clínica, sólo puede ser resuelta con terapias basadas en nuevos compuestos, siendo las plantas una posible solución.

I.2. El reino vegetal como alternativa para la generación de nuevos antimicrobianos

Encontrar propiedades curativas en las plantas es una idea de la fitoterapia de nuestros antepasados. Muchas personas en todos los continentes han aplicado cataplasmas y bebido infusiones de diferentes plantas autóctonas con el fin de tratar enfermedades, curar heridas o simplemente mejorar su salud.

Si nos remontamos a la prehistoria hay pruebas de que los neandertales que vivieron hace 60.000 años, utilizaban plantas como la malvarrosa para tratar insomnio, resfriados, estreñimiento o lesiones inflamatorias (Stübing G, 1998; Quer, 2005). Plantas que actualmente siguen siendo ampliamente utilizadas en la etnomedicina en todo el mundo.

No obstante, la mayoría de la población mundial utiliza en primer lugar la medicina convencional como tratamiento de salud. Esto es debido entre otros factores, a la falta de reconocimiento por parte de los profesionales sanitarios de la importancia del papel que puede llegar a desempeñar la “medicina tradicional” (Mathez-Stiefel et al., 2012; Bode M, 2013).

De hecho, la aceptación de la medicina complementaria y alternativa en las sociedades occidentales causa preocupación en relación con las dudas sobre su eficacia y seguridad (Tanaka et al., 2009). Preocupación añadida a que no existe una agencia normativa establecida para la evaluación de medicamentos a base de plantas tradicionales, especialmente en los países donde su uso es común y cualquier valor intrínseco de extractos de plantas con fines terapéuticos, no se basa en las percepciones modernas de eficacia y seguridad según lo determine un ensayo clínico controlado.

Con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2002), han habido numerosos intentos recientes para investigar la seguridad, eficacia y calidad de estos nuevos medicamentos utilizando enfoques basados en la evidencia. Pero tan sólo un número muy limitado de remedios a base de hierbas para el tratamiento de infecciones, han sido sometidos a la evaluación basada en la evidencia. Debido a esto, una evaluación más detallada de la eficacia antimicrobiana de las medicinas tradicionales, debe obviamente, llevarse a cabo antes de que tales mezclas a base de extractos de plantas puedan ser consideradas para el desarrollo de nuevas medicinas. De ese modo, se podrán evitar la comercialización de extractos de venta en farmacias, para los cuales existen dudas sobre su capacidad reclamada. Por ejemplo, Umckaloabo es un extracto de *Pelargonium sidoides* que se vende en las farmacias occidentales para el alivio de las infecciones respiratorias agudas y para el cual, existen dudas a partir de su evaluación crítica por la OMS sobre la capacidad para remitir los síntomas de la rinosinusitis aguda, sinusitis y resfriado común en adultos y la bronquitis aguda en adultos y niños (Timmer A et al., 2008).

A pesar de esta falta de normativa que regule la eficacia y seguridad de los productos naturales, estos productos, juegan actualmente un papel muy importante en el descubrimiento de fármacos y en su proceso de desarrollo, sobre todo en áreas específicas tales como cáncer y procesos infecciosos (tabla 1).

Tabla 1. Productos con actividad antiinfecciosa producidos durante los últimos 30 años agrupados por su fuente de origen. El 33,7% de los productos que existen actualmente en el mercado son de origen natural, siendo el 29,3% de éstos realizados a partir de una modificación semi-sintética (David J et al, 2012).

Indicación	Total	B	N	ND	S	S*	V
Antibacteriano	118		10	67	26	1	14
Antifúngico	29	1		3	25		
Antiparasitario	14		2	5	4	2	1
Antiviral	109	14		4	11	33	47
Total	270	15	12	79	66	36	62
Porcentaje	100	5.6	4.4	29.3	23.8	13.3	23

(B) Biológica; por lo general péptido de 45 residuos o proteína, bien aisladas de un organismo / línea celular o producidos por medios biotecnológicos en un huésped sustitutivo;

(N) Producto natural;

(ND) Modificación semi-sintética derivada de un producto natural;

(S) productos totalmente sintéticos;

(S*) hecho por síntesis pero el farmacóforo es de un producto natural;

(V) Vacunas.

Cuando se empieza con el estudio de bioactividad de extractos naturales, es difícil prever cómo un extracto o compuesto podría llegar a desarrollarse como una fuente terapéutica para infecciones microbianas, pero sí se pueden describir las características de un antibiótico perfecto, que es lo que se va a buscar de esa fuente terapéutica.

Un antibiótico debería ser efectivo si posee una alta toxicidad selectiva, con una potente actividad en concentraciones alcanzables contra bacterias diana y efectos mínimos sobre el anfitrión. Además, debe tener estabilidad química y física después de la formulación para cumplir con la especificación farmacéutica y buena biodisponibilidad cuando se administra por la ruta elegida, con un perfil farmacocinético adecuado y, a ser posible, no dar lugar fácilmente a variantes resistentes.

I.3. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica.

Dentro de los beneficios que presenta se encuentran:

- Dirigir la terapéutica una vez que el germen es conocido.
- Generar una base de datos que permita seleccionar los antibióticos a utilizar en un tratamiento empírico (aquel en que no conocemos el agente causal).
- Desarrollar políticas de uso de antimicrobianos.
- Vigilar la aparición de nuevos mecanismos de resistencia.
- Detectar precozmente la diseminación epidémica de una cepa, tanto a nivel hospitalario como comunitario.

La determinación de la sensibilidad antibiótica, no sólo implica realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen. Los parámetros que determinan los resultados de sensibilidad o resistencia, cada vez más, involucran información proveniente de ambos lados: el paciente y el microorganismo.

Los métodos para el estudio de sensibilidad antibiótica se dividen en métodos cuantitativos y métodos cualitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar mediante la expresión de los resultados en $\mu\text{g}/\text{mL}$, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Se define a la CIM, como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de microorganismos). La CBM por otro lado, es la concentración a la cual un antibiótico en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada.

La determinación de estas concentraciones puede realizarse por dilución en caldo o dilución en agar. Si bien el método más utilizado en la práctica diaria es el de difusión en disco debido a que es un método sencillo, barato y de fácil estandarización.

El caldo Mueller-Hinton se suele recomendar como el medio preferido para todas estas pruebas de susceptibilidad de organismos comúnmente aislados, aeróbicos o facultativos de rápido crecimiento. No obstante, cualquier caldo con el contenido apropiado en cationes (Ca^{++} y Mg^{++}) puede ser utilizado ya que el contenido en estos iones asegura la reproducibilidad de los resultados (Murray et al., 2009).

I.3.1 Dilución en caldo

En el método de dilución en caldo (Vegara et al., 2011) se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Para ello, se procede a realizar un banco de diluciones seriadas con el antimicrobiano a testar utilizando un factor de dilución de 1/2. Serán necesarias tantas diluciones como concentraciones se quieran estudiar. De las diluciones preparadas, se añadirá 1 mL en un tubo con microorganismo en fase exponencial de crecimiento con un recuento de 10^5 UFC/ mL. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 mL de caldo. Los tubos se llevan a incubar y al día siguiente se observa la presencia de turbidez que indicará crecimiento microbiano. Por tanto, el CIM será la concentración más baja a partir de la cual no se observe turbidez. De este ensayo también se puede extraer la información de la CBM, que se realizará a partir de la siembra en agar de los tubos en los que no se observa crecimiento. Si en las placas incubadas no se observan colonias visibles, se obtiene la CBM del antimicrobiano ensayado (figura 3).

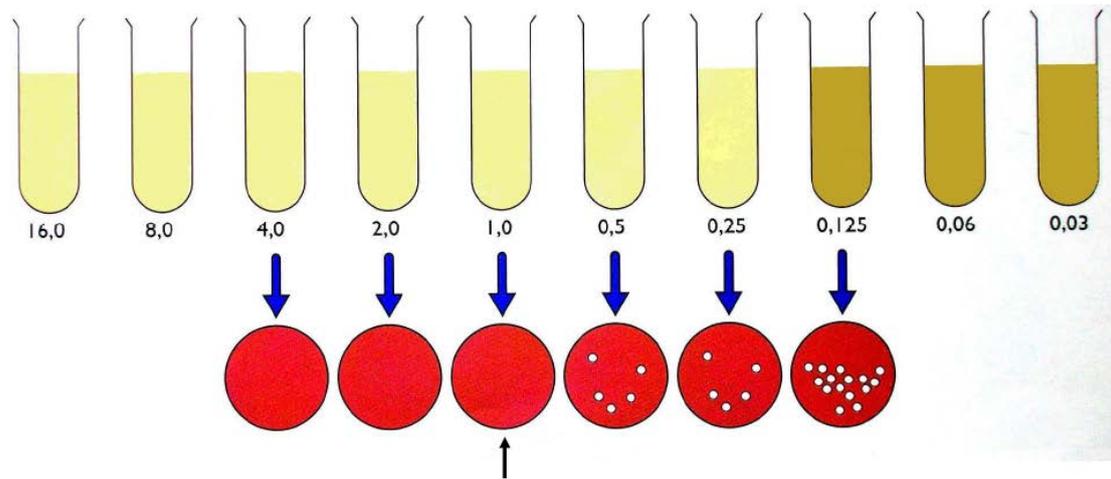
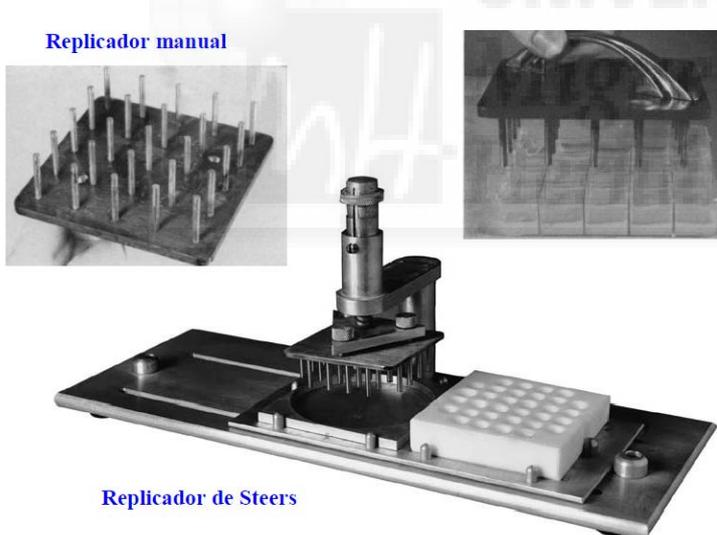


Figura 3. Ejemplo del procedimiento del ensayo de dilución en caldo. El antimicrobiano se prepara en diluciones con progresión geométrica en base 2. La inhibición del crecimiento microbiano, se determinará por la presencia de un precipitado blanco en los tubos. El CIM en este ejemplo se sitúa en 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la CBM en 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Murray et al., 2009).

I.3.2 Dilución en agar



En este método se incorpora el antimicrobiano que se quiere evaluar a un medio con agar. Dicha adición, se realiza cuando el medio de cultivo en forma de agar todavía está líquido.

Figura 4. Fotografías de 2 replicadores, uno manual y otro automático para el inóculo de bacterias en el agar (Murray et al., 2009)

Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas. Cada serie de placas tendrá una determinada concentración de antimicrobiano al que una vez solidificado el medio de cultivo, se procede a inocular las placas con un replicador (figura 4).

El número de placas de cada concentración vendrá dado por el número de microorganismos a estudiar. Para esto, se tendrá en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos. Además, es importante destacar que este procedimiento de análisis microbiano es un método de referencia para bacterias anaerobias.

I.3.3 Difusión en disco

El método de difusión de disco es un método cualitativo que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y por estar indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido.

Este método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos.

Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (figura 5).

No obstante, se debe tener en cuenta que esta técnica tiene limitaciones para ciertos casos que es desaconsejable utilizar:

- Microorganismos de desarrollo lento
- Microorganismos anaerobios
- Antibióticos de difusión lenta

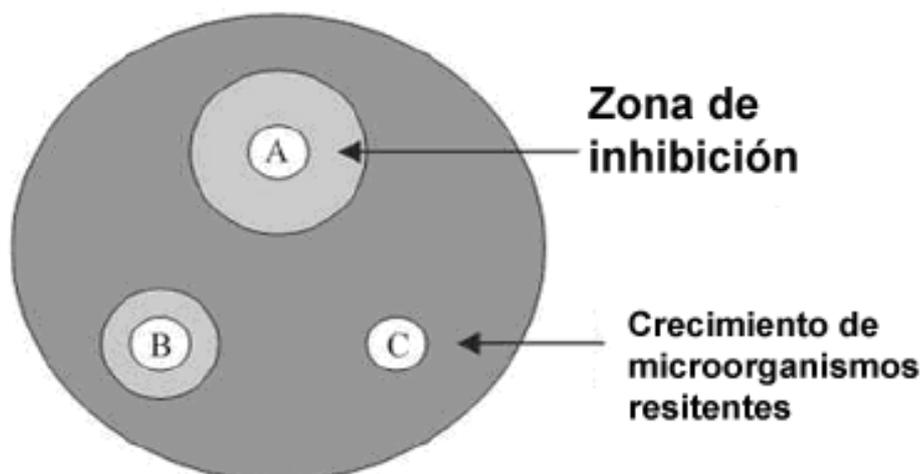


Figura 5. Representación gráfica del ensayo de difusión del disco en la que A, B y C son discos de papel de filtro, los círculos alrededor de A y B son zona de inhibición. La zona de color grisáceo más oscuro es donde se encuentra el agente microbiano.

Sin embargo, este método no permite una lectura directa del valor de la CIM. Debido a esto, el antibiograma por difusión de disco basado en el trabajo de Kirby Bauer es uno de los métodos que el *Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)* recomienda para que la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos tenga relevancia. De ese modo, se realiza una correlación con los resultados previos de la CIM mediante el método de dilución en caldo y utilizando un rango completo de 6-8 diluciones con el método de difusión de disco (Akiyama et al., 2001; Ahmad et al., 2007) (figura 6).

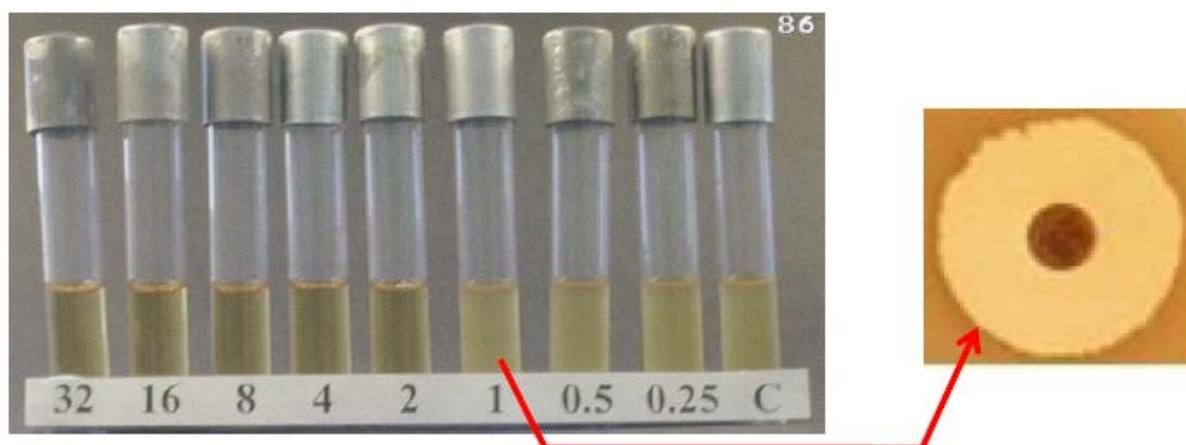


Figura 6. Test de Kirby Bauer que correlaciona el halo de inhibición observado con el método de difusión de disco y la concentración obtenida del CIM con el método de dilución en caldo.

Por regla general, un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan las cepas resistentes.

I.4. Avances recientes en el cribado de productos naturales como antimicrobianos

Muchos estudios han puesto de manifiesto la poca precisión de los ensayos de difusión en disco, que es el tradicionalmente utilizado para detectar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas.

La base del ensayo de la microplaca de 96 pocillos (figura 7) es correlacionar el crecimiento bacteriano con el efecto inhibitor de los extractos, siendo un método capaz de aumentar la precisión y el rendimiento ya que



Figura 7. Siembra con multicanal para la técnica de microdilución en caldo con lectura automatizada.

tiene una alta reproducibilidad (Tomás-Menor et al., 2013; Laporta et al., 2007; Barraión-Catalán et al., 2010).

El punto más importante del ensayo de la microplaca es la elección de la disolución adecuada del extracto para que no precipite en el pocillo. Después de tener las concentraciones adecuadas, la placa se coloca en una incubadora a 37 ° C y se incuba durante 22 h después de leer la DO (densidad óptica) en el espectrofotómetro a 540 nm. Este ensayo es muy sensible ya que se expone una concentración más baja de extractos que el utilizado para las placas de agar, a una concentración más alta de inhibición de células bacterianas. De ese modo, se maximiza el potencial de detectar un antimicrobiano eficaz.

Además, con este método se pueden realizar predicciones del crecimiento bacteriano en presencia de los extractos. Así, se puede obtener no sólo la concentración del CIM, sino también modelos cinéticos (figura 8) para dar respuestas al tiempo de generación y duración de la fase de crecimiento exponencial (Lisa A Collins et al., 1997; Vanitha JD et al., 2004), tal y como se ha realizado en el presente trabajo.

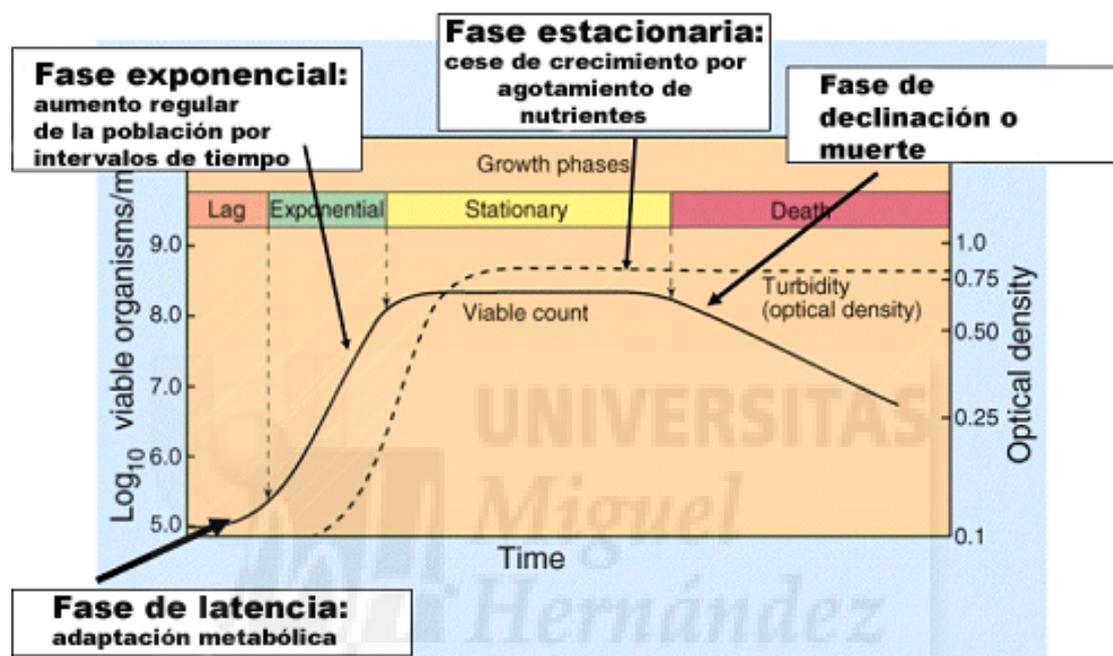


Figura 8. Curva de crecimiento microbiano que representa las propiedades de un microorganismo y que son dependientes de la fase de la curva en que se encuentren. En la fase exponencial se realizan los estudios de tiempo de duplicación microbiana en presencia de antibióticos (Ilse Valderrama Heller, 2008)

I.5. Estudios de interacción sinérgica

Para el estudio de la sinergia entre compuestos de una misma planta existen diferentes técnicas, desde el estudio de los halos de inhibición del crecimiento (figura 9) al uso del método del isobolol (figura 10). Estos métodos de estudio son semicuantitativos para el primer caso y cualitativos para el segundo. No obstante, existe uno que es totalmente cuantitativo y que permite la comparación entre las diferentes mezclas mediante un cálculo matemático, el método FICI (Índice de Concentración Inhibitoria Fraccionada).

Este método está descrito por el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) de la European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (EUCAST, 2000).

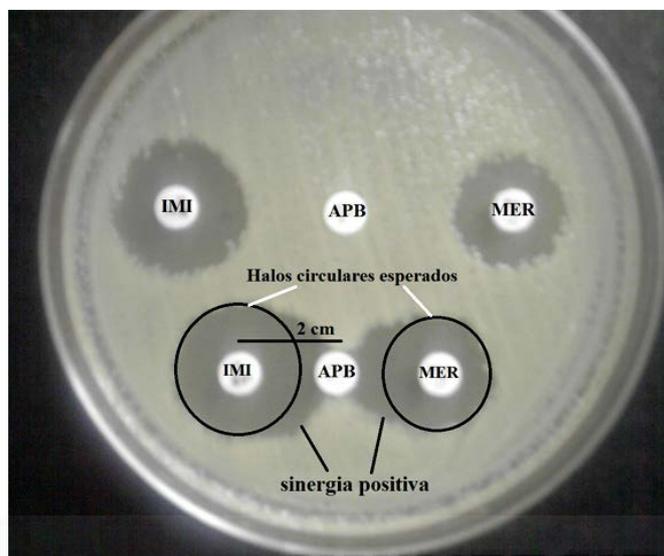


Figura 9. Efecto sinérgico frente a la cepa *Klebsiella pneumoniae* entre el disco de la cefalosporina ácido fenilborónico (APB) y los β -lactámicos: imipenem (IMI) y meropenem (MER). El efecto sinérgico, se observa al colocar los discos a una distancia de 2 cm (con respecto al centro). Se han marcado con círculos negros los halos de inhibición circulares que se esperaban por separado, para facilitar su observación. En la parte superior de la fotografía se muestra cómo el efecto sinérgico deja de apreciarse al alejar los discos (Nicola, F. G., et al 2012)

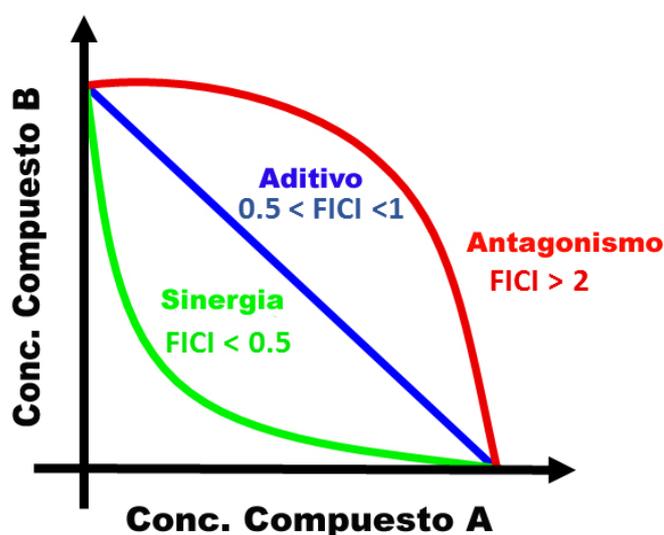


Figura 10. Método visual que representa la interacción de la concentración antimicrobiana entre 2 compuestos y que se puede contrastar con el método cuantitativo FICI. La sinergia se observa mediante la formación de una línea cóncava. Este método se describe en (Wagner, 2011) y (EUCAST, 2000).

El interés de este cálculo radica en que se otorga un valor numérico que es comparado con valores estándar reconocidos por organismos oficiales europeos (tabla 2), y de ese modo, permite comparar los resultados obtenidos de actividad sinérgica de un modo más objetivo.

En este sentido, cuando una combinación entre 2 compuestos a distintas proporciones se compara, se obtendrá un valor sinérgico cuanto menor sea el valor de FICI, proporcionando una actividad antimicrobiana más potente que la que ejercían los 2 compuestos por separado.

Por tanto, la proporción entre los compuestos en las mezclas sinérgicas es crucial y puede explicar la actividad antimicrobiana que provoca un extracto.

Índice	Sinergia	Aditividad	Indiferencia	Antagonismo
FICI	≤ 0.5	$> 0.5-1$	> 1 a < 2	≥ 2

Tabla 2. Valores proporcionados por EUCAST para el índice FICI en función del tipo de interacción existente entre los componentes de una mezcla concreta (EUCAST, 2000).

El estudio de las interacciones sinérgicas entre los compuestos principales que constituyen extractos vegetales son de vital importancia en fitofármacos, de ese modo se puede explicar tanto la disminución de actividad con el aislamiento de un sólo ingrediente activo, como explicar la eficacia de la dosis de constituyentes activos. Estos estudios de interacción sinérgica se documentan para los constituyentes dentro de un extracto de una sola planta o bien para comprobar la combinación de 2 plantas entre sí en una formulación.

Entre los compuestos más estudiados actualmente se encuentran los caracterizados de la *Curcuma longa* (cúrcuma), *Propolis* (propóleo), *Crocus sativus* (azafrán), *Camellia sinensis* (té), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Commiphora molmol* (mirra), *Allium sativu* (ajo), *Melissa officinalis* (melisa), entre otras menos conocidas como la *Salvia chamelaeagnea* y *Leonotis leonurus* (cola de león) (Gordon M et al., 2013; Hussin W. A et al., 2011; Kamatou G.P.P et al., 2006).

Estos compuestos están formados en gran parte por un grupo de sustancias químicas biosintetizadas por las plantas y que gracias a su estructura cargada de grupos hidroxilo (-OH) le confieren gran capacidad antioxidante, además de otras actividades biológicas potencialmente beneficiosas para la salud.

I.6. Clasificación y estructura de los compuestos polifenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal con más de 8000 estructuras conocidas (Wollgast & Anklam, 2000).

Son principalmente productos derivados del metabolismo secundario de las plantas que se forman a partir de las rutas metabólicas de los fenilpropanoides y del ácido siquímico (figura 11) (Shetty & McCue, 2003; Ververidis et al., 2007).

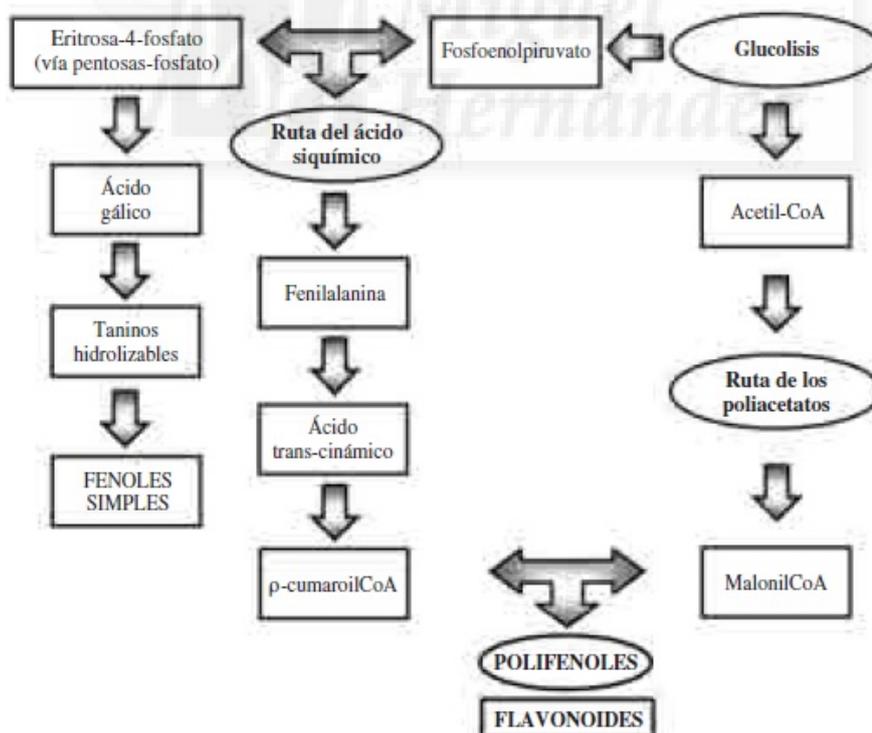


Figura 11. Esquema simplificado de la biosíntesis de los polifenoles en las plantas que tiene lugar a través de 2 vías importantes: La ruta del ácido siquímico que proporciona la síntesis de los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) y la ruta de los poliacetatos proporciona las quinonas y las xantonas. Existen rutas mixtas que combinan precursores de ambas rutas y que dan lugar a los flavonoides (M Quiñones et al., 2012).

Se caracterizan por presentar uno o más núcleos aromáticos sustituidos, como mínimo con una función hidroxilo que les confiere la propiedad de donar átomos de hidrógeno. Esta cualidad, les permite actuar como antioxidantes y desempeñar importantes funciones fisiológicas en los vegetales (Lindsay & Astley, 2002).

Las funciones más características de estos compuestos son el establecimiento de relaciones químicas de las plantas con el entorno que les rodea, insectos, vertebrados y microorganismos.

Los compuestos fenólicos, se generan durante el desarrollo normal de la planta, pero el contenido en algunos de ellos puede incrementarse bajo condiciones de estrés como por ejemplo la radiación UV, infección por patógenos o parásitos, contaminación del aire y exposición a temperaturas extremas.

Estos compuestos fenólicos de la planta incluyen los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y los menos frecuentes estilbenos y lignanos. Además, pueden poseer glicosilaciones en los grupos hidroxilo de las posiciones 3, 5 y 7 de la cadena carbonada. Una forma de heterósido frecuente en la naturaleza (figura 12).

Los azúcares más comunes que podemos encontrar son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa.

De los compuestos polifenólicos que nos podemos encontrar en la naturaleza, los flavonoides son los polifenoles más abundantes en

nuestra dieta. Los flavonoides están estructurados básicamente por un núcleo flavano, que contiene 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos.

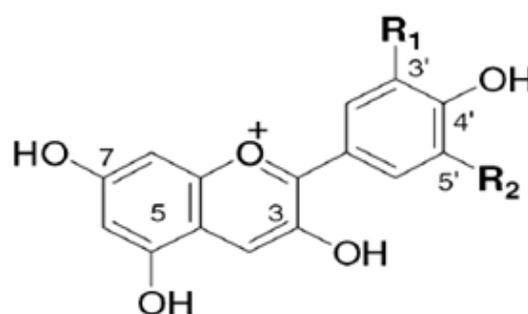


Figura 12. Ejemplo de estructura de un polifenol

Esta familia de compuestos, se encuentra a su vez, dividida en seis subgrupos dependiendo del estado de oxidación del anillo central: flavonas, flavanoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas y antocianos (figura 13). La variación estructural en cada subgrupo se debe en parte, al grado y al patrón de hidroxilación, metoxilación, prenilación, o glicosilación.

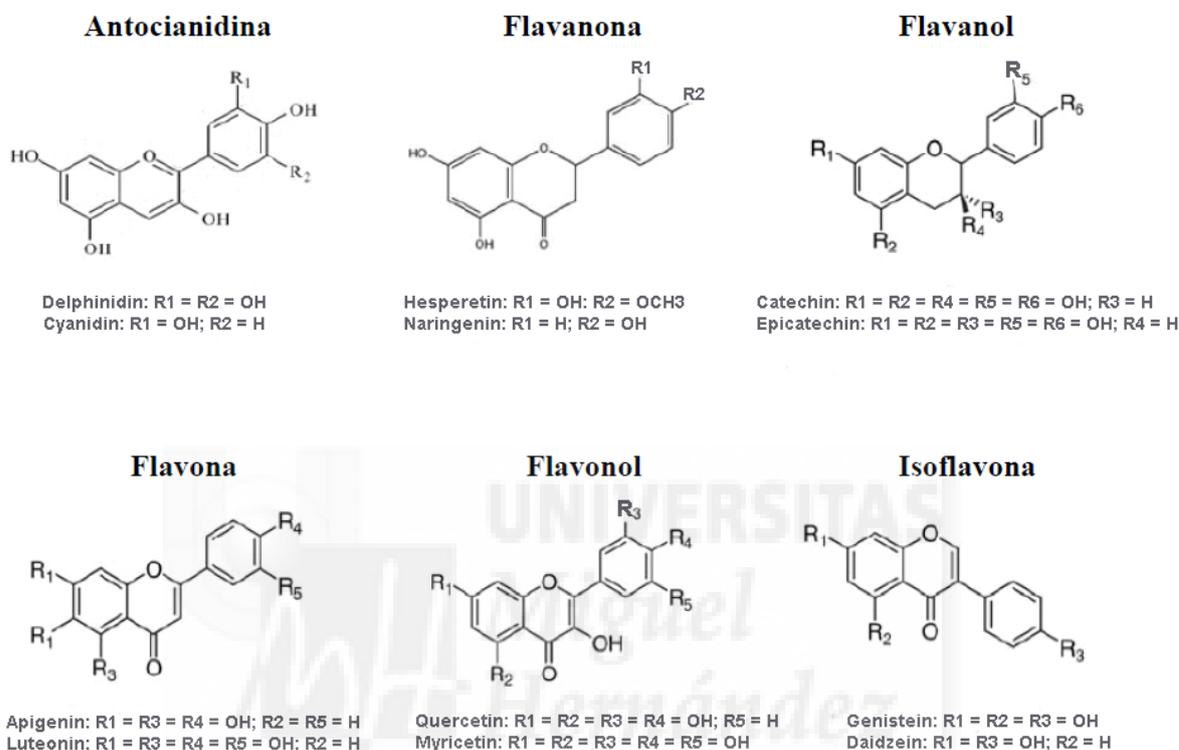


Figura 13. Estructura de las principales familias de flavonoides

Algunos de los flavonoides más comunes incluyen quercetina, un flavonol abundante en la cebolla, el brócoli y la manzana; catequina, un flavonoide presente en el té y varias frutas, naringenina, la flavanona principal de pomelo; cianidina-glucósido, un antociano abundante en las frutas de bayas (grosellero negro, frambuesa, mora, etc...) y la granada, y la daidzeína, genisteína y la gliciteína, las principales isoflavonas de la soja (figura 14)

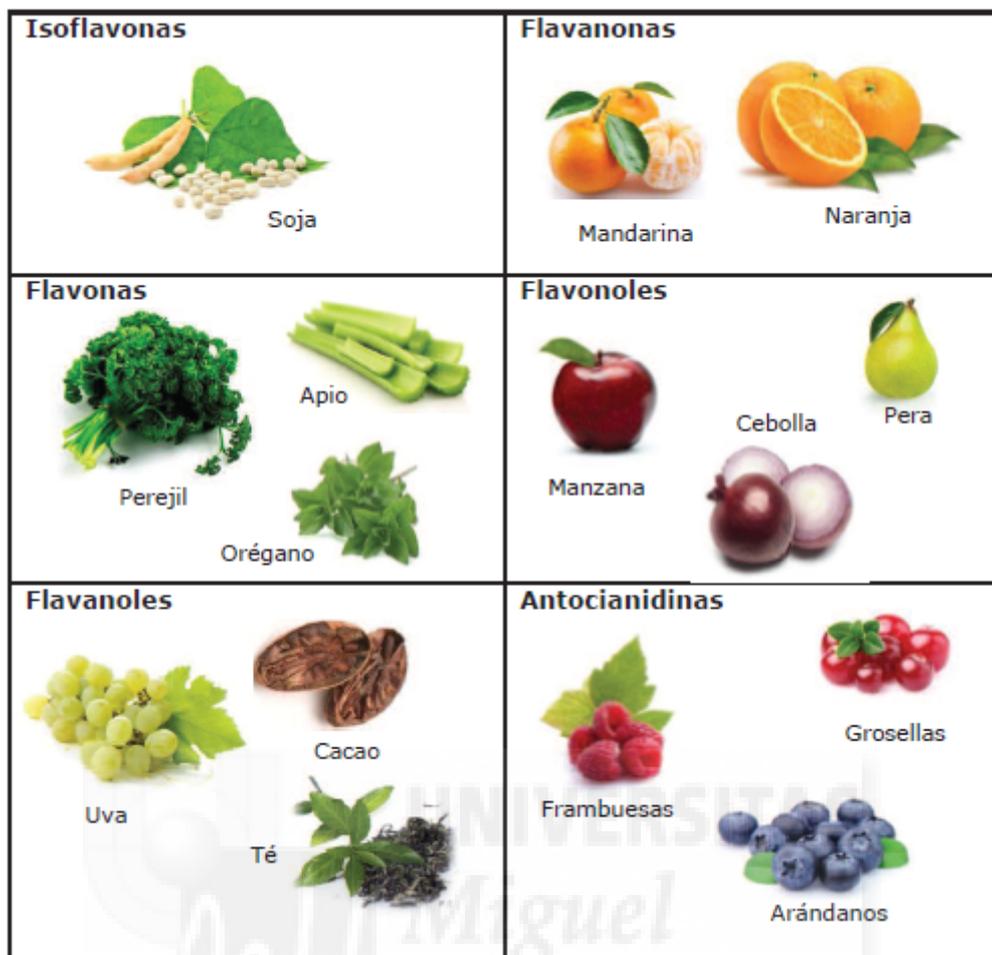


Figura 14. Especies vegetales ricas en flavonoides

Los taninos son otro grupo importante de polifenoles en nuestra dieta y por lo general se subdividen en dos grupos: (1) taninos hidrolizables y (2) taninos condensados.

Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos y en particular el ácido gálico con azúcares simples. Los elagitaninos son una clase diversa de taninos hidrolizables, con diversas cantidades de ácido hexahidroxidifénico (HHDP), que se forma por acoplamiento oxidativo de 2 moléculas de ácido gálico. Los elagitaninos difieren de los galotaninos, en que sus grupos galoil se unen a través de enlaces C-C, mientras que los grupos galoil en los galotaninos están unidos por dépsidos (enlaces éster) (figura 15). Dentro de los elagitaninos nos podemos encontrar con un compuesto mayoritario, la punicalagina.

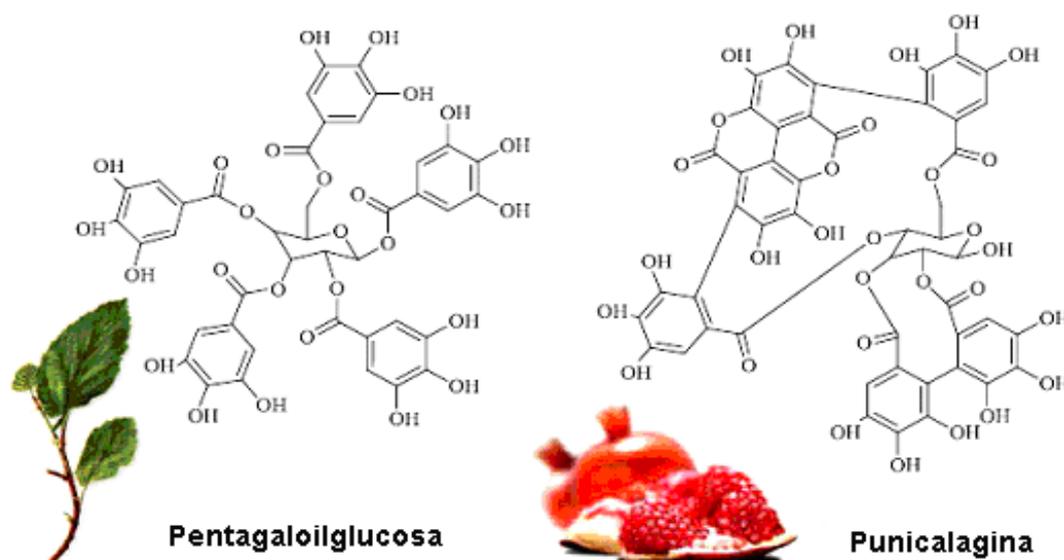


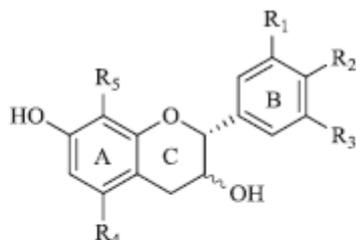
Figura 15. Estructura química de la pentagaloilglucosa (galotanino) presente en *Hamamelis virginiana* (avellano de bruja) y punicalagina (elagitanino) presente en *Punica granatum* (granada).

Estos taninos hidrolizables pueden dar estructuras secundarias debido a que el HHDP forma diésteres con azúcares, generalmente β -D-glucosa o ácido quínico (Madrigal-Carballo et al., 2009) y por otro lado, las estructuras monoméricas de los elagitaninos se pueden oxidar en el interior de las plantas y dar lugar a estructuras dímeras, trímeras y tetrámeras que se hidrolizan en presencia de ácidos o de bases dando ácido elágico (Häkkinen et al., 2000).

Los elagitaninos están presentes en diferentes especies de plantas pertenecientes a las familias *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Punicaceae*, *Anacardiaceae*, *Juglandaceae* y *Cistaceae* (Clifford & Scalbert, 2000; Barrajón-Catalán et al., 2010; Tomás-Menor et al., 2013; Fernández-Arroyo et al., 2010).

Las principales fuentes de elagitaninos que se pueden encontrar dentro de nuestra dieta son las nueces, las fresas, la granada, frambuesas y derivados de éstas (mermeladas, zumos, etc.) y en menor proporción en bebidas que son envejecidas en barricas de roble y donde los elagitaninos de la madera pasan al vino, brandy, whisky, etc (Cerdá et al., 2003).

Por otro lado, los taninos condensados o proantocianinas (Cheynier 2005) son polímeros de flavanoles dotados de potentes propiedades antioxidantes y que se encuentran en alimentos como el té, la uva y el cacao. Hay gran variedad de clases de proantocianidinas dependiendo de la unidad monomérica de la que esté compuesta (figura 16).



Familia	Flavan-3-ol	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Procianidinas ^a	(epi)catequina	H	OH	OH	OH	H
Propelargonidinas ^b	(epi)afzelequina	H	OH	H	OH	H
Profisetinidinas ^b	(epi)fisetinidol	H	OH	OH	H	H
Prodelfinidinas ^b	(epi)galocatequina	OH	OH	OH	OH	H
Proguibourtinidinas ^b	(epi)guibourtinidol	H	OH	H	H	H
Prorobinetinidinas ^b	(epi)robinetinidol	OH	OH	OH	H	H
Prodistenidina ^b	(epi)distenidina	H	H	H	OH	H
Proteracacinidina ^b	(epi)oritina	H	OH	H	H	OH
Promelacacinidina ^b	(epi)mesquitol	OH	OH	H	H	OH

^a contienen únicamente (epi)catequina

^b contienen al menos una unidad diferente a (epi)catequina

Figura 16. Principales estructuras de los flavanoles constituyentes de las proantocianidinas. Las proantocianidinas, se diferencian estructuralmente de acuerdo al número de grupos hidroxilo, su posición en los anillos aromáticos y su configuración espacial en las unidades de flavanoles constituyentes. El prefijo “epi” incluido entre paréntesis, indica la configuración cis de los polímeros de proantocianidinas.

La concentración de todos estos compuestos fenólicos en los vegetales, se pueden ver afectadas por factores tales como las diferentes técnicas de cultivo, condiciones de crecimiento, proceso de maduración, así como condiciones de procesado y almacenamiento.

Es importante destacar, que la distribución de los compuestos fenólicos en las plantas a nivel tisular, celular y subcelular no es uniforme, las capas externas de las plantas contienen niveles más altos que las internas y en el interior de la célula estos compuestos se localizan principalmente en las vacuolas, aunque los polifenoles insolubles se acumulan en las paredes celulares (Naczki & Shahidi, 2006).

I.7. Identificación de los compuestos polifenólicos y cuantificación de los mismos

Para llevar a cabo los procedimientos de separación analítica de los compuestos polifenólicos para su posterior identificación, se disponen de numerosas técnicas que se basan en las diferencias existentes en las propiedades físico-químicas de los distintos componentes de una muestra.

Generalmente, se utilizan técnicas continuas, es decir, en las que los analitos se detectan de manera continua (on-line) tras la separación. Dentro de estas técnicas, se pueden diferenciar dos grandes grupos, las cromatográficas y las no cromatográficas (figura 17).

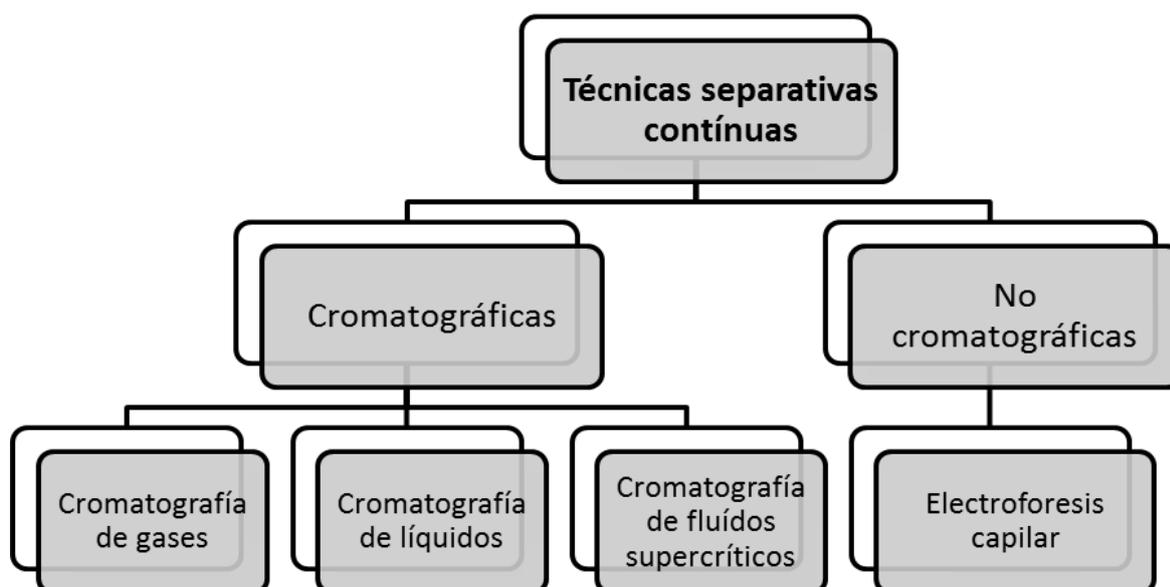


Figura 17. Clasificación de las técnicas analíticas de separación continuas

Concretamente, una de las técnicas separativas más utilizadas para la determinación de compuestos fenólicos en matrices vegetales es la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, siglas en inglés de High performance liquid chromatography), empleada para la caracterización de los extractos de plantas *Cistáceas* que se describen en este trabajo.

a. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica de separación donde los componentes de la muestra se distribuyen entre una fase móvil (el disolvente) y una fase estacionaria (el relleno de la columna).

La fase móvil es un disolvente o mezcla de ellos a los que en algunas ocasiones se les modifica el pH mediante adición de ácidos, bases o disoluciones reguladoras. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso, generalmente en partículas, o bien una fina capa de sustancia ligada a un soporte sólido, contenido en el interior de un tubo habitualmente metálico que da lugar a la columna cromatográfica.

La separación se produce en función de la diferente afinidad entre los constituyentes de la muestra hacia cada una de estas fases. En una separación por HPLC, la fase móvil impulsada por la bomba transporta una banda de muestra a través de la columna cromatográfica.

Al entrar la muestra en la columna, sus componentes interaccionan con la fase estacionaria y se reparten de manera distinta entre ambas fases de tal forma que aquellos que sean más afines con la fase móvil serán menos retenidos por la fase estacionaria y eluirán antes. Por el contrario, aquellos que tengan más afinidad por la fase estacionaria avanzarán más lentamente a través de la columna y eluirán más tarde. Cuando el analito eluye del final de la columna, entra en el detector y produce una señal cuya intensidad está relacionada con la cantidad y naturaleza del analito. Generalmente, la señal es amplificada y registrada por un integrador electrónico, un ordenador o por otros medios mediante los cuales se obtiene el cromatograma que permite identificar y cuantificar el analito.

Un equipo de HPLC está formado por una serie de componentes básicos que son comunes a todos los modelos: bomba, inyector, horno termostatzado, columna cromatográfica, detector y sistema de adquisición de datos (figura 18).

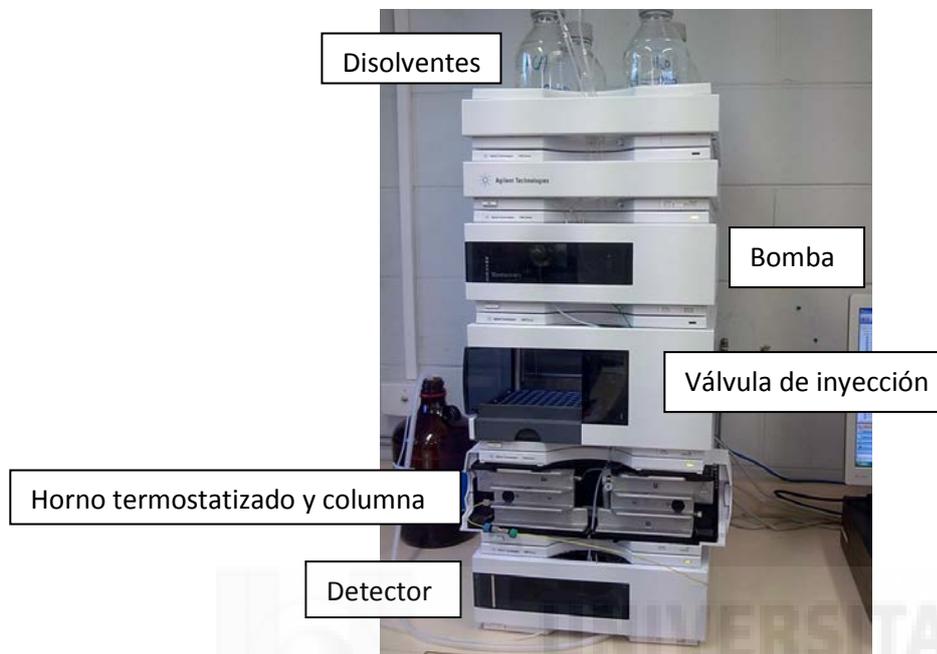


Figura 18. Esquema simplificado de un equipo de HPLC junto a uno comercial

Se pueden diferenciar distintos modos de cromatografía líquida de acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria. Los cuatro modos fundamentales son los siguientes (figura 19):

- a1) *Cromatografía de exclusión por tamaños*, donde la muestra se separa de acuerdo a su tamaño molecular a través de la columna rellena de un material con un tamaño de porocontrolado.
- a2) *Cromatografía de intercambio iónico*, la fase estacionaria está compuesta por una superficie iónica de carga opuesta a la de la muestra.
- a3) *Cromatografía de partición*, los solutos actúan como ligandos de los grupos funcionales unidos a la matriz estacionaria

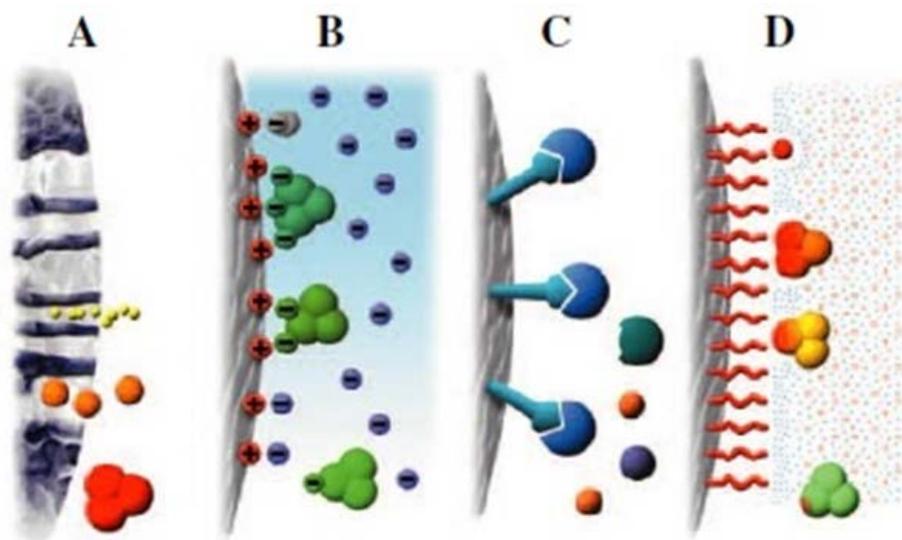


Figura 19. Principales mecanismos de interacción en cromatografía líquida (A) Cromatografía de exclusión por tamaños, (B) Cromatografía de intercambio iónico, (C) Cromatografía de partición, y (D) Cromatografía de adsorción (Rubinson K.A., et al 2000).

a4) *Cromatografía de adsorción*, donde la separación se basa en repetidos pasos de adsorción - desorción. La cromatografía de adsorción es la más ampliamente utilizada y en la práctica, pueden diferenciarse dos modalidades, dependiendo de la polaridad de las dos fases:

- Cromatografía en fase normal, donde la fase estacionaria es de naturaleza polar y la fase móvil es apolar. En este caso, las muestras polares son retenidas más fuertemente por la columna permitiendo, por tanto, la elución de componentes apolares en primer lugar.
- Cromatografía en fase inversa o reversa, donde la fase estacionaria es de naturaleza apolar y el disolvente de elución o fase móvil es polar. En este caso ocurre lo contrario que en fase normal, los compuestos apolares serán retenidos durante más tiempo en la columna.

Los compuestos fenólicos, por su carácter polar se separan, fundamentalmente, mediante cromatografía de adsorción en fase inversa, utilizando columnas rellenas de hidrocarburos como C8 (n-octilo) o más comúnmente, C18 (n-octadecilo).

La elución se lleva a cabo con una fase móvil de polaridad elevada como es el caso de disoluciones acuosas que pueden contener cierto porcentaje de disolventes orgánicos polares como acetonitrilo o metanol.

b. Detección e identificación de compuestos fenólicos

Los sistemas de detección en cromatografía líquida son de dos tipos básicos: los detectores basados en una propiedad de la fase móvil que se modifica por la presencia de los analitos, como los de índice de refracción, constante dieléctrica o la densidad; y por otro lado, los detectores basados en una propiedad del soluto, como sus propiedades espectroscópicas (absorbancia Ultravioleta/Visible, UV-Vis; infrarrojo o emisión de fluorescencia) o sus propiedades estructurales (espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear) (Skoog, 2001).

La oferta de detectores que se pueden utilizar en cromatografía de líquidos es muy amplia y la elección de uno u otro depende en gran medida del tipo de compuesto que se pretende analizar y del tipo de análisis que se desee realizar (cuantificación o identificación y caracterización estructural de los solutos).

Además, los equipos actuales de HPLC permiten configurar al menos dos detectores distintos en serie obteniéndose información de distintas propiedades y características de los solutos que permiten hacer un análisis más detallado de los mismos.

Un ejemplo de ello son los sistemas de HPLC dotados con detectores de absorción UV-Vis acoplados a un espectrómetro de masas, cuyo uso se ha incrementado notablemente en los últimos años (Niessen, 2003).

Para la detección de compuestos fenólicos, los sistemas de detección más ampliamente utilizados son la espectroscopía UV-Vis y la espectrometría de masas, aunque para la identificación inequívoca de compuestos de los que no se disponga de patrones, es necesaria la

resonancia magnética nuclear, si bien ésta presenta los inconvenientes de ser muy poco sensible y de su alto coste, entre otros.

c. Absorción Ultravioleta Visible

Los sistemas de detección basados en la absorción de radiación UV-Vis son los más comunes en los equipos de HPLC comerciales. Las medidas realizadas con este tipo de detectores se basan en los cambios en la absorbancia de luz en la región UV (190-350 nm) y Visible (350-700 nm).

Al igual que los espectrofotómetros convencionales, estos detectores están dotados de una fuente de luz (lámpara), de filtros o monocromadores para seleccionar la longitud de onda, una cubeta para la muestra y detectores que responden a los cambios en la intensidad de luz absorbida.

Los detectores espectrofotométricos de UV-Vis más potentes son los instrumentos de series de diodos (PDA = photodiode array ó DAD= diode array detector) que permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo (figura 20).

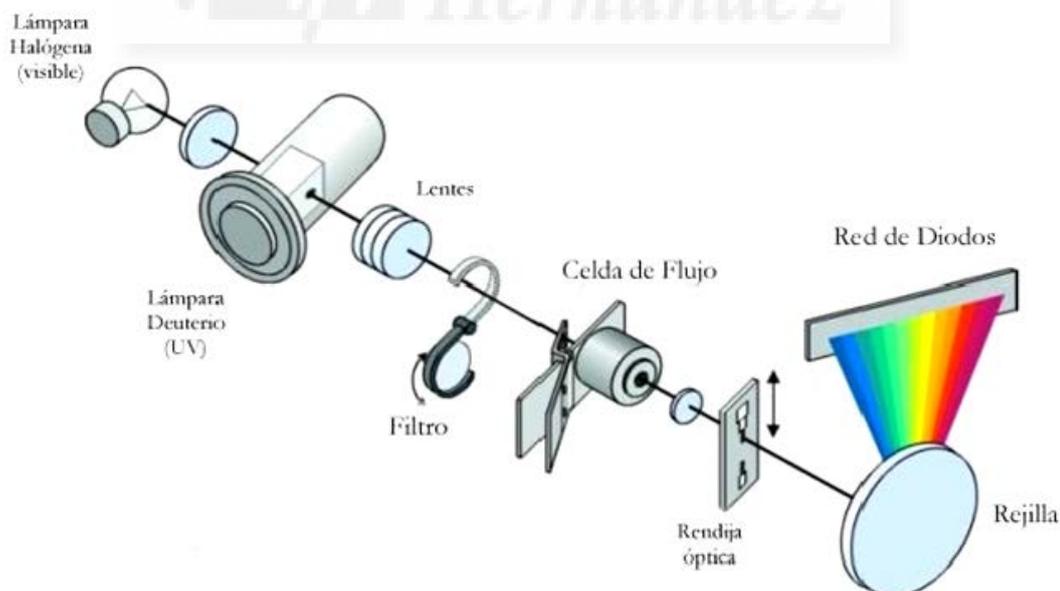


Figura 20. Esquema de los componentes básicos de un detector DAD utilizados en cromatografía líquida (Rubinson K.A., et al 2000).

En los detectores DAD la luz total pasa a través de la celda y la luz dispersada por la muestra se recoge mediante una red de diodos fotosensibles que miden simultáneamente la absorbancia a todas las longitudes de onda. Como consecuencia, se obtiene un espectro completo de la especie eluída, lo cual contribuye a la identificación de los compuestos presentes en la muestra.

Los múltiples enlaces conjugados presentes en los compuestos fenólicos, los convierten en cromóforos que presentan bandas de absorción en la región UV e incluso en el visible como es el caso de las antocianidinas y algunos flavonoles.

Son muchas las moléculas que pueden absorber radiación de esta zona del espectro electromagnético por lo que este detector se puede considerar universal. Este comportamiento presenta la ventaja de que pueda emplearse para resolver una gran cantidad de problemas analíticos pero también puede resultar un inconveniente en aquellos casos en los que se requiere selectividad.

La detección UV-Vis es muy robusta, por lo que es uno de los mejores medios para llevar a cabo cuantificaciones.

Si bien la espectroscopía UV-Vis no nos ofrece información estructural y no permite identificar de forma inequívoca compuestos si no se dispone de patrones, sí que puede resultar útil en la determinación de compuestos fenólicos para acotar la familia a la que pertenecen los analitos ya que cada familia posee unas bandas de absorción características (Merken & Beecher, 2000).

d. Espectrometría de masas

En los últimos años han aumentado exponencialmente las aplicaciones de la espectrometría de masas como sistema de detección acoplado a diversas técnicas separativas y, en especial, a la cromatografía líquida.

Este auge de la técnica se debe principalmente a su selectividad y al hecho de que es uno de los pocos sistemas de detección que proporciona información estructural, evitando la inherente falta de sensibilidad de la resonancia magnética nuclear.

Este acoplamiento también presenta la ventaja de que proporciona una segunda dimensión de separación ya que tras separar los compuestos según su tiempo de retención, se produce en el espectrómetro de masas una separación en función de la relación masa/carga (m/z).

La espectrometría de masas, se basa en la separación a vacío de iones en fase gaseosa de acuerdo con su relación masa/carga.

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, pero todos incluyen los siguientes elementos: un sistema de introducción de muestra, un medio por el que las muestras son ionizadas, un acelerador de iones mediante un campo eléctrico, un sistema de dispersión de iones de acuerdo a su relación masa/carga y un detector de los iones junto con un procesador adecuado de la señal.

Para llevar a cabo el acoplamiento de una técnica que trabaja en fase líquida, como es la cromatografía líquida, con un espectrómetro de masas, en el que las sustancias para ser analizadas deben entrar en fase gas, es necesaria una interfase adecuada.

Se han desarrollado diferentes interfases para el acoplamiento HPLC-MS (figura 21), pero la más empleada de ellas es la de ionización por electrospray (ESI), especialmente en la determinación de compuestos fenólicos ya que es eficaz en el análisis de compuestos polares, lábiles y en un amplio rango de pesos moleculares.

d1) Ionización por electrospray (ESI): En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo.

La muestra procedente del capilar de separación, y con la ayuda de un gas nebulizador, se carga y dispersa simultáneamente. El disolvente se va evaporando de las microgotas formadas (desolvatación) y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica.

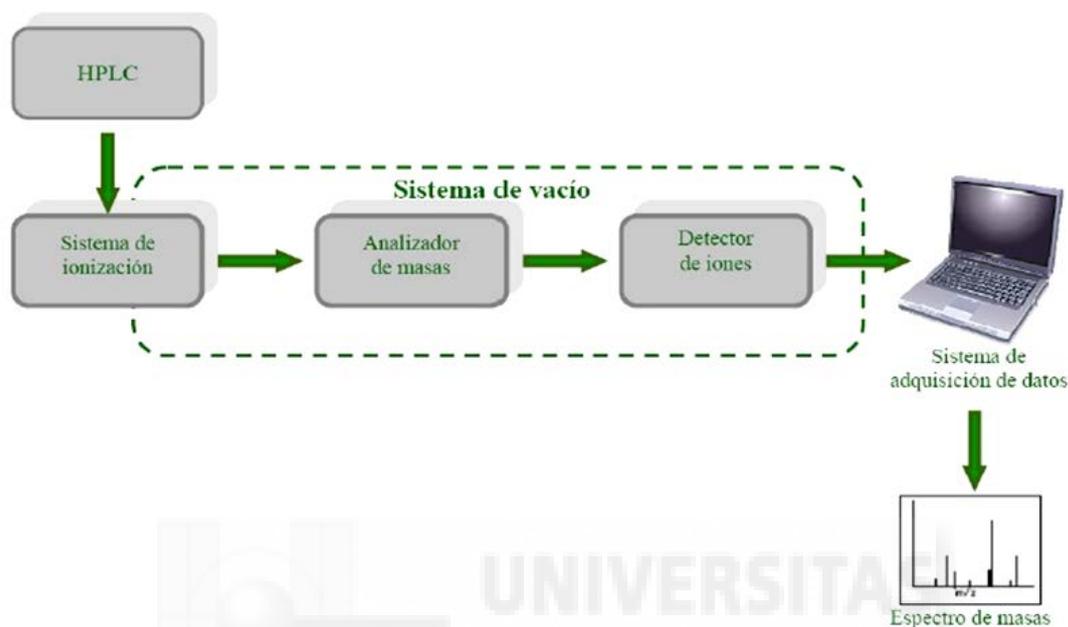


Figura 21. Esquema de un acoplamiento HPLC-MS

Como consecuencia, las gotas se encogen y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí debido al campo electrostático que se aplica entre la salida del capilar y la entrada al espectrómetro de masas.

En cierto momento, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión de la superficie que mantiene unidas las gotas en forma esférica, y las pequeñas gotas se rompen. Debido a fuerzas de repulsión coulombica aumenta la tensión superficial de las microgotas y éstas acaban “explotando” (“explosiones de Coulomb”), formándose así una serie de pequeñas gotas cargadas que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos, hasta que finalmente se forman iones cargados desnudos que pasan a fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado (figura 22).

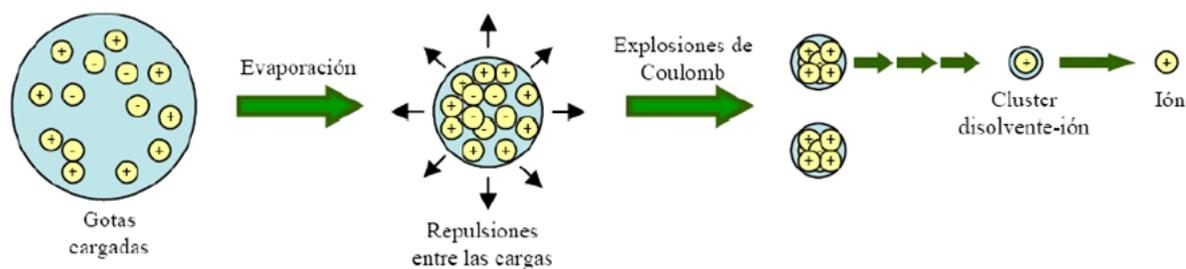


Figura 22. Formación del electrospray (Rubinson K.A., et al 2000).

La ionización se puede llevar a cabo en modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]n+$ donde n es el número de protones cargados positivamente en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc.

En el modo negativo, se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]n-$.

Una vez que en la interfase se ha llevado a cabo la transferencia de los iones procedentes del capilar desde la fase líquida a la fase gaseosa, los iones son dirigidos hacia el analizador de masas.

Los analizadores de masas permiten la separación, detección y cuantificación de los analitos en estudio con un grado de sensibilidad y selectividad muy elevado, proporcionando información sobre su masa molecular.

Existen diversos tipos de analizadores: cuadrupolos, trampas de iones, sectores magnéticos, analizadores de tiempo de vuelo, etc. En el desarrollo experimental de esta memoria, se ha utilizado tanto la trampa de iones (IT) como los analizadores de tiempos de vuelo (TOF).

d2) *Trampa de iones (IT)*: En el esquema (figura 23) se pueden diferenciar las siguientes partes: la interfase (ESI en este caso), la denominada zona de “transporte y convergencia” de iones con los skimmers, octopulos y lentes; el analizador (IT); y el detector. La primera zona es la cámara de formación del spray (la interfase), donde se nebuliza la solución de la muestra y se ioniza a través de un proceso de desolvatación. La zona de “transporte y focalización” de iones posee cuatro zonas de alto vacío. Los iones a través del capilar de vidrio pasan a la zona de transporte y focalización.

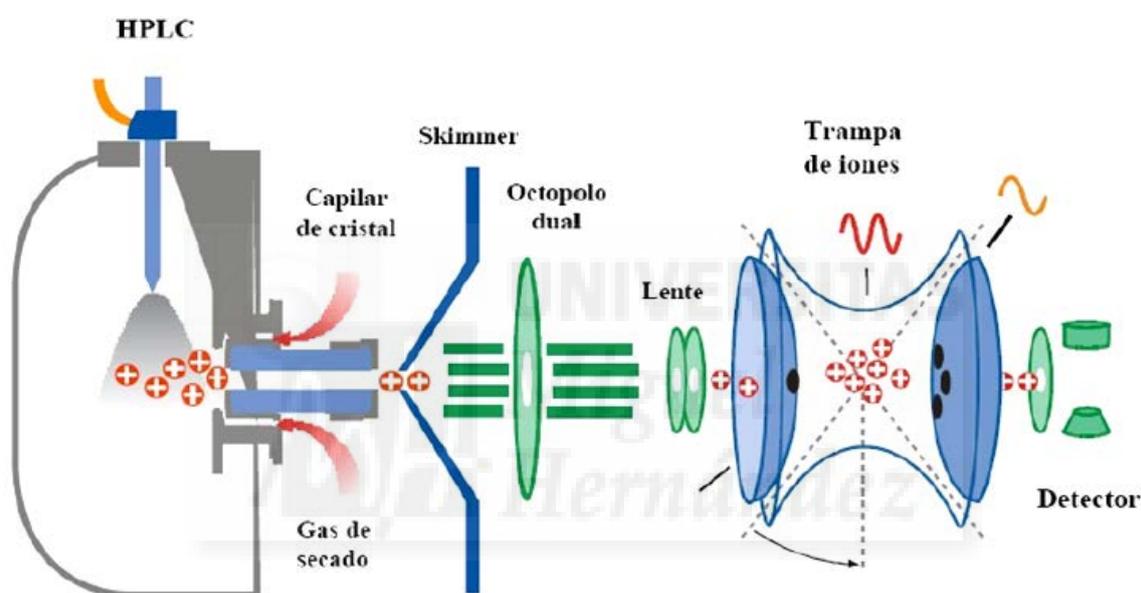


Figura 23. Esquema de un espectrómetro de masas ESI-IT (Rubinson K.A., et al 2000).

El skimmer elimina el gas de secado, entonces los iones pasan al octopolo que los transporta y guía desde detrás del skimmer hasta el detector atravesando una serie de lentes. Los iones formados en la fuente entran en el analizador donde se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa.

Este campo atrapa, concentra y desestabiliza los iones, expulsándolos en la dirección axial en función de su relación m/z dando lugar a un espectro de masas. Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro de este analizador, se puede llevar a cabo bien el análisis de sus masas (obteniéndose el espectro de MS) o bien el aislamiento de uno o varios iones precursores

y su posterior fragmentación (dando lugar a lo que se denomina espectros de MS-MS o espectros MS²).

Después del analizador, los iones pasan al detector, que tiene también una serie de lentes y un sínodo cuya función es dirigir los iones hasta el propio detector.

d3) *Tiempo de vuelo (TOF)*: El analizador de tiempo de vuelo (TOF), separa los iones según la distinta velocidad que adquieren en su interior en función de su relación m/z .

En primer lugar, los iones son extraídos de la cámara de ionización y acelerados hacia el tubo de vuelo mediante un campo electrostático que les aporta una elevada energía cinética. Los iones de mayor m/z “volarán” a menor velocidad que los de menor m/z .

La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea la longitud del tubo (habrá una mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados de la fuente (Martín Smith R, 1999; Simó C & Cifuentes A, 2005).

En la página siguiente, se muestra un esquema del interior de un TOF (figura 24).

La muestra disuelta, entra en la cámara de nebulización donde tiene lugar la formación de spray.

Los iones formados atraviesan la unidad de desolvatación o secado, que separa las zonas a presión atmosférica, de la primera zona de alto vacío y que consta de un calentador de gas para el secado y un capilar de cristal. A través de ella, se llega a la zona de transmisión o transferencia óptica que consta de tres módulos que se encuentran a gran presión de vacío y separados entre sí por varios skimmers con forma de hexapolo.

Estos hexapolos, son los que transfieren los iones hasta la zona de vacío ayudados por las lentes que enfocan o dirigen dichos iones hacia el tubo de vuelo aplicando un campo eléctrico intermitente.

En función de su masa, los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector hacia el detector. Detrás del mismo, existen zonas de tensión que repelen los iones, siendo los más pequeños los repelidos con más facilidad.

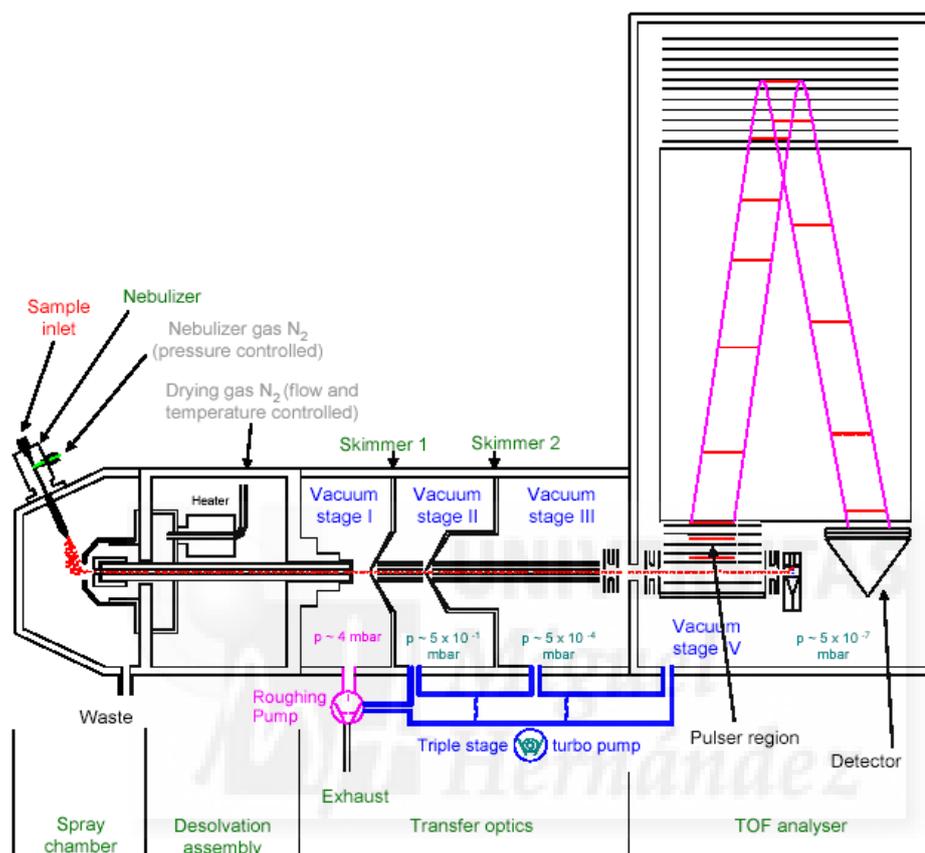


Figura 24. Esquema detallado de las partes de un ESI-micro TOF (Bruker Daltonics, 2005).

El detector utilizado, es un detector de impacto electrónico que consiste en una serie de placas de alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. Dicho elemento, tiene millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor. Cada uno de ellos, trabaja como un multiplicador de electrones independiente.

El analizador TOF es rápido y sensible, además permite la discriminación de compuestos que poseen masas exactas empleando TIP (True Isotopic Pattern) para el análisis en dos dimensiones, dando óptimos resultados en un rango muy amplio sin requerir tediosos y rutinarios procesos de re-calibración.

Es decir, aporta una mayor fiabilidad de los resultados aplicando un método analítico casi bidimensional: combinando la determinación de masas exacta con el análisis de la distribución isotópica.

I.8. Los polifenoles como antimicrobianos

La actividad antimicrobiana de los polifenoles se ha atribuido en diversos estudios científicos a extractos de plantas, mezclas de extracto de plantas y a compuestos purificados a partir de las mismas (Rios et al., 2005).

Algunos de estos compuestos son bien conocidos y pertenecen a la familia de los flavonoides, alcaloides, terpenos y taninos de numerosas fuentes naturales (Cowan, 1999; Barrajon-Catalán et al., 2010). De todas estas familias, está siendo cada vez más documentada la actividad antibacteriana de los flavonoides. Además, es interesante destacar que la materia prima seleccionada para realizar el estudio pertinente *in vitro* sobre la actividad antibacteriana, proceden de extractos de plantas con antecedentes de uso en la medicina popular.

Algunos ejemplos de extractos ricos en flavonoides con actividad antimicrobiana pueden ser los extractos de plantas de especies de *Hypericum sp.* (Dall'Agnol R et al., 2003), *Capsella sp.*, *Chromolaena sp.* (El-Abyad MS et al., 1990) y *Camellia sinensis (L)* (Hamilton-Miller JMT et al., 2000).

Pero también existen otras muchas preparaciones fitoquímicas que mezclan varios extractos para alcanzar una alta concentración en flavonoides y que logran una gran actividad antibacteriana. En este sentido existen mezclas que se eligen por sus fitoconstituyentes y que alcanzan un contenido en flavonoides del 40% o superior para conseguir ese propósito antimicrobiano (Aladesanmi AJ et al., 1986; Al-Saleh FS et al., 1997; Mahmoud MJ et al., 1989; Quarenghi MV et al., 2000; Rauha JP et al., 2000; Singh RK et al., 1999; Tarle D et al., 1990; Torrenegra RD et al., 1989).

Por otro lado, el propóleo ha sido analizado en muchas ocasiones por diferentes grupos de investigación debido a su alto contenido en flavonoides con actividad antibacteriana (Grange JM et al., 1990; Bosio K et al., 2000; Pepeljnjak S et al., 1982; Cheng PC et al., 1966; Park YK et al., 1998).

Otros grupos han decidido una vez identificados los flavonoides en el extracto bioactivo, aislarlos de dicho extracto, identificar la estructura de dicho flavonoide y cuantificar su actividad. Ejemplos de tales flavonoides estudiados son, apigenina (Sato Y et al., 2000), galangina (Pepeljnjak S et al., 2004), pinocembrina (Fukui H et al., 1988), ponciretina (Kim DH et al., 1999), genkwanina (Cottiglia F et al., 2001), sophoraflavanone G y sus derivados (Sakagami Y et al., 1998), naringina y naringenina (Ramaswamy AS et al., 1972; Ng TB et al., 1996), galato de epigallocatequina y sus derivados (Zhao WH et al., 2001; Stapleton PD et al., 2004), quercetina, 3-O-metilquercetina y diversos glucósidos de quercetina (Waage SK et al., 1985; Van Puyvelde L et al., 1989) y kaempferol y sus derivados (Van Puyvelde L et al., 1989; Sakar MK et al., 1992).

Además, también existen algunas investigaciones que han demostrado sinergia frente a cepas bacterianas resistentes entre flavonoides de origen natural junto con agentes antibacterianos que se utilizan en clínica tales como oxacilina, vancomicina, ofloxacino y metilicina. Como ejemplos de esta actividad se incluye, galato de epicatequina (Hamilton-Miller JMT et al., 2000; Shiota S et al., 1999; Stapleton PD et al., 2004) y sophoraflavanone G (Sakagami Y et al., 1998; Sato M et al., 1995). En este sentido, al menos un grupo ha demostrado la sinergia sólo entre flavonoides probando diferentes combinaciones frente a *Bacillus cereus* y *Salmonella enteritidis* mediante halo de inhibición con las siguientes mezclas binarias: quercetina más quercetina, quercetina más miricetina, quercetina más Kaempferol y fisetina más rutina (Arima H et al., 2002).

Finalmente, tan sólo dos grupos de investigación han descrito el uso de flavonoides *in vivo* para el tratamiento de infecciones. En un estudio realizado por Vijaya y Ananthan, la administración

oral de 142,9 mg / kg de quercetina o 214,3 mg / kg de quercetrina, era capaz de proteger a conejillos de India contra una infección inducida por *Shigella*, lo cual provocó la muerte en los animales control no tratados (Vijaya K et al., 1996). Más recientemente, Dastidar & col., informaron que la inyección intraperitoneal de 1,58 mg / kg de sophoraisoflavona A o 3,16 mg / kg de 6,8- diprenylgenisteína protegía de forma significativa a ratones infectados con *Salmonella typhimurium* (Dastidar SG et al., 2004).

Debido a esto, los estudios de polifenoles de plantas como fuente terapéutica antimicrobiana merecen una especial atención.

I.9. Papel de la interacción de los polifenoles con las membranas biológicas

La composición lipídica de cualquier membrana biológica es un factor determinante para su correcta funcionalidad, por tanto, la presencia de moléculas en la bicapa lipídica puede modificar sustancialmente la estructura y propiedades fisicoquímicas de las membranas, y por lo tanto, producir cambios en el flujo y / o permeación, separación de fases o formación de dominios de lípidos. Estos cambios pueden afectar la función celular incluyendo las funciones de las proteínas del receptor de membrana y la señalización celular. Uno de los factores externos que provoquen la interacción a nivel de los fosfolípidos de la membrana pueden ser los polifenoles (Tsuchiya H et al., 1999; Bombardelli E et al., 1991; Liu MJ et al., 2003).

La interacción de los polifenoles con los lípidos de las membranas puede estar modulada por numerosos factores como la presencia de grupos hidroxilo, el grado de polimerización, grupos heterósido. Concretamente para los flavonoides, existen estudios que citan que por lo general la unión se produce mediante puentes de hidrógeno a través de interacciones fisicoquímicas reversibles con la cabeza polar de los fosfolípidos de membrana (Halder J et al., 1998; Bombardelli, 1991) provocando cambios en la fluidez de las mismas.

Esta fluidez está causada principalmente por el efecto biológico de capacidad antioxidante originado por la presencia de grupos hidroxilo (Tsuchiya H et al., 1999; Liu MJ et al., 2003; Saija A et al., 1995; Tsuchiya H et al., 2002).

Para los compuestos antimicrobianos como el totarol y el triclosan (Mateo et al., 2000; Micol et al., 2001; Villalaín et al., 2001) y para otros compuestos polifenólicos bioactivos como el resveratrol (García-García et al., 1999), catequinas (Caturla et al., 2003), antraquinonas (Alves et al., 2004), iridoides (Laporta et al., 2005), norlignanós (Laporta et al., 2007) o verbascósido (Funes et al., 2009), se ha conseguido demostrar que son capaces de perturbar el comportamiento de los fosfolípidos y que a su vez, estos fosfolípidos son capaces de modular la estructura y dinámica de estas moléculas. Esta interacción podría explicar además de su capacidad antioxidante y antimicrobiana, otras muchas actividades que se les han atribuido y que están relacionadas con procesos celulares.

Si se observa el caso particular de las catequinas, hay estudios que sugieren que la reducción en las resistencias antimicrobianas, podrían estar relacionadas con los efectos que estos compuestos tienen sobre las propiedades físicas de las membranas bacterianas. Por ejemplo, aumentando la fluidez y provocando cambios en el comportamiento termotrópico se produce una inestabilidad en las membranas bacterianas (Hashimoto T et al., 1999; Kajiya K et al., 2001; Kajiya K et al., 2002; Catarla N et al., 2003; Stapleton P. D. et al., 2006; Ikigai H et al., 1993; Alves DS et al., 2004; Caturla N et al., 2003; Villalaín J et al., 2001; Micol V et al., 2001; Catarla N et al., 2005; Laporta O et al., 2007).

Esto es destacable debido a que cuando una bacteria se hace resistente, cambia la conformación normal de la bicapa lipídica y de sus lípidos y se hace menos permeable (Staubitz et al., 2004; Haest et al., 1972).

I.9.1 Composición lipídica de la membrana

Las membranas biológicas están compuestas principalmente por proteínas, lípidos y glúcidos. La proporción en la que estos elementos se encuentran en la membrana depende del tipo celular o incluso esta proporción puede variar de una parte a otra de una misma célula. Las propiedades estructurales y funcionales de cada membrana dependen, en gran medida, de la proporción en que se presenten en su estructura las diferentes clases de lípidos (Hucho, 1986).

Dentro de las membranas, las uniones entre lípidos, y entre lípidos y proteínas, son principalmente de tipo no covalente. Más concretamente, las uniones responsables de que estos elementos se encuentren físicamente cohesionados y por lo tanto, de mantener intacta la estructura de las membranas biológicas son los enlaces de tipo iónico (fuerzas electrostáticas), enlaces por enlaces de hidrógeno e interacciones por fuerzas de van der Waals.

Como los lípidos constituyentes de la mayoría de las membranas biológicas se encuentran los fosfolípidos.

Los fosfolípidos son derivados del glicerol donde los grupos hidroxilo de los C1 y C2 se encuentran esterificados con dos ácidos grasos, mientras que el C3 se esterifica con un ácido fosfórico. Debido a que en su estructura poseen una cabeza polar y colas hidrocarbonadas no polares, éstos reciben también el nombre de lípidos anfipáticos.

En las membranas de las células eucariotas predominan los fosfolípidos basados en glicerol, incluyendo a la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y cardiolipina (CL), aunque los lípidos basados en esfingosina como la esfingomielina (SFM) y los glicoesfingolípidos, también constituyen una fracción importante en determinados tipos celulares. Sin embargo, en la mayor parte de las membranas de procariontes la PC no está presente de manera habitual y en su lugar abundan otra clase de fosfolípidos como

la PE, el fosfatidilglicerol (PG), la cardiolipina y el dipalmitoilfosfatidiglicerol (L-DPPG), este último un lípido exclusivo del *S. aureus* (figura 25).

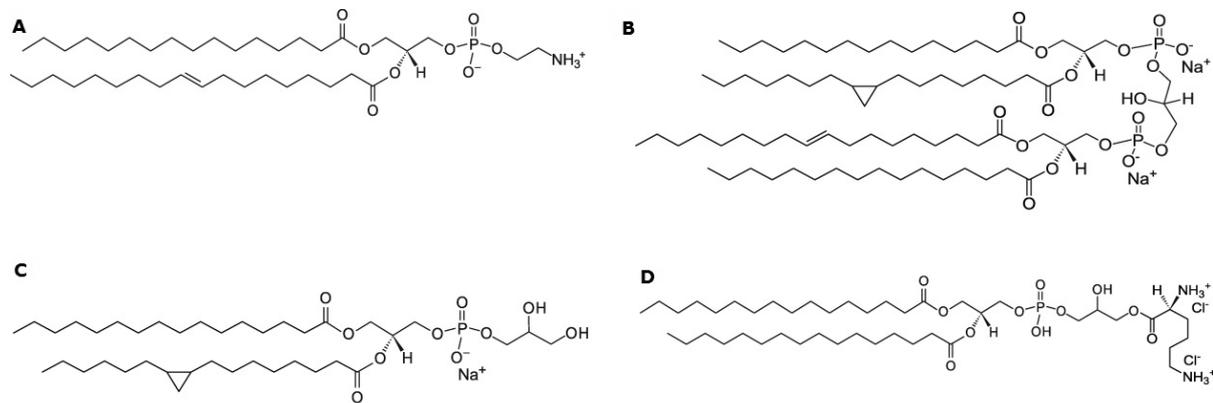


Figura 25. Estructura de los lípidos predominantes en especies bacterianas. A: fosfatidiletanolamina (PE); B: cardiolipina (CL); C: fosfatidilglicerol (PG); D: dipalmitoilfosfatidiglicerol (L-DPPG)

I.9.2 Organización y dinámica de las biomembranas

Los lípidos que constituyen la bicapa lipídica, presentan movimientos de flexión y rotación entre las uniones C-C de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos.

La molécula completa de lípido puede moverse rotacionalmente alrededor de sí misma, alrededor de un eje móvil o fijo o bien pueden difundir lateralmente a lo largo de la superficie de la bicapa o de una mitad a otra de la misma (difusión transmembrana o flip-flop) (figura 26).

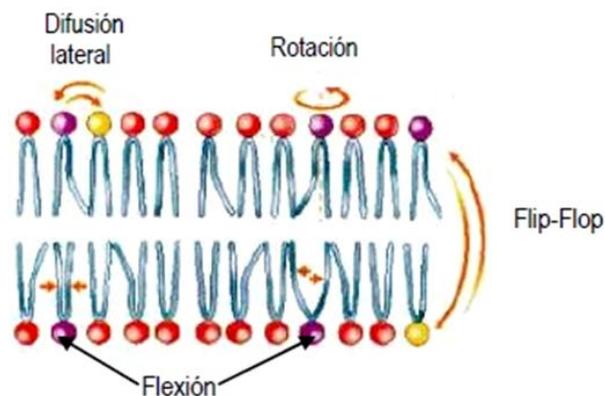


Figura 26. Efectos dinámicos de los lípidos de una membrana.

I.9.3 Fluidez de la membrana y orden lipídico

Las membranas fisiológicas a temperatura ambiente se encuentran normalmente en estado fluido, lo cual viene determinado por un lado por sus propiedades dinámicas (asimetría y movimiento de los lípidos) y por otro lado por la composición y estructura química de sus componentes lipídicos.

Así, la presencia de ácidos grasos saturados en las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos favorece una membrana menos fluida que se muestra en estado sólido a temperatura ambiente. Los enlaces simples C-C hacen que las cadenas acílicas sean rectas y rígidas permitiendo la interacción máxima entre ellas y favoreciendo un mayor empaquetamiento de los fosfolípidos. Como resultado la membrana es menos fluida y más ordenada presentando puntos de fusión a temperaturas más elevadas. Además, este efecto “rigidificador” se ve aumentado cuanto mayor es la longitud de las cadenas de ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos de membrana.

Por el contrario, una composición lipídica enriquecida en ácidos grasos insaturados induce una mayor fluidez en la membrana, ya que los dobles enlaces C=C de las insaturaciones introducen “codos” o pliegues en las cadenas acílicas de los fosfolípidos que hacen que éstas se curven debilitando las interacciones entre las colas y reduciendo el grado de empaquetamiento de los lípidos. Como consecuencia, la membrana se encuentra en estado fluido a temperatura ambiente. Por tanto, según su composición lipídica, las membranas formadas por fosfolípidos que tienden a formar bicapas pueden encontrarse en tres estados físicos diferentes: la fase gel ($L\beta$), la fase líquido-ordenada (L_0) y la fase líquido-cristalina o fluida ($L\alpha$) (figura 27).

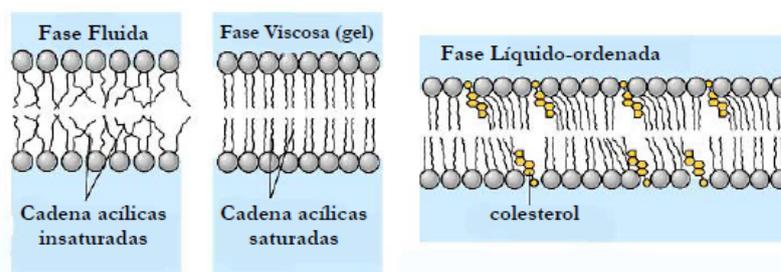


Figura 27. Distintos estado físicos lamelares en que se pueden encontrar las membranas formadas por fosfolípidos que tienden a formar bicapas.

En la fase gel los lípidos están inmóviles con sus cadenas acílicas totalmente extendidas, mientras que en la fase fluida los lípidos se encuentran formando estructuras débilmente empaquetadas con una elevada movilidad lateral y con cadenas acílicas desordenadas. Sin embargo, la fase líquido-ordenada constituye un estado intermedio entre los dos anteriores en la que los lípidos presentan una elevada movilidad lateral pero al mismo tiempo una estructura ordenada con cadenas acílicas extendidas.

El estado físico de las distintas capas lamelares o bicapas, es altamente dependiente de la temperatura ya que al incrementar la temperatura se produce un aumento del desorden de las cadenas hidrocarbonadas y una disminución del empaquetamiento de las mismas.

La temperatura a la cual se produce el cambio de estado de gel a líquido-cristalino se denomina temperatura de transición (T_m). A valores de temperatura inferiores a la T_m , el lípido se encuentra en fase gel y a valores superiores, se encuentra en fase líquido-cristalino o fluida (Bergethon, 1998; Keough & Davis, 1979) que es la fase que usualmente está presente en las membranas biológicas.

La cooperatividad de la transición de fase es un indicador del número de moléculas que cambian de estado simultáneamente durante la transición (Vance, 1996).

En el caso de fosfolípidos puros, la T_m está bien definida y la transición se suele producir de forma cooperativa. En los sistemas biológicos al existir mezclas lipídicas complejas la transición se produce en un intervalo de temperaturas y suelen tener una baja cooperatividad (Bergethon, 1998). La T_m de un lípido es altamente dependiente de la estructura de sus cadenas acílicas. La presencia de fosfolípidos de cadena corta o con insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas produce un descenso de T_m , debido a que una menor longitud de las cadenas reduce la tendencia de las colas a interactuar entre ellas, y la presencia de dobles enlaces producen torsiones en las cadenas hidrocarbonadas que interfieren en el empaquetamiento lateral.

Por otra parte, la presencia de fosfolípidos saturados en la bicapa aumenta su T_m debido a que estos fosfolípidos presentan una elevada capacidad de agrupación y baja movilidad (Alberts, 2002). Otro factor que afecta a la T_m es la naturaleza de la cabeza polar, es decir, su tamaño, estado de ionización y su capacidad para establecer enlaces de hidrógeno.

I.9.4 Sistemas modelo de membrana

Dada la complejidad estructural y funcional de las membranas biológicas, su estudio se hace excesivamente complejo utilizando membranas intactas. Por ello, se han descrito un tipo de vesículas fosfolipídicas denominadas liposomas, que se utilizan como sistemas modelo y que se resuspenden como lípidos secos en medio acuoso, siendo capaces de adoptar la disposición de bicapa (figura 28).



Figura 28. Estructura del liposoma. La disposición de la bicapa es dictada por el carácter anfipático de los lípidos que lo componen, de manera que la parte hidrofóbica tiene una tendencia a no entrar en contacto con el agua.

Los liposomas son los modelos de membrana más utilizados ya que la estructura en forma de bicapa lipídica es idéntica a la porción lipídica de las membranas celulares. Típicamente se forman a partir de moléculas anfifílicas como son los fosfolípidos.

Al ser dispersados en agua, los fosfolípidos forman bicapas donde las cadenas hidrocarbonadas se organizan de modo que se encuentran protegidos del agua, y así el sistema es termodinámicamente favorable. Las bicapas se unen de manera que dejan en su interior el contenido acuoso.

Durante mucho tiempo no existió una clasificación uniforme de los liposomas y no fue hasta la década de los 80 cuando se adoptó la clasificación basada en el número de bicapas lipídicas y en el tamaño (Szoka Jr & Papahadjopoulos, 1980). Según esta clasificación los liposomas se pueden clasificar de la siguiente manera (figura 29):

1) *Vesículas multilamelares (MLVs)*: vesículas formadas por un elevado número de bicapas concéntricas separadas entre sí por espacios acuosos y cuyas dimensiones varían entre 0,1-5 μm . Son los sistemas modelo de membranas más simples y se utilizan en estudios biofísicos sobre la organización de la bicapa, así como para el estudio de los movimientos de lípidos individuales dentro de la membrana.

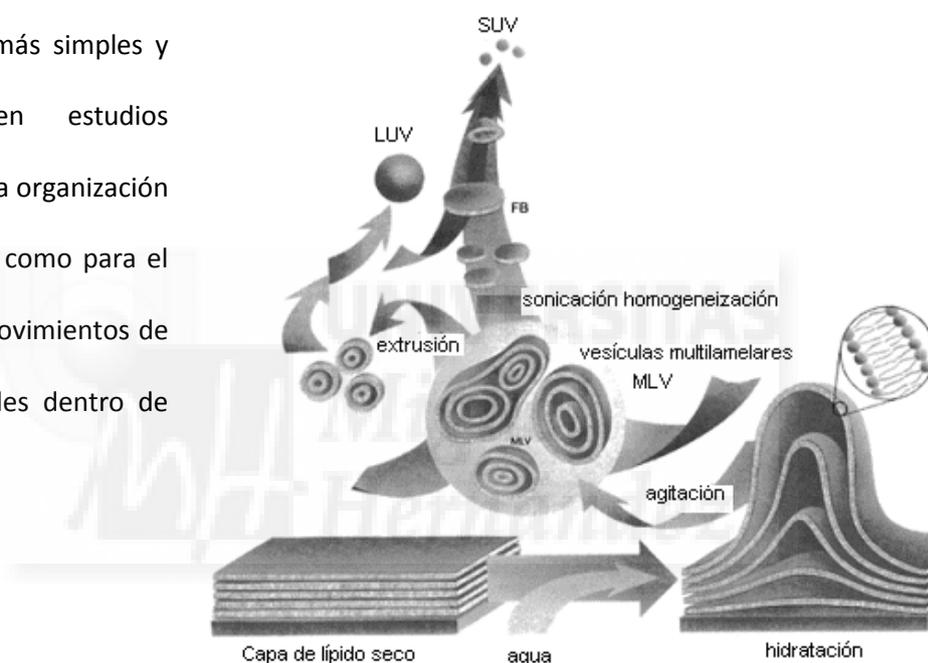


Figura 29. Representación esquemática de la preparación de todo tipo de liposomas.

La principal desventaja de estos liposomas es que su bicapa externa, la cual presumiblemente interacciona con el exterior, sólo contiene el 10% del lípido total. Para obtener los MLVs, basta con preparar una película de lípido seco en el fondo de un tubo de ensayo e hidratarla mediante agitación vigorosa en presencia de un tampón acuoso hasta obtener una suspensión homogénea. Durante la preparación de los liposomas la temperatura debe estar por encima de la temperatura de transición de la fase principal del lípido utilizado.

2) *Vesículas unilamelares pequeñas (SUVs)*: tienen un diámetro entre 25 y 40 nm, presentando un radio de curvatura tan pequeño que la relación de lípido entre la monocapa externa y la interna llega a ser de 2:1 (Huang, 1969).

Estos liposomas tienen una mayor curvatura que los LUVs, lo que les confiere una menor estabilidad.

Además, el volumen encapsulado por las SUVs es muy pequeño para ser utilizadas en estudios de permeabilidad o de distribución de iones entre compartimientos. Su eficacia de encapsulación es de 0,2 a 0,8% (Shew & Deamer, 1985). La metodología más empleada para su preparación es mediante sonicación de MLVs.

3) *Vesículas unilamelares grandes (LUVs)*: vesículas cuyo diámetro medio oscila entre 50-500 nm, con una distribución de lípido entre la monocapa externa e interna de aproximadamente 1:1.

Este tipo de liposomas es apropiado para estudiar procesos de permeabilidad, fusión, agregación, etc. El procedimiento más común para su preparación es por extrusión de los MLVs a través de filtros de policarbonato de un tamaño de poro definido (Mayer et al., 1986).

Si se utiliza un filtro de 100 nm, los LUVs presentan un diámetro medio entre 60-100 nm. La eficacia de encapsulación de estas vesículas se encuentra entre el 15 y el 40% (Shew & Deamer, 1985).

I.9.5 Técnicas utilizadas para el estudio de las membranas biológicas

a. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés differential scanning calorimetry) es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de los cambios en la capacidad calorífica de una muestra cuando es calentada o enfriada.

Mediante esta técnica se registra el exceso o defecto de capacidad calorífica aparente de la muestra en función de la temperatura, obteniéndose lo que comúnmente se conoce como termograma.

El DSC mide así la cantidad de calor absorbida o emitida por una muestra en función de la temperatura y/o tiempo, debido a cambios físicos y/o químicos. Las determinaciones se basan en el comportamiento de una muestra con respecto a una referencia, cuando ésta se somete a un cambio de temperatura.

Esta técnica es ideal para el estudio de la energía de transición conformacional de macromoléculas biológicas, y su importancia reside en el análisis de parámetros termodinámicos a partir de la medida de la capacidad calorífica del sistema. En la presente tesis doctoral, se utilizan liposomas vacíos como control o liposomas en el que se incluye el compuesto a estudio.

De esta manera, se puede obtener información sobre las propiedades termotrópicas del sistema como son: la temperatura de transición (T_c) que se corresponde con la temperatura a la cual comienza a detectarse la transición de fase y la temperatura media (T_m) que se corresponde con la temperatura a la cual la transición se ha completado al 50% (figura 30) (Huang & Li, 1999).

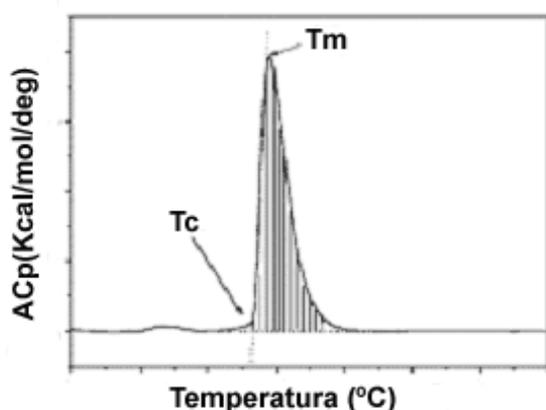


Figura 30. Transición de fase gel a líquido-cristalino de un lípido ejemplo, donde se señalan algunos parámetros que se pueden determinar a partir de un termograma.

La temperatura de transición de los liposomas formados por un fosfolípido puro depende en gran medida de la longitud o número de carbonos de las cadenas acílicas que constituyen los fosfolípidos. De esta forma, un aumento en la longitud de las cadenas hidrocarbonadas provoca un aumento en los valores de la T_m de la suspensión de liposomas, al igual que en los valores de entalpía y entropía asociados al proceso de fusión (Chapman et al., 1976).

Sin embargo, la T_m de los fosfolípidos, no sólo depende de la longitud de sus cadenas acílicas, ya que el grado de saturación de los residuos de ácidos grasos y el grupo de la cabeza polar del fosfolípido también influyen en el valor de temperatura en que ocurre la transición de fase (Chapman et al., 1966). Por ejemplo, la presencia de un doble enlace en las cadenas de ácidos grasos causa un descenso en los valores de la T_m del fosfolípido, siendo los enlaces *cis* los que muestran un mayor efecto sobre la transición del lípido en comparación con los dobles enlaces *trans*.

El tipo de cabeza polar del fosfolípido también influye indirectamente en el proceso de fusión mediante cambios en el empaquetamiento de la membrana.

Los grupos de la cabeza polar pueden interaccionar entre ellos estableciendo puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares, aumentando así la estabilidad de la membrana y desplazando la transición de fase hacia temperaturas mayores. Por ejemplo, a pH neutro las PEs muestran temperaturas de transición aproximadamente 20° C por encima que las T_m mostradas por sus homólogos de PC con idénticas cadenas acílicas.

b. Ensayo de liberación de contenidos

El ensayo de liberación de la sonda fluorescente carboxifluoresceína encapsulada en liposomas, permite estudiar si la presencia de un determinado compuesto en la membrana promueve una serie de cambios en la misma, que conducen finalmente a la desestabilización de la bicapa y a la liberación del contenido interno de las vesículas. Este ensayo, se utiliza con frecuencia para comprobar la estabilidad de liposomas que se utilizan como vehículo de péptidos, proteínas u

otro tipo de compuestos orgánicos que tienen como objetivo alcanzar de forma efectiva sus dianas de acción. Otra aplicación habitual de este ensayo consiste en comparar la capacidad bactericida de distintos compuestos. En el presente trabajo se ha utilizado este experimento con esta última finalidad, para estudiar si la actividad antimicrobiana atribuida a estos extractos y a sus componentes mayoritarios pueda deberse a una disrupción de las membranas bacterianas.

c. Coeficiente de partición

El coeficiente de partición (K_p) es un parámetro adimensional que se define como el cociente entre las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema de dos fases formado por solventes completamente inmiscibles.

El método tradicionalmente empleado para determinar este parámetro, utiliza agua y *n*-octanol como disolventes de diferente polaridad entre los que se reparte la sustancia disuelta en función de su grado de hidrofobicidad.

Esto, nos permite determinar el coeficiente de partición *n*-octanol/agua o P_o/a , que habitualmente es expresado en forma de logaritmo decimal ($\log P_o/a$).

No obstante, la cromatografía líquida de alta resolución ha supuesto un método alternativo para las medidas de partición, en el que la determinación del reparto preferencial de determinados compuestos entre la bicapa lipídica y su entorno acuoso a través de técnicas cromatográficas, constituye un modelo más aproximado al proceso de distribución preferente en entornos hidrofóbicos como lo son las bicapas lipídicas de las células.

Con el fin de determinar tales parámetros, en la presente memoria se ha empleado tanto la metodología tradicional de partición en *n*-octanol/agua como el método cromatográfico para poder obtener los valores de coeficiente de partición P_o/a y factor de reparto preferencial K_p en vesículas fosfolipídicas de membranas modelo, respectivamente.

d. Medida del tamaño de partícula mediante difracción láser

Más correctamente denominado “Low Angle Laser Light Scattering” (LALLS), es el método empleado para la medida de tamaño de partícula y el estándar preferido en muchas industrias. Posee un rango aplicable de acuerdo a la ISO 13321 e ISO 22412 que permite la detección de partículas en un rango que oscila entre $>0,3$ nm y $6 \mu\text{m}$.

Este tipo de instrumentación se desarrolló hace unos 20 años y su metodología se basa en el factor de que “el ángulo de difracción es inversamente proporcional al tamaño de la partícula”. Su detector consiste en un detector de fotodiodo de avalancha (APD) con una estructura muy fina tipo diapositiva de sílice fotosensible que dispone de un número óptimo de detectores, los cuales, dirigen la señal a un fotomultiplicador que incrementa la resolución. La señal finalmente llega a un correlador que traduce la información. La medida de la luz dispersada se realiza a dos ángulos, uno de ellos a 90° para conferir una mayor sensibilidad en la detección de partículas con mayor tamaño.



Figura 31. Analizador del tamaño de partícula en el rango de lo nanométrico utilizado para el presente trabajo (Brookhaven modelo 90 plus).

I.10. Plantas del género *Cistus*

La familia *Cistaceae* o de *Cistáceas* (también conocida como jaras) es una gran familia de arbustos perennes que crece en el ecosistema semiárido Mediterráneo.

Estos arbustos forman parte importantísima (cuando no exclusiva) de los matorrales mediterráneos y algunas especies son pioneras en la recuperación de suelos degradados, especialmente tras los incendios forestales. De hecho, su expansión se ve favorecida por ellos; ya que son especies pirófitas cuyas semillas se abren y germinan ayudadas por el fuego. (Ferrandis et al., 1999).

Las plantas del género *Cistus* están compuestas por lo general por hojas largas y simples de 2-8 cm, con una superficie ligeramente rugosa. Sus flores son hermafroditas con tres o cinco sépalos (por lo general, los sépalos exteriores son más pequeños que los internos).

Presentan 5 pétalos con colores que van del blanco al púrpura y rosa oscuro dependiendo del subgénero y además, unas pocas especies presentan manchas de color rojo oscuro visible en la base de cada pétalo (figura 32).

La figura 33 muestra la agrupación por subgéneros de los miembros más representativos de los tres subgéneros pertenecientes al género *Cistus*: *Cistus*, *Leucocistus* y *Halimoides*.



Figura 32. Ejemplos de flores de la familia *Cistaceae* con diferente coloración: flores blancas para el *C. salviifolius* (A); púrpuras para *C. incanus* (B) y flores blancas manchadas de un color rojo oscuro para *C. ladanifer* (C). *La intensidad y color varía entre especies, especialmente para las pertenecientes al subgénero Cistus* (Barrajón-Catalán et al., 2015).

Dentro de este género, existen especies que se utilizan en la industria de la perfumería por ser fragantes y de olor dulce y además, se han utilizado desde tiempos remotos en la medicina popular tradicional (Zidane, Elmiz et al. 2013).

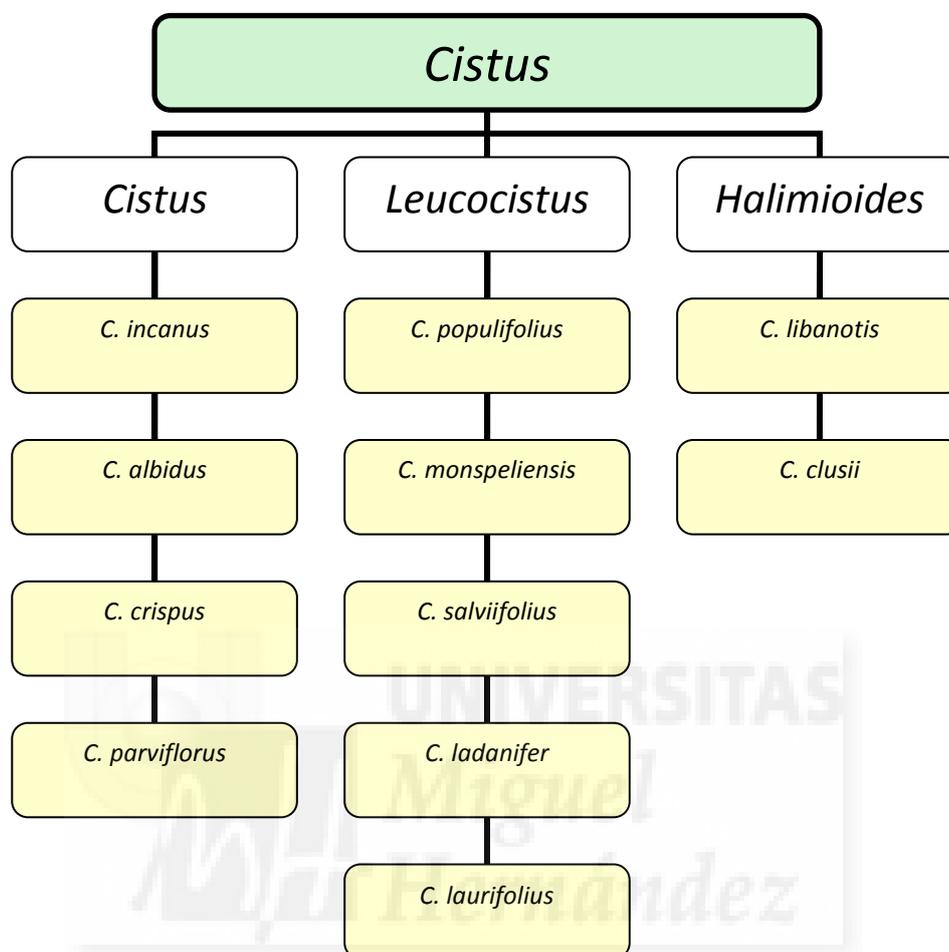


Figura 33. Relación taxonómica entre las diferentes plantas del género *Cistus* agrupadas en subgéneros.

Concretamente, las especies de *Cistus* más abundantes que nos podemos encontrar en la Península Ibérica y que se han utilizado para el presente trabajo de investigación son: *C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. clusii*, *C. albidus* (Stübing & Peris, 1998).

***C. salviifolius* o jaguarzo morisco**, es un arbusto del subgénero *Leucocistus* que no sobrepasa el metro de altura y es de los más frecuentes en los matorrales mediterráneos, aunque rara vez se hace dominante. Se adapta bien a todo tipo de suelos. Sus hojas son pequeñas, cubiertas de cortos pelillos y con inervación reticulada, lo que las asemeja a las de la salvia.

Se ha usado como astringente y también cicatrizante en algunos países del entorno mediterráneo, además de utilizarse para hacer infusiones como sucedáneo del té (Quer, 2005; Stübing & Peris, 1998).

C. clusii, es un arbusto muy ramificado del subgénero *Halimioides*, algo viscoso y aromático que crece sobre suelos calcáreos poco profundos. Sus hojas son muy estrechas, lineales, verdes por su haz y blanquecinas por su envés, parecidas a la del romero. Posee propiedades antiinflamatorias y estimulantes del cuero cabelludo.

C. ladanifer o *jara pringosa*, es un arbusto de hasta 2,5 m de altura con hojas alargadas, estrechas y ramificadas del subgénero *Leucocistus*. Sus hojas están impregnadas en una resina pegajosa y fuertemente olorosa, el ládano, que les confiere un aspecto brillante. Es la especie más frecuente en la región mediterránea occidental. De crecimiento exclusivo sobre suelos silíceos. Sus hojas son pecioladas y de limbo lanceolado. Tradicionalmente ha sido empleado como sedante, hemostático y antiinfeccioso.

C. albidus *estepa* o *jara blanca*, es un arbusto de entre 50 y 100 cm de altura del subgénero *Cistus* con hojas de color blanquecino, sin peciolo y con tres nervios muy marcados. Es de crecimiento frecuente en la mayor parte de la Península Ibérica y ampliamente se extiende por el territorio valenciano, creciendo en cualquier tipo de suelo, alcanzando su óptimo sobre suelos descarbonatados. Como propiedades a destacar se resalta el poder antiinflamatorio.

Los estudios de las propiedades medicinales de estas plantas y concretamente de la actividad antimicrobiana que es el tema que ocupa la presente tesis doctoral se centran en la mayoría de los casos en el estudio de la composición del aceite esencial de estos arbustos (tabla 3).

En estos estudios, se muestra una actividad significativa frente a bacterias Gram-positivas debido a la mayor concentración de compuestos tales como viridiflorol, folocladeno, longiborneol, abietatrieno y cis-feruginol.

Especies	Compuestos principales	Referencias
<i>C. ladanifer</i>	α -pineno, viridiflorol y camfeno	(Pascual, Bellido et al. 1982; Mariotti, Tomi et al. 1997; Robles, Bousquet-Mélou et al. 2003; Gomes, Mata et al. 2005; Oller-López, Rodríguez et al. 2005; Costa, De Fina et al. 2009)
<i>C. incanus</i>	Óxido de manoil, viridiflorol y carvacrol	(Demetzos, Loukis et al. 1995; Paolini, Falchi et al. 2009; Loizzo, Ben Jemia et al. 2013)
<i>C. albidus</i>	α -zingibereno, curcumeno, α -cadinol y α -bisabolol	(Robles and Garzino 1998; Maccioni, Baldini et al. 2006; Paolini, Tomi et al. 2008)
<i>C. salviifolius</i>	Camfor, viridiflorol y longiborneol	(Demetzos, Angelopoulou et al. 2002)
<i>C. monspeliensis</i>	óxido de manoil, bisabolol, 1,8-cineole, acetato de bornil y α -pinene	(Robles and Garzino 2000; Angelopoulou, Demetzos et al. 2001; Angelopoulou, Demetzos et al. 2002; Oller-López, Rodríguez et al. 2005; Viuda-Martos, Sendra et al. 2011)
<i>C. laurifolius</i>	Borneol y nonacosano	(Öğütveren and Tetik 2004)
<i>C. libanotis</i>	α -pineno, β -pineno, bornil acetato y borneol	(Loizzo, Ben Jemia et al. 2013; Zidane, Elmiz et al. 2013)
<i>C. parviflorus</i>	Carvacrol, óxido de cariofileno, abietatrieno, 4-epi-dehidroabietol, dehidro abietol, cis-ferruginol, 8- α -13-oxi-14-ene-epilabdano y óxido de manoil	(Angelopoulou, Demetzos et al. 2001; Öğütveren and Tetik 2004)

Tabla 3. Principales terpenos encontrados en los aceites esenciales, derivados de diferentes especies *Cistus* (Barrajón-Catalán et al., 2015)

Sin embargo y a pesar de que existan muchos más estudios en aceites esenciales, no se puede descartar la actividad antimicrobiana del contenido polifenólico de extractos de estas especies, tales como derivados de apigenina y kaempferol en *C. ladanifer* (Chaves et al, 1994; Ramalho et al, 1999; Saracini et al, 2005), derivados de elagitaninos y quercetina glicosilada o miricetina en *C. salviifolius* (Saracini et al., 2005), proantocianidinas oligoméricas en *C. albidus* (Qa'dan et al., 2003), flavanoles en *C. clusii*, diterpenos y flavonoides en *C. creticus* (Skoric' et al., 2012) y los flavonoides, ácido gálico y rutina en *C. incanus* y *C. monspeliensis* (Santagati et al., 2008).

Además, se ha caracterizado de forma completa al *C. ladanifer* y *C. populifolius* usando una técnica cromatográfica altamente resolutive (Barrajon-Catalán et al., 2010; Fernández-Arroyo et al., 2010), encontrándose como compuestos mayoritarios como ya se han mencionado, elagitaninos y flavonoides glicosilados.

Si profundizamos no sólo en la composición de los extractos de *Cistus*, sino también en la bioactividad, es destacable que los extractos obtenidos con diferentes disolventes a partir de las hojas secas y frutos de *Cistáceas* de la zona de Turquía, tienen una importante actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *B. subtilis*, pero no frente a *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans* (Güvenç et al., 2005).

También es de interés la actividad mostrada en estudios previos del presente grupo de investigación, en los que se publicó no sólo la caracterización de los compuestos de extractos acuosos de *C. ladanifer* y *C. populifolius*, como ya se han citado en el párrafo anterior (Barrajon-Catalán et al., 2010; Fernández-Arroyo et al., 2010), sino que se determinó su actividad biológica, entre ellas la antimicrobiana, dando un resultado destacable al igual que ocurre en otras investigaciones mencionadas en bacterias Gram-positivas (Barrajon-Catalán., et al., 2010).





II. Hipótesis de partida y objetivos

Estudios preliminares realizados por el grupo de investigación (Fernández-Arroyo et al., 2010; Barraji3n-Catal3n et al., 2010; Barraji3n-Catal3n et al., 2011) postulan la existencia de una estrecha relaci3n entre la capacidad antimicrobiana y el contenido polifen3lico de los extractos del g3nero *Cistus*, habiendo mostrado algunos de ellos evidencias de eficacia frente a bacterias Gram-positivas. Por tanto, la b3squeda de los compuestos de estos extractos con una mayor contribuci3n a esta actividad, merecen la realizaci3n de estudios m3s profundos como los que se presentan en esta Tesis.

Por otra parte, dada la trascendencia del fen3meno de aparici3n de bacterias resistentes a antibi3ticos como es el caso de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), cabe la posibilidad de que algunos de estos extractos vegetales y los compuestos que los forman, puedan convertirse en alternativas terap3uticas a los antibi3ticos actuales mediante el dise1o de agentes antimicrobianos m3s eficaces contra infecciones nosocomiales.

Dado lo anteriormente expuesto, se plantea como objetivo general de la presente Tesis Doctoral *la b3squeda de extractos y compuestos bioactivos, fundamentalmente derivados de plantas del g3nero Cistus que presenten actividad bacteriost3tica o bactericida con potenciales aplicaciones farmac3uticas y/o dermocosm3ticas*. Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- ✓ Obtener extractos vegetales a partir de diferentes especies de plantas de la familia *Cistaceae* mediante extracci3n con diferentes disolventes y utilizando varias t3cnicas de secado.
- ✓ Estudiar su actividad antimicrobiana, tanto a nivel bacteriost3tico como bactericida, frente a bacterias modelo Gram-positivas y Gram-negativas y relacionarla con su capacidad antioxidante y su contenido polifen3lico.

- ✓ Caracterizar con detalle la composición de los extractos más activos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y cuantificar los compuestos mayoritarios en dichos extractos.
- ✓ Estudiar la posible existencia de efectos sinérgicos entre los compuestos puros mayoritarios del extracto más activo mediante análisis isoblográfico para intentar justificar la actividad del extracto completo.
- ✓ Estudiar mediante ensayos de evolución del crecimiento microbiano, la capacidad de varios extractos vegetales ricos en compuestos polifenólicos con el objetivo de comprobar si estos extractos tienen una actividad inhibitoria de amplio espectro y no sólo disminuyen el recuento de colonias, sino que además aumentan el tiempo de generación microbiana en organismos modelo patógenos (*S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*).
- ✓ Estudiar si el mecanismo de acción de los compuestos antimicrobianos más activos caracterizados en los objetivos anteriores, son capaces de perturbar las membranas fosfolipídicas modelo de *S. aureus* y de *E. coli*, con el objetivo de determinar la contribución de este efecto a su capacidad antimicrobiana.





III. Material y métodos

III.1. Recolección de plantas y preparación de muestras

Las especies de diferentes plantas de *Cistus* nativas se obtuvieron a partir de diversas zonas del territorio español. Las muestras de *Cistus ladanifer* L., se recolectaron en una zona de montaña cerca de Puertollano provincia de Ciudad Real. Cerca de Andalucía se recolectó el *Cistus albidus* L., y finalmente el *C. salviifolius* L. y *C. clusii* Dunal fueron recolectados de una zona semi-árida cerca de Monóvar en la provincia de Alicante.

Todas las muestras, fueron recogidas entre el periodo comprendido de junio de 2010 y noviembre de 2011. Una vez recolectado el material vegetal, fue debidamente identificado y etiquetado por los autores y por personal cualificado perteneciente al grupo de investigación.

Antes del procesamiento, las muestras se lavaron con agua para eliminar los residuos de polvo y artrópodos.

III.2. Obtención de los extractos y fraccionamiento

Las matrices vegetales son muy complejas, por lo que normalmente no es posible abordar su análisis directo y es necesario un paso previo de extracción de los componentes de interés, en este caso, los compuestos polifenólicos. Este primer paso, es especialmente crítico para posteriores análisis cuantitativos.

Han sido descritos en la bibliografía numerosos procedimientos para la extracción de polifenoles de matrices vegetales, en su mayoría, utilizando extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido (Harnly et al., 2007). En este tipo de extracciones, juega un papel decisivo la solubilidad de los compuestos polifenólicos en los disolventes utilizados. Esta solubilidad, viene condicionada por la naturaleza química del compuesto, que concretamente para los polifenoles, ésta puede variar según a la familia que pertenezcan. Además de la solubilidad, se deberán tener en cuenta las posibles interacciones con otros componentes de la matriz como por ejemplo azúcares o bien proteínas.

Por estos motivos, no es posible hablar de procedimientos de extracción generales, sino que la elección de un procedimiento concreto dependerá de la matriz de la que se trate, de los compuestos que se quieran determinar y del tipo de información que se desee obtener (cualitativa o cuantitativa).

Para el presente trabajo, las muestras botánicas fueron procesadas durante las 24 horas después de su recolección y fueron trituradas con un molino para obtener partículas de entre 3 y 5 mm de tamaño. Una vez obtenido el tamaño de partícula adecuado, las muestras se sometieron entonces a maceración acuosa o hidroalcohólica durante 4 h con agitación suave a una temperatura no superior a 65°C, estando el presente protocolo bajo la protección de la patente **ES20090002106 20091023**. Los extractos líquidos obtenidos, se filtraron para eliminar los sólidos en suspensión y más tarde se concentraron con el rotavapor para eliminar el etanol en el caso de la extracción hidroalcohólica, además de concentrar los sólidos solubles en un promedio aproximado de 8°Brix y de ese modo, favorecer las posteriores técnicas de secado. Los diferentes procedimientos de secado utilizados fueron la liofilización (FD; Telstar Cryodos 80, España) y el secado por pulverización (SDY; Büchi Mini Spray Dryer B-290, España). Así, se obtuvieron los extractos en polvo, que se disolvieron en el tampón apropiado para cada prueba después de filtrarse a través de filtros estériles de 0,2 µm.

El extracto seleccionado, fue fraccionado como se describió previamente (Beltrán-Debón et al., 2010; Herranz-López et al., 2012) utilizando una cromatografía por afinidad con una resina Amberlite FPX66 (El Dow Chemical Co.), que muestra alta afinidad para los compuestos polifenólicos. Para ello, dicho extracto se disolvió en agua destilada y se centrifugó a 3000 rpm. El sobrenadante se cargó en la columna de cromatografía (2 × 25 cm) empaquetada con la resina anteriormente citada con un caudal de 4 mL / min.

Dicha columna debidamente empaquetada, se lavó con 30 volúmenes de agua destilada y se eluyó a una velocidad de 2 mL / min con 3 volúmenes de etanol. El producto de los lavados y las fracciones eluidas se recogieron por separado, para su posterior liofilizado y análisis.

III.3 Identificación de compuestos por cromatografía

III.3.1 Determinación de compuestos fenólicos de las diferentes muestras de *Cistáceas* por RRLC-ESI-TOF-MS

El análisis de espectrometría de masas de los extractos, se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente en (Fernández-Arroyo et al., 2010) y queda publicado en (Tomás-Menor et al, 2013).

a. Separación analítica

La separación analítica, se logró utilizando un RRLC (cromatografía líquida de rápida resolución) 1200 Serie instrumento de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.) equipado con una bomba binaria G1312B y un detector de diodos (DAD) G1315C. Se utilizó un Zorbax Eclipse Plus (Agilent Technologies) con una columna RP-C18 (4,6 × 15 mm, 1,8 μm tamaño de partícula). El volumen de inyección fue de 15 μL, y la tasa de flujo fue de 0,8 mL / min.

La fase móvil consistió en ácido acético 0,5% (A) y acetonitrilo (B). Fue utilizado el siguiente gradiente: 0 min, 0% de B; 20 min, 20% B; 30 min, 30% B; 40 min, 50% B; 50 min, 75% B; 60 min, 100% B.

b. Ionización y transferencia de los compuestos

Los compuestos se ionizan y se transfieren desde el RRLC (instrumento de separación) hasta el espectrómetro de masas, mediante una fuente de ionización por electrospray (ESI), usando diferentes condiciones en función de si la detección de las masas se realiza mediante tiempo de vuelo de masas (TOF). La temperatura fue de 190°C, la presión del gas nebulizador fue de 2 bares, el flujo de gas nebulizador fue de 9 L / min, la tensión en la cámara de pulverización fue -500 V y el voltaje de entrada fue de + 4.500 capilar V.

c. Detección de las masas

Para obtener los valores de masa precisa de las moléculas, se realizó un análisis de las mismas, usando un instrumento microTOF tiempo-de-vuelo de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

Las condiciones TOF incluyen una tensión de 9000 V en el tubo de vuelo, una tensión de 1960 V en el detector y un modo de ionización negativo en un rango de 50 a 1100 m / z. Para lograr la precisión de masa necesaria para la identificación de los compuestos, se utilizó una calibración externa. Debido al rango amplio de masas que se quería detectar, se utilizó como calibrante el acetato de sodio que cubre un rango de m/z de 50 a 1200. Este calibrante se preparó mezclando una solución de NaOH 1 M y agua: isopropanol (50:50, v / v) con ácido acético 0,2% en una relación 5: 995 (v / v).

Los datos de masa exacta y los fragmentos que se obtuvieron fueron procesados utilizando la versión del paquete de software 4.0 y la herramienta molecular FormulaTM generadas dentro del paquete DataAnalysis (Bruker Daltonics).

III.3.2 Cuantificación de los compuestos mayoritarios del mejor extracto analizado

Para el análisis de cuantificación de los compuestos mayoritarios del extracto más activo, se utilizó un HPLC-DAD-MS/MS.

El análisis de espectrometría de masa se realizó como se describe en (Tomás-Menor et al., 2015).

a. Separación analítica

El análisis fue realizado, utilizando un equipo de la serie Agilent LC 1100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, EE.UU.) controlado por el software ChemStation y equipado con una bomba, un inyector automático, horno para la columna y un detector de diodos de UV-vis.

El instrumento HPLC fue acoplado a un espectrómetro de masas Esquire 3000 + (Bruker Daltonics, GmbH, Alemania), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un

analizador de masas con trampa de iones que se gestiona mediante el control de Esquire y el software de análisis. La separación analítica se logró utilizando un Poroshell © 120 (Columna Agilent Technologies) RP-C18 (4,6 x 150 mm, 2.7 micras de tamaño de partícula).

El volumen de inyección fue de 15 μ L, y la tasa de flujo fue de 0,5 mL / min. La fase móvil estuvo formada por ácido fórmico al 1% (A) y acetonitrilo (B), utilizándose el siguiente gradiente: 0 min, 5% de B; 30 min, 20% B; 50 min, 100% de B; 56 min, 5% de B; y 5 minutos para re equilibrio. La detección por red de diodos se fijó en 280, 320 y 340 nm.

b. Ionización y transferencia de compuestos

La fuente ESI fue procesada en modo negativo para generar iones en las siguientes condiciones: 360°C de temperatura de secado y 400°C de temperatura de vaporización; 12 L/ min de flujo de gas de secado (nitrógeno) y 70 psi de presión para el nebulizador.

c. Detección de las masas y cuantificación

Para obtener la masa de las moléculas, se trabajó en modo negativo y usando un control de la carga de iones acumulada 10000 iones en 200 mseg. La masa objetivo establece la zona de máxima sensibilidad del analizador y, por tanto, su valor debe encontrarse en el centro de masas a analizar. En este caso, el rango de masas monitorizado fue entre 50-1100 m / z, por lo que este parámetro se estableció en 500 m/z.

Los compuestos se identificaron usando el software de análisis ChemStation para LC 3D (Agilent Technologies Life Sciences and Chemical Analysis, Waldbronn, Germany), comparando el tiempo de retención, los espectros de UV y los datos de masas de los picos en las muestras con patrones o bien con datos reportados en la literatura.

Para la cuantificación de los principales compuestos polifenólicos, se realizaron rectas patrones con estándares comercialmente disponibles de punicalagina (Phytolab, Europa), ácido elágico,

ácido gálico, catequina y quercetina (Sigma-Aldrich, Europa). La recta patrón de cada estándar, se realizó tomando el dato del área bajo la curva (AUC) a diferentes concentraciones. El AUC de cada uno de los compuestos identificados en el extracto, fue comparado con el AUC del estándar comercial de más similitud estructural en un rango de concentraciones. De ese modo, al enfrentar AUC vs concentración, se pudo determinar la concentración de los compuestos de interés identificados en el extracto. En la figura 1, se puede observar a modo de ejemplo, la recta de calibrado para el estándar de catequina.

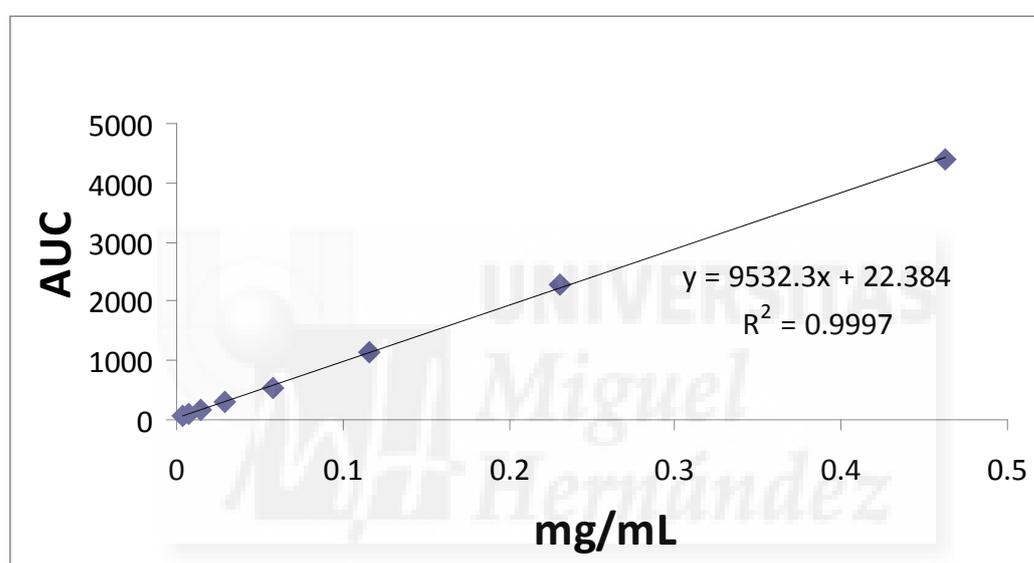


Figura 1. Recta patrón del estándar de catequina para la cuantificación de compuestos fenólicos.

III.4. Determinación de fenoles totales y de flavonoides

La cantidad de compuestos fenólicos totales se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu. Este ensayo, se ha estado utilizando durante muchos años, como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales. No obstante, el mecanismo básico es una reacción redox, por lo que también se puede considerar, como otro método de medida de la actividad antioxidante total (Singleton VL & Rosi JL, 1965).

La oxidación de los fenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 750 nm y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón confeccionada con ácido gálico.

Este trabajo, se llevo a cabo en una placa de 96 pocillos, donde se colocaron en cada uno de los pocillos 50 μ L del reactivo de Folin (Sigma, Steinheim, Alemania). Seguidamente, se añadieron 10 μ L de cada una de las muestras a ensayo, diluídas en agua destilada, 100 μ L de carbonato de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania) al 20 % y 100 μ L de agua destilada. Se agitó la mezcla y se dejaron las muestras incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad.

La detección se realizó a 750 nm en un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania). Los resultados se expresaron en gr de equivalentes de ácido gálico (Doesder. Chem. Co., Barcelona, España) por cada 100 gr de extracto seco.

Del contenido fenólico, un porcentaje corresponde a flavonoides y por ello es interesante resaltar, como se ha destacado en la introducción, ya que los flavonoides tienen una importante actividad antimicrobiana. Dicho contenido, se cuantificó de acuerdo con un método descrito previamente (Pourmorad et al., 2006) utilizando quercetina (Sigma-Aldrich, Europa) como un estándar y disolviendo las muestras en metanol para la extracción de los flavonoides.

III.5. Determinación de la capacidad antioxidante

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Dichos radicales reaccionan con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de ésta, se inhibe la generación de los primeros.

En la actualidad, debido a la complejidad de los complejos de oxidación, no existe un método que refleje de forma completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es bueno trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados.

Las medidas de la actividad contra la producción de radicales, se puede realizar mediante dos estrategias distintas, en función de la información que se desea obtener (Miller et al., 1993):

- a. **Determinación directa:** El radical se emplea como un factor de cuantificación (produce una señal analítica). La adición del antioxidante, antes o después de la generación del radical, provoca una disminución de la señal (método TEAC).
- b. **Determinación indirecta:** La presencia de radicales libres produce la pérdida o aparición de un reactivo, y por tanto, en presencia de una antioxidante se provoca el aumento o disminución de la señal (métodos ORAC, FRAP, TBARS).

Además, es interesante destacar que los métodos TEAC y FRAP están basados en la transferencia de electrones.

Estos ensayos, miden la capacidad de un compuesto antioxidante de transferir un electrón para reducir radicales, metales o carbonilos, y se monitoriza mediante la observación de cambios de color. La reacción finaliza cuando ya no se producen cambios de color. El grado de degradación del color es proporcional a la concentración de antioxidante.

Las sondas utilizadas son ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS+) en el método TEAC y el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) en FRAP.

Los métodos ORAC y TBARS son ensayos basados en la medida de la capacidad de los antioxidantes para captar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno. El ensayo implica una reacción competitiva en cadena, en la que antioxidante y sustrato, compite por la generación térmica de radicales peroxilo.

III.5.1 Actividad antioxidante en equivalentes de Trolox. Ensayo TEAC.

El radical $ABTS^{\bullet+}$ se genera a partir de su precursor, el Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) (figura 2). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible.

La ventaja de este ensayo, es que puede realizarse tanto en muestras hidrosolubles como liposolubles, eligiendo el disolvente apropiado para cada caso. La forma más usual para generar el radical $ABTS^{\bullet+}$ químicamente, es utilizando persulfato potásico.

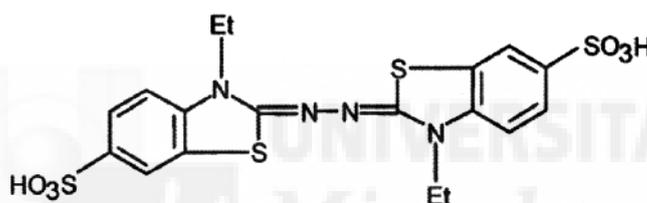


Figura 2. Estructura del Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS)

Dicho ensayo, se basa en la reducción del catión $ABTS^{\bullet+}$ causada por la presencia de moléculas antioxidantes (Re et al., 1999). El catión radical 2,2'-azino-bis (3 etilbenzotiazolina 6-sulfonato) ($ABTS^{\bullet+}$) se obtuvo disolviendo el ABTS en una disolución de persulfato potásico (2,45 mM) y manteniendo la mezcla en oscuridad y a temperatura ambiente durante 12 h.

Para realizar el ensayo, la solución de $ABTS^{\bullet+}$ fue diluída en agua hasta obtener una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

Posteriormente, se mezcló 200 μ L de esta disolución con 20 μ L de los extractos a ensayar para así medir la disminución de la absorbancia a 734 nm. La reducción del catión $ABTS^{\bullet+}$ corresponderá a la medida realizada en un espectrofotómetro después de aproximadamente 10 min.

Como estándar de referencia, se utilizó Trolox (Sigma-Aldrich, USA), sustancia análoga de la vitamina E. Los resultados se expresaron en mmoles equivalentes de Trolox por 100 gramos de extracto. La medida de absorbancia se llevó cabo en un lector de placas Spectrostar Omega (BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Alemania).

III.5.2 Método FRAP (FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER)

Este ensayo mide la capacidad de una sustancia de reducir Fe_3^+ a Fe_2^+ . Se emplea para ello, el reactivo FRAP, que consiste en una mezcla de reactivo TPTZ (Sigma-Fluka, Europa), ácido acético y cloruro férrico (10:1:1).

Dicha mezcla, es incolora cuando está unido al Fe_3^+ (complejo tripiriltriacina férrica; Fe_3^+ -TPZT), y adquiere una coloración azul al reducirse a ión ferroso, a bajo pH. Este ensayo, se llevó a cabo según el método (Benzie & Strain, 1996).

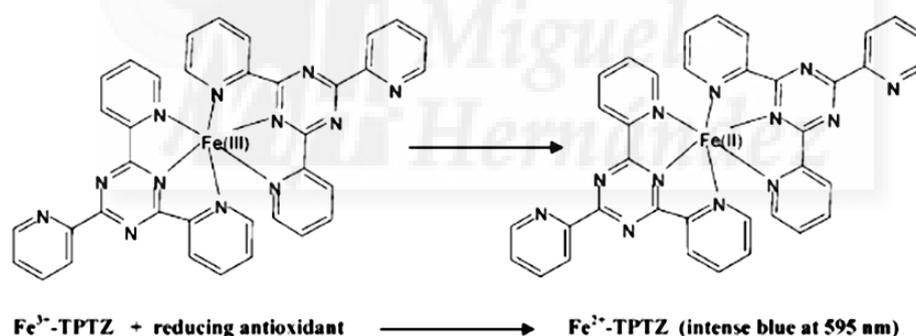


Figura 3. Reacción producida en el método FRAP

Para medir esta coloración azul, se añadieron 40 μL de los extractos a ensayo que se mezclaron en una placa de 96 pocillos con 250 μL de reactivo FRAP recién preparado.

Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$, y se procedió al registro de la absorbancia a 593 nm durante un período de 4 minutos utilizando un lector de microplacas (SPECTROstar Omega, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Alemania). Los valores registrados se compararon con los obtenidos con $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el cual fue utilizado como estándar.

El valor de FRAP de la muestra que se expresa en mmoles de FeSO₄ por cada 100 gramos de extracto, se determinó extrapolando en la ecuación de la recta de calibrado el incremento de absorbancia mostrado.

III.5.3 Método ORAC (OXIGEN RADICAL ABSORBANCE CAPACITY)

El fundamento del método ORAC, se basa en la habilidad que tienen los compuestos antioxidantes para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno:



En este método, el radical artificial AAPH (2,2'-Azobis-(2-aminopropano)-dihidrocloruro) oxida a la fluoresceína (FL) de tal forma que ésta pierde su fluorescencia. Así, las sustancias antioxidantes presentes en el extracto vegetal disminuirán dicha pérdida de fluorescencia. Este mecanismo se muestra en la figura 4 (Ou et al., 2001).

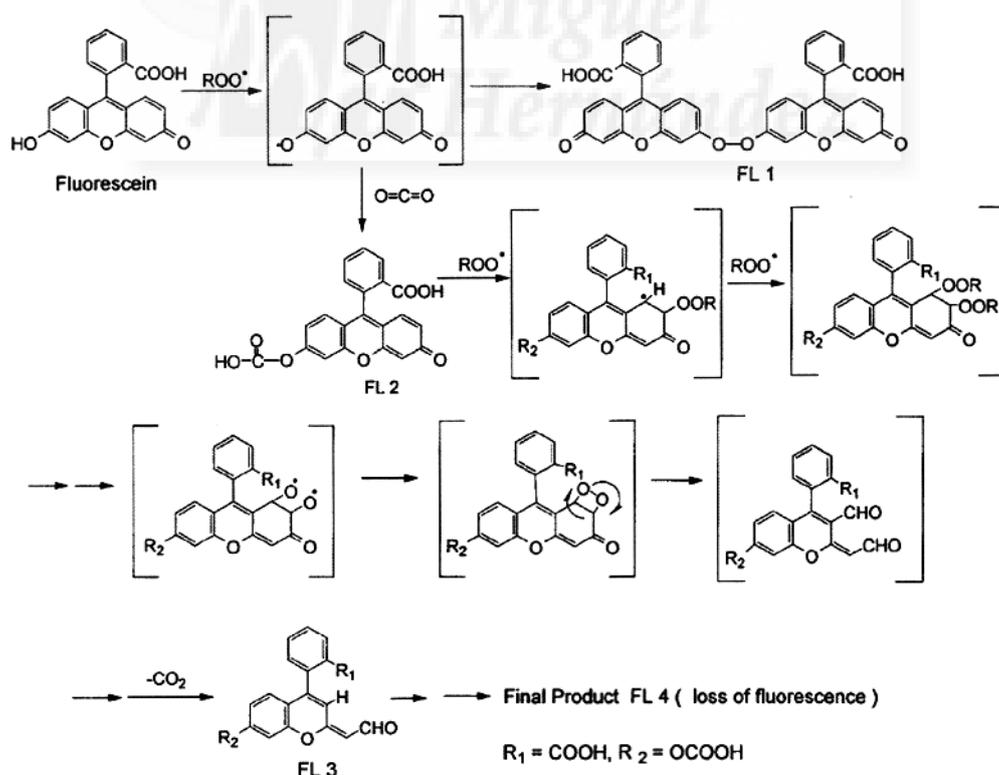


Figura 4. Esquema del mecanismo de reacción de la fluorescencia en presencia de AAPH. La pérdida de fluorescencia indica una capacidad antioxidante de la muestra (Ou et al., 2001).

El ensayo se llevó a cabo en el lector de placas de 96 pocillos POLARstar Omega (BMG Labtechnologies GMBH; Offenburg, Alemania). En cada pocillo se añadieron 150 μL de FL a una concentración de 40 nM preparada en tampón ORAC (fosfato 75 mM, pH 7,4) y atemperada a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 25 μL del extracto a diferentes concentraciones y por último 25 μL de AAPH 152 mM, preparado en tampón ORAC justo antes de su uso.

Se realizó un control negativo en el que no existía decaimiento de la fluorescencia, añadiendo 150 μL de FL 40 nM y 50 μL del tampón ORAC, y un control positivo en el que la fluorescencia decae siendo nula prácticamente al instante, añadiendo 150 μL de FL 40 nM, 25 μL de tampón ORAC y 25 μL de AAPH. La recta de calibrado se construyó utilizando Trolox (Sigma-Aldrich, USA) como antioxidante estándar.

Los datos de disminución de fluorescencia de la FL, se registraron cada 60 s durante 3 h a 37°C con agitación orbital antes de cada medida con una longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 520 nm, respectivamente.

La recta de calibrado se obtuvo hallando la ecuación de una regresión lineal del área bajo la curva (AUC) de disminución de fluorescencia de la FL. Una vez obtenida la recta de calibrado, los valores de ORAC para las muestras, se obtuvieron calculando los equivalentes de Trolox a partir del AUC de las muestras, extrapolando en la ecuación de la recta de calibrado y representándolos frente a la concentración de extracto. La pendiente de la regresión lineal fue finalmente el valor ORAC de la muestra que se expresó en μmoles equivalentes de Trolox por 100 gramos de extracto (Laporta et al., 2007b).

III.5.4 Método TBARS (THIOBARBITURIC ACID REACTIVE SUBSTANCES)

El malondialdehído (MDA), es un producto derivado de la peroxidación lipídica. Este compuesto es capaz de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en una reacción estequiométrica 1:2, dando un complejo medible espectrofotométricamente por su fluorescencia a 532 nm (figura 5).

Un extracto que sea capaz de inhibir la peroxidación lipídica, da como resultado una disminución en la producción de MDA y por lo tanto, una bajada en la absorbancia.

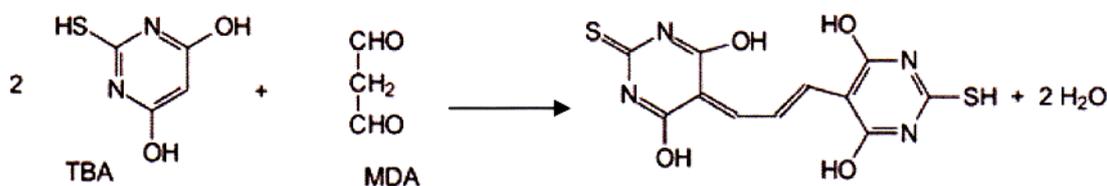


Figura 5. Formación del complejo TBA-MDA-TBA

Para cuantificar dicha peroxidación, se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas (SUV) que fueron preparadas como se ha descrito previamente (Hussin y El-Sayed, 2011) por sonicación de las vesículas multilamelares (MLV) de fosfatidilcolina de yema de huevo (EYPC) (lipoide GmbH, Ludwigshafen, Alemania). Un mililitro de esta dispersión de SUVs, se incubó durante 10 min a 37 °C con los extractos.

Posteriormente, con el objetivo de inducir la peroxidación de los ácidos grasos insaturados se añadió el generador de radicales libres AAPH (a una concentración final de 10 mM). La mezcla se incubó a 37 °C con agitación en vórtex ocasional para su reacción, tras lo cual se detuvo después de 60 min mediante la adición de 100 µL de BHT (4% p / v en etanol) (hidroxitolueno butilado, Sigma-Aldrich, Europa).

A continuación, se produjo una reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico, mediante la adición a las muestras de 104 µL de sulfato de dodecil de sodio (3% p / v), 208 µL de TBA (1% p / v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 208 µL de 7 HCl mM; esta mezcla se incubó a 95 °C durante 15 min.

El cromógeno TBA-MDA (malondialdehído) se extrajo con 580 µL de butanol, mezclándose en vórtex durante 30 segundos y posteriormente se separó la fase orgánica de la acuosa mediante una centrifugación de 5 minutos a 10000 rpm.

Se cogieron 150 μ L de la fase superior (orgánica), para ser analizados usando un sistema de HPLC acoplado a un sistema de detección de fluorescencia, como se describe previamente (Laporta et al., 2007b), con el que se cuantificó la actividad antioxidante. Con los resultados, se construyeron curvas de dosis-respuesta y una curva sigmoideal para obtener valores de CI_{50} en mg/mL que representan la concentración que inhibe el 50% de la peroxidación lipídica. Para ello, se utilizó el software GraphPad Prism, v. 5.0.

III.6. Determinación de la capacidad antimicrobiana

Se procedió a realizar una prueba de microdilución en caldo para determinar de cada uno de los extractos obtenidos, la concentración capaz de inhibir el 50% del crecimiento visible de una cepa bacteriana dada (CIM_{50}). Como medio de cultivo, se utilizó un medio de crecimiento general, el medio Luria Bertani (LB), que aporta a las bacterias una fuente de sales, vitaminas y proteínas, esenciales para su crecimiento, tal y como también se destacan en otros artículos (Barrajón-Catalán et al., 2010; Hoffman et al., 2006; Laporta et al, 2007a; McGavin et al., 1993; Melaiye et al., 2004; Qazi et al., 2001; Tsai et al, 2011; Vegara et al, 2011; Zhang et al. , 2000).

En un primer cribado se establecieron como objetivos, encontrar tanto la capacidad de inhibición de cada uno de los extractos, como el extracto con mejor CIM_{50} . Las cepas elegidas para conseguir dichos objetivos fueron, un modelo de bacteria Gram-positiva (*S. aureus*) y un modelo de bacteria Gram-negativa (*E.coli*). Ambas bacterias, fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Universitat de Valencia, España (CECT 59 y CECT 515, respectivamente)

Las muestras se analizaron según una modificación del ensayo de micro-dilución en caldo (Iscañ, G et al 2002; Eloff, 1998) tal y como se describe a continuación. Se puso un pre-inóculo de 5 mL en caldo LB (Conda Pronadisa, Europa) a incubar a 37°C durante toda la noche.

Material y métodos

A la mañana siguiente, se preparó un inóculo, usando una dilución al 10% (v/v) de ese preinóculo en el mismo medio, y se incubó durante 4 horas a 37 °C con el fin de asegurar que la bacteria se encontrase en crecimiento exponencial. Después de esta incubación, se realizaron diluciones seriadas de una alícuota de ese cultivo utilizando medio LB, hasta obtener una concentración bacteriana de 10^3 UFC / mL que fue la que se añadió a cada uno de los pocillos de una microplaca, además de 80 μ L del extracto disuelto en PBS. Los extractos se diluyeron en serie en tampón PBS para preparar un intervalo de concentraciones a probar entre 2.000 y 4 μ g / mL.

Para esta prueba de susceptibilidad bacteriana, se realizó un análisis por triplicado en el que cada una de las placas tenía cada concentración a testar por octuplicado. La neomicina (Sigma-Aldrich, Europa) se incluyó en cada ensayo como control negativo de crecimiento microbiano.

Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 16 horas para *E. coli* y 24 horas para *S. aureus*. La supervivencia microbiana después de los tratamientos se midió colorimétricamente usando colorante p-violeta yodonitrotetrazolio (INT) (Sigma-Aldrich, Europa). Para ello, se añadieron 50 μ L de INT a cada pocillo para llegar a una concentración final de 0,25 mg / mL y se incubaron 30 min a 37 °C. Tras la incubación, se midió la señal de color rojo a 570 nm utilizando un espectrofotómetro (SPECTROstar Omega, BMG Labtech GmbH, Offenburg, Alemania).

En la figura 6, se puede ver la microplaca de bacterias después de la primera incubación y tratamiento con INT.

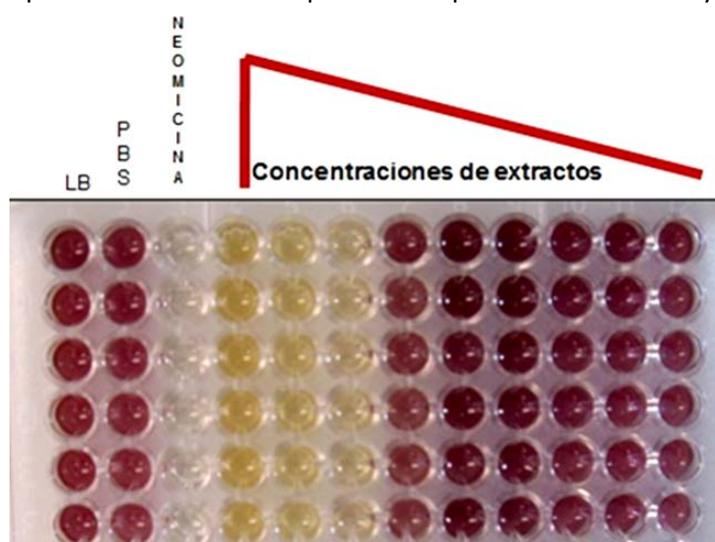


Figura 6. Placa resultante del ensayo de microdilución en placa. Los pocillos coloreados en rojo es donde se observa crecimiento microbiano. Como controles se utilizaron PBS y LB como controles de crecimiento bacteriano y neomicina como control de inhibición de crecimiento.

El software GraphPad Prism (versión 5.0), se utilizó para procesar los resultados y obtener el CIM_{50} (concentración que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano) mediante la aplicación de una curva sigmoïdal con ajuste de pendiente variable a los datos experimentales y la obtención de una gráfica dosis-respuesta. Los datos que muestran el 95% de los intervalos de confianza y el ajuste de la curva (R^2) también fueron proporcionados por el software para todos los datos procesados. Los datos de CIM_{50} registrados en las tablas, se obtuvieron como la media de inhibición bacteriana más la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Por otro lado, también se obtuvo la concentración bactericida mínima (CBM) a partir de una modificación de un ensayo bactericida desarrollado con anterioridad (Vegara et al., 2011).

Dicho ensayo, fue realizado una vez que se terminó el ensayo de dilución de microplacas descrito anteriormente. Para ello, se cogieron 100 μ L de los pocillos donde no se observó ninguna coloración roja por crecimiento microbiano. Estos microlitros se distribuyeron en placas de Petri de 9 cm (Bibby Sterilin Ltd., Stone, Staffordshire, Reino Unido) con medio de agar LB y se incubaron a 37° C durante 24 horas. La concentración mínima bactericida (CBM) del extracto a probar, fue aquella a la cual no se observó ninguna colonia de crecimiento bacteriano.

III.6.1 Ensayos de sinergia

Para llevar a cabo los ensayos de sinergia, se realizaron diferentes mezclas binarias entre los compuestos cuantificados como mayoritarios del extracto *Cistus* más activo.

De cada una de las mezclas, se ensayaron diferentes proporciones para buscar la mejor combinación o combinaciones con efecto sinérgico, que a su vez pudieran corroborar la potencia antibacteriana del extracto.

Los compuestos utilizados, fueron adquiridos comercialmente y disueltos para preparar un stock en MeOH o DMSO dependiendo de su solubilidad.

En primer lugar, se procedió a determinar la inhibición microbiana de los compuestos puros. Para ello, se diluyeron en serie utilizando el medio de cultivo LB para preparar el rango de soluciones de acción a testar con un intervalo de concentración entre 80 y 0,3 $\mu\text{g} / \text{mL}$. El método seguido para este estudio de inhibición, fue el indicado con anterioridad para la actividad antimicrobiana (Tomás-Menor., et al 2013).

Una vez obtenido el CIM_{50} para cada uno de los compuestos, se continuó con el estudio de inhibición para las mezclas de compuestos a diferentes proporciones. La presencia de interacciones sinérgicas se determinó usando el método de isobol, que es una representación gráfica que refleja (Berenbaum, 1989; Wagner, 2011) el valor de actividad que aporta un determinado compuesto a la CIM_{50} de una mezcla para diferentes proporciones. En la figura 7, se puede ver un ejemplo del estudio de esta interacción (Wagner et al., 2009).

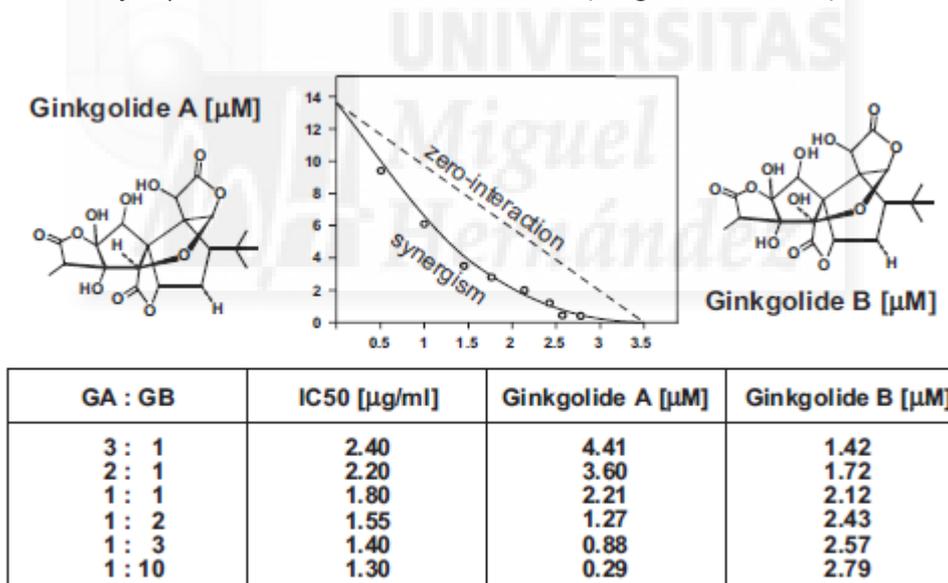


Figura 7. Curva de isobolol con los datos de contribución a la inhibición global (IC_{50}), de diferentes combinaciones de 2 compuestos, el Ginkgolide A y el Ginkgolide B con los que se construye el correspondiente gráfico isobolol.

Los datos experimentales de sinergia para representar el gráfico, se ajustaron utilizando un decaimiento exponencial a través del software GraphPad Prism (versión 5.0).

Además de este método cualitativo, se utilizó un análisis cuantitativo de los resultados mediante el cálculo del valor de FICI (Concentración Inhibitoria Fraccionada) como sigue:

$$FICI = \frac{CIM_{50A \text{ en la combinación}}}{CIM_{50 \text{ del compuesto A sólo}}} + \frac{CIM_{50B \text{ en la combinación}}}{CIM_{50 \text{ del compuesto B sólo}}}$$

donde "A" y "B" son los dos compuestos de la mezcla (Rosato et al., 2007).

El valor de FICI fue interpretado utilizando un criterio descrito previamente (EUCAST 2000): (a) un efecto sinérgico cuando $FICI \leq 0,5$; (b) un efecto aditivo cuando $0,5 < FICI \leq 1$; (c) un efecto indiferente cuando $1 < FICI < 2$; (d) un antagonismo cuando $FICI \geq 2$.

III.6.2 Ensayos de cinética bacteriana

Con dicho ensayo, se monitorizaron las tasas de crecimiento de los organismos diana en presencia de diferentes extractos mediante la adición de una sonda fluorescente (figura 8). El ensayo AlamarBlue® se describe para el cribado de compuestos bioactivos en el análisis de su viabilidad (Lisa A Collins et al., 1997; Vanitha JD et al., 2004).



Figura 8. Curva de crecimiento bacteriano.

Mientras que una bacteria tarda en multiplicarse de 10-20min, el ritmo de crecimiento de los hongos microscópicos (en este caso para *Candida albicans*), oscilará alrededor de las 3h (Ilse Valderrama Heller, 2008).

Los extractos se probaron a 3 concentraciones diferentes: a 500 µg/ mL, 1 mg/ mL o 2 mg/ mL y se utilizó el medio líquido LB para bacterias (*S. aureus* 533R4 Serovar 3 o *E. coli* WA321) y YEPD (Yeast extract peptone dextrose) para *Candida albicans* (BSMY 212).

Material y métodos

Las tasas de crecimiento obtenidas en presencia de los extractos se compararon con el crecimiento de 2 controles, uno fue el organismo diana sin extracto antimicrobiano y otro el organismo diana con un agente antimicrobiano: kanamicina (KM) a 50 mg / L para bacterias (GIBCO-Life Technologies, EE.UU.) y como agente antifúngico se utilizó Delvolid® al 0,2% (p/v) (DSM Food Specialties, Holanda).

Se realizó un recuento inicial de los organismos diana en su fase de crecimiento exponencial para comprobar la población microbiana de partida y sembrándose 10^5 UFC / mL para las bacterias y 10^4 UFC / mL para *C. albicans*.

A cada muestra preparada, se le aplicó una alícuota de la sonda fluorescente AlamarBlue® al 10% (v / v) (Life Technologies™, EE.UU.) para comenzar el ensayo. Se realizaron 10 replicados de cada tratamiento con 2 controles de fondo, los cuales fueron utilizados para realizar la normalización de la fluorescencia de los extractos. Después de añadir cada muestra a la placa, la medida de la fluorescencia se inició en un lector de placas BioTek Synergy™ HT Multi-Modo (Beun De Ronde Life Sciences, Holanda) con los siguientes valores: 12 horas de medida, con una longitud de onda de excitación / emisión de 530 nm y 590 nm, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron a 37°C.

Una vez obtenidos los parámetros de fluorescencia, se procedió a confrontar las medidas de fluorescencia del AlamarBlue assay® con medidas de población microbiana mediante recuentos directos en placa para cada uno de los organismos diana. Para ello, se realizaron comparaciones a los mismos intervalos de tiempo entre las medidas de fluorescencia y el crecimiento microbiano. Posteriormente y con la ayuda de Microsoft Excel® se obtuvo una gráfica de dispersión, en la que se ubicó en el eje X el valor de fluorescencia y en el eje Y el Log10 del valor de recuento microbiano. Con dicha gráfica y mediante un ajuste lineal se obtuvo el valor de la ecuación válido para los cálculos posteriores de población y cinética.

III.7. Estudio de interacción de fitoquímicos con sistemas modelo de membranas

III.7.1 Análisis cuantitativo de la concentración lipídica

Para realizar el análisis cuantitativo de la concentración lipídica tanto de los stocks como de las vesículas lipídicas finales que componen las membranas sintéticas a estudio, se utilizó el ensayo de Fiske. Este método determina el contenido en fosfatos y de ese modo se cuantifica la concentración fosfolipídica de la muestra.

Para ello, se preparó una disolución de K_2HPO_4 a 0,4mM como estándar, a partir de la cual se confeccionó la recta patrón. Tanto para las soluciones lipídicas como para las mezclas lipídicas a estudio, se procedió a seguir el protocolo que se describe a continuación con la adición de reactivos y tiempos de incubación correspondientes.

En primer lugar, se añadieron 0,5 mL de ácido perclórico al 60% y se procedió a una incubación de 30 minutos a 185°C. Después de dejar enfriar los tubos, se le añadieron 4mL de una solución de molibdato, además de 0,5 mL de ácido ascórbico al 10%. Se agitaron vigorosamente y se volvieron a incubar, esta vez durante 15 min a 180-200°C. En esta última incubación, se produce una reacción de reducción del molibdato con el ácido, dando lugar a compuestos coloreados que pueden ser medidos espectrofotométricamente a 812 nm.

Estos compuestos, cuantifican el contenido en fosfatos e indirectamente la concentración lipídica. Para la cuantificación, fue necesaria la confección de una recta patrón con fosfato dipotásico. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado.

III.7.2 Preparación de liposomas

Los lípidos se obtuvieron de Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, EE.UU.) en forma de lípidos liofilizados y se usaron sin purificación adicional.

Las soluciones madre se prepararon disolviendo las cantidades requeridas de diferentes lípidos en cloroformo / metanol, 2:1 (v / v). La mezcla de lípidos junto con la cantidad apropiada de los correspondientes compuestos, se secaron bajo una corriente de N₂ con el fin de obtener una película delgada en la parte inferior de tubos eppendorf. Las últimas trazas de disolvente que pudieran quedar se eliminaron por mantener las muestras a vacío durante 3 h. Los MLVs se formaron por incubación del lípido seco en tampón de hidratación correspondiente durante aproximadamente 30 minutos a temperatura por encima de la temperatura de transición de fase gel a fase líquida cristalina.

Se realizó una agitación vorticial vigorosa ocasional y tres ciclos de congelación-descongelación para favorecer la inclusión en los liposomas de los compuestos a probar.

III.7.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para las medidas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) se utilizó un equipo de alta resolución Microcal MC-2 microcalorímetro diferencial de barrido, equipado con una interfaz de adquisición de datos y utilidad digital de DA-2 para la recogida automática de datos como se describe anteriormente (Caturla et al., 2003; Villalaín et al., 2001; Micol V et al., 2001).

La concentración de lípidos fue de 3 mg / mL teórica para la membrana sintética de *S. aureus* y 5 mg / mL teórica para los lípidos de *E. coli*.

El rango de temperatura de exploración para *S. aureus* se fijó entre 25 y 60°C y el intervalo de temperatura de exploración para *E.coli* se estableció entre -20 y 30°C.

La velocidad de barrido para ambos lípidos se ajustó a 2 ° C / h y el tiempo de equilibrio antes de cada exploración fue de 10 min.

Se realizaron 2 medidas en días independientes y para cada medida, se incluyeron tres ciclos de calentamiento / enfriamiento. Los mejores termogramas se representaron con Origin 8.

III.7.4 Ensayo de liberación de contenidos

Para este ensayo, se prepararon liposomas utilizando la mezcla que simula la membrana de *S. aureus* y la que simula la membrana de *E. coli*, ambas cargadas con la sonda fluorescente carboxifluoresceína (CF).

Los lípidos, una vez secos se resuspendieron en CF a una concentración de 40 mM en el tampón apropiado (Hepes 10 mM, NaCl 100 mM y EDTA 0,1 mM, pH 7,4 para *E. coli* y NaPi 20 mM, pH 7,4 para *S. aureus*).

La concentración de lípidos final fue de 0,125 mM, a la que se le añadieron las cantidades apropiadas de diferentes compuestos en una placa multipocillos, conteniendo cada pocillo, un volumen final de 200 μ L.

Se utilizó un lector de microplacas (FLUOstar, BMG Labtech, GER, EU) para medir los cambios en la intensidad de fluorescencia que se registraron después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente con longitudes de onda de excitación y emisión fijados a 492 y 517 nm, respectivamente (Mayer et al., 1986). Como control para liberar la CF se utilizó Triton X-100. De ese modo, el porcentaje de liberación de CF inducido por los compuestos fenólicos estudiados, se calculó tomando como referencia de fluorescencia máxima, la liberación de CF producida por la adición del detergente Triton X-100 al 1% (p/v).

Los valores de liberación de CF fueron el resultado de tres experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones.

III.7.5 Coeficiente de partición

Para estudiar el reparto preferencial de compuestos polifenólicos por las membranas sintéticas a estudio se utilizaron 2 sistemas, uno lípido/tampón y otro octanol/agua.

Para el primero, se prepararon muestras lipídicas a 2 mM, a la cual, se le fueron añadiendo diferentes titulaciones de compuesto a estudio para formar con ellos MLVs. Una vez formado el MLV con el compuesto, se centrifugó para separar el precipitado y el sobrenadante.

Por otro lado, se analizó también el carácter hidrofóbico de los compuestos mediante el coeficiente de partición n-octanol/agua.

Las dos fracciones obtenidas en ambos ensayos se analizaron por HPLC-DAD-MS / MS utilizando el método descrito previamente en el apartado de cuantificación cromatográfica (Tomás-Menor et al., 2015).

Los coeficientes de partición para un determinado compuesto para ambos sistemas bifásicos (octanol/agua o lípido/agua) fueron determinados mediante el cálculo del equilibrio de ambas fases, dando así una idea de la cantidad de moles de molécula que se encontraría en cada fase cuando el compuesto entra en contacto con el sistema formado.

$$\text{Coeficiente de partición} = \frac{C_{\text{octanol o lípido}}}{C_{\text{agua o tampón}}} = \frac{A_x}{A_0 - A_x}$$

Donde C octanol o lípido y C agua o tampón son las concentraciones de los compuestos estudiados en las fases correspondientes, y A₀ y A_x, los valores de absorbancia inicial y final medidos en la fase orgánica mediante HPLC.

III.7.6 Tamaño de partícula

Se procedió a analizar el tamaño de partícula de los sistemas bacterianos modelo para comprobar la suspensión de LUVs más estable en el tiempo para poder trabajar. Se probaron para ello, diferentes tampones y porcentajes de lípidos siempre basándonos en porcentajes de la literatura.

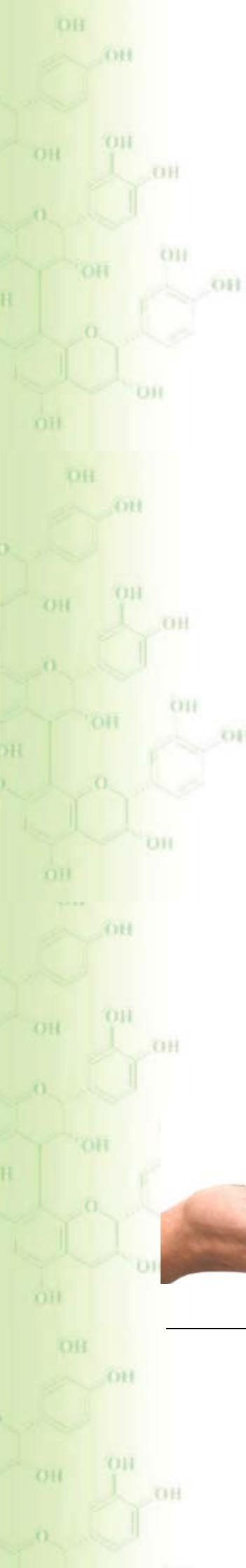
Una vez diseñadas las diferentes muestras a probar se prepararon vesículas de fosfolípidos para el estudio de la dispersión de luz dinámica (DLS). Las muestras se prepararon como se ha descrito anteriormente para los experimentos de DSC y se realizó su posterior extrusión a través de filtros de policarbonato de 0,1 μm .

La distribución del tamaño se obtuvo mediante espectroscopia de correlación de fotones (PCS), método basado en la intensidad de la luz dispersada.

El 90 Plus Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, EE.UU.) fue utilizado para determinar el tamaño medio de las vesículas formadas, distribución de tamaño, y la polidispersidad de los liposomas con las siguientes condiciones: 300 s de tiempo de muestreo, 90° de ángulo de dispersión y temperatura ambiente.

Todas las mediciones se realizaron usando suspensiones LUVs para todas las mezclas a una concentración de 0,4 mM (diluída hasta un 12,5%). Los resultados finales, se derivan de 3 series de medidas y para cada medida se hicieron 50 repeticiones. El software utilizado para procesar los resultados fue la versión 2.5 Brook 90 para el analizador de partículas.

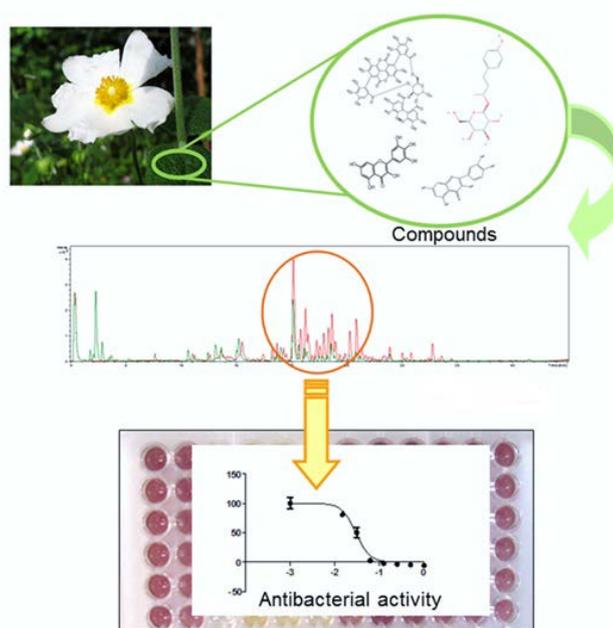




IV. Resultados

Capítulo primero

Correlación entre la actividad antibacteriana y la composición de los extractos derivados de diversas especies de *Cistus* localizadas en España



El objetivo del capítulo primero, fue evaluar la actividad antibacteriana a través del método de microdilución en placa, tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos, de los extractos hidroalcohólicos o acuosos obtenidos a través de diferentes métodos de secado, y derivados de cuatro especies del género *Cistus* especialmente abundantes en la Península Ibérica. Se obtuvieron, un total de tres extractos de cada especie *del género Cistus* (*C. salviifolius*, *C. albidus*, *C. ladanifer* y *C. clusii*), uno derivado de una extracción acuosa y secado por liofilización, y los otros dos, procedentes de una extracción acuosa o hidroalcohólica y posterior secado por atomización (SDY).

Adicionalmente, para el extracto que presentó mejores resultados, se realizó un fraccionamiento y posterior secado por liofilización, recogiendo la fracción no retenida por la resina para comprobar si mostraba algo de actividad. Posteriormente, se analizó la capacidad antibacteriana de todas las fracciones obtenidas con el objetivo de correlacionar esta actividad con la composición polifenólica de los extractos.

IVa.1. Actividad antibacteriana y cuantificación de polifenoles

Anteriores trabajos del grupo de investigación postularon que, además de la fracción terpenoide, la actividad antimicrobiana de los extractos derivados de algunas especies de *Cistus*, también podría estar relacionada con su contenido polifenólico (Barrajon-Catalán et al., 2010). Para explorar más a fondo esta posibilidad, se analizó la capacidad antimicrobiana de extractos derivados de cuatro especies diferentes de plantas *Cistáceas* (*C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. albidus* y *C. clusii*). La selección de las plantas se basó en su abundancia, su adaptación al clima y al suelo de las regiones semiáridas del sureste de España, además de por su fácil procedimiento de cultivo.

En primer lugar, se determinó la concentración mínima necesaria para inhibir el 50% del crecimiento bacteriano para todos los extractos, eligiéndose las bacterias *E. coli* y *S. aureus* como modelos bacterianos Gram-negativos y Gram-positivos respectivamente.

Además, de forma paralela, se determinó el contenido polifenólico total y el contenido de flavonoides (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de CIM₅₀, contenido fenólico y en flavonoides para diferentes extractos de *Cistáceas* obtenidos bajo distintos tipos de extracción y técnicas de secado.

Especies	Extracción / secado		<i>E. coli</i> ^a CIM ₅₀	<i>S. aureus</i> ^a CIM ₅₀	Folin-Ciocalteu ^b	Flavonoides ^c
<i>C. ladanifer</i>	Acuoso/ Liofilización	L1	612 ± 94	569 ± 112	9.94 ± 0.41	0.59 ± 0.01
	Acuoso/ SDY	L2	248 ± 47	151 ± 19	10.20 ± 0.06	0.99 ± 0.02
	Hidroalcohólico/ SDY	L3	113 ± 23	144 ± 16	13.28 ± 0.50	0.88 ± 0.02
<i>C. albidus</i>	Acuoso/ Liofilización	A1	336 ± 106	273 ± 142	10.96 ± 0.14	0.57 ± 0.02
	Acuoso/ SDY	A2	504 ± 129	60 ± 8	19.72 ± 0.74	0.67 ± 0.04
	Hidroalcohólico/ SDY	A3	233 ± 45	292 ± 24	21.79 ± 0.65	1.06 ± 0.04
<i>C. clusii</i>	Acuoso/ Liofilización	C1	1064 ± 350	392 ± 56	3.42 ± 0.18	NE
	Acuoso/ SDY	C2	501 ± 173	91 ± 23	15.47 ± 0.45	0.50 ± 0.02
	Hidroalcohólico/ SDY	C3	116 ± 34	304 ± 35	23.06 ± 0.41	0.73 ± 0.05
<i>C. salviifolius</i>	Acuoso/ Liofilización	S1	221 ± 40	52 ± 18	13.28 ± 0.30	1.36 ± 0.06
	Acuoso/ SDY	S2	289 ± 96	50 ± 2	24.38 ± 0.95	1.05 ± 0.06
	Hidroalcohólico/ SDY	S3	245 ± 91	45 ± 11	27.33 ± 0.20	1.57 ± 0.04

a Inhibición del 50% del crecimiento bacteriano (µg/mL)

b g de equivalentes de ácido gálico / 100 g extracto seco

c mg equivalentes de quercetina / 100 mg extracto seco

NE: No encontrado

Si se observa la actividad de los extractos y el contenido polifenólico total para cada tipo de extracción y secado, se puede ver como el extracto hidroalcohólico secado por pulverización de *C. ladanifer* (L3) mostró una de las actividades antibacterianas más altas, junto con el más alto contenido polifenólico de todas las extracciones probadas. Por otra parte, el extracto acuoso secado por pulverización de la misma planta (L2), fue más potente contra *S. aureus* que contra *E. coli*, hecho que coincide con lo observado en estudios previos (Barrajon-Catalán et al., 2010).

C. albidus y *C. clusii* presentan comportamientos similares, es decir, para ambos extractos hidroalcohólicos (A3, C3), el contenido polifenólico más elevado se correlaciona con la mayor actividad antibacteriana contra *E. coli*.

Al contrario que los extractos realizados con maceración acuosa secados por atomización (A2, C2), que presentaron mejor actividad frente a *S. aureus*. Es destacable la capacidad antimicrobiana del extracto A2 que presentó un valor de CIM₅₀ frente a *S. aureus* de 60,0 µg / mL.

Por último, los extractos de *C. salviifolius* exhibieron la mayor actividad contra *S. aureus* en todas las muestras analizadas, con valores muy bajos CIM₅₀ independientemente de los procesos de extracción y secado utilizados (45-52 µg / mL), comportamiento que podría deberse a un contenido relativamente alto de flavonoides en comparación con el resto de especies de *Cistus*.

IVa.2. Análisis semicuantitativo de la composición de extractos de *Cistus* usando RRLC-ESI-TOF-MS

Para determinar qué compuestos podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana observada, se realizó una identificación preliminar y análisis semicuantitativo (figura 1 y tabla 2) de la composición polifenólica de los diferentes extractos mediante RRLC-ESI-TOF-MS.

Los extractos de *C. ladanifer* acuosos (L1 y L2) e hidroalcohólico (L3) (Figura 1A) mostraron diferencias importantes entre sí. El betulósido (pico 15), fue abundante en los extractos de L1 y L3, pero no se encontró en el extracto L2. El extracto L3 también contenía elevadas cantidades de ácido labdanólico (pico 13), un derivado terpenoide volátil descrito anteriormente (Hanahan y Weinberg, 2000). Este último extracto, también fue especialmente rico en flavonoides y derivados tales como apigenina metiléter (pico 6), kaempferol dimetiléter (pico 10), compuestos que no están presentes en los extractos acuosos y, además, contenía las cantidades más altas de kaempferol diglicósido (pico 24). El ácido quínico, uralenneósido, gentisoil glucósido, 3,4'-dihidroxiopropiofenona-3-β-D-glucósido (picos 4, 7, 11 y 14, respectivamente) y varios elagitaninos, como punicalina, punicalagina y punicalagina galato (picos 28, 29 y 30), también se encontraron en todos los extractos de *C. ladanifer*, tal y como se publicó anteriormente (Barrajon-Catalán et al., 2011; Fernández-Arroyo et al., 2010).

El ácido quínico (pico 4), quercetina-3-O-rutinósido (pico 19) y la quercetina glucósido (pico 21) fueron abundantes en todos los extractos de *C. albidus* (Figura 1B). También se encontraron otros ácidos simples como el ácido arabónico (pico 1), y el uralenneósido (pico 7). Además, fueron especialmente abundantes en el extracto A3, la (epi)-catequina (pico 8) y (epi)-galocatequina (pico 9), siendo destacable en dicho extracto la mayor cantidad de derivados de quercetina, sobre todo glucósidos de quercetina (pico 21), acompañados por otros flavonoles como kaempferol rutinósido (pico 25) y miricetina hexósido (pico 22).

En los extractos de *C. clusii* (figura 1C) se identificaron betulósido (pico 15), kaempferol dimetiléter (máximo 10) y ácido quínico (pico 4) como principales compuestos. Además de encontrarse con una abundancia similar en los 3 extractos de *C. clusii*, el uralenneósido, (epi)-galocatequina y gentisoil glucósido (picos 7, 9 y 11, respectivamente). La isoramnetina--O-rutinósido (pico 27) se identificó en los tres extractos, pero se observó con una mayor abundancia en C2 y C3. La apigenina (pico 6) y el ácido 10- α -labdan-14-oico- metil ester (pico 12) fueron identificados en el extracto hidroalcohólico (C3) pero no se encontraron en el resto de extractos acuosos.

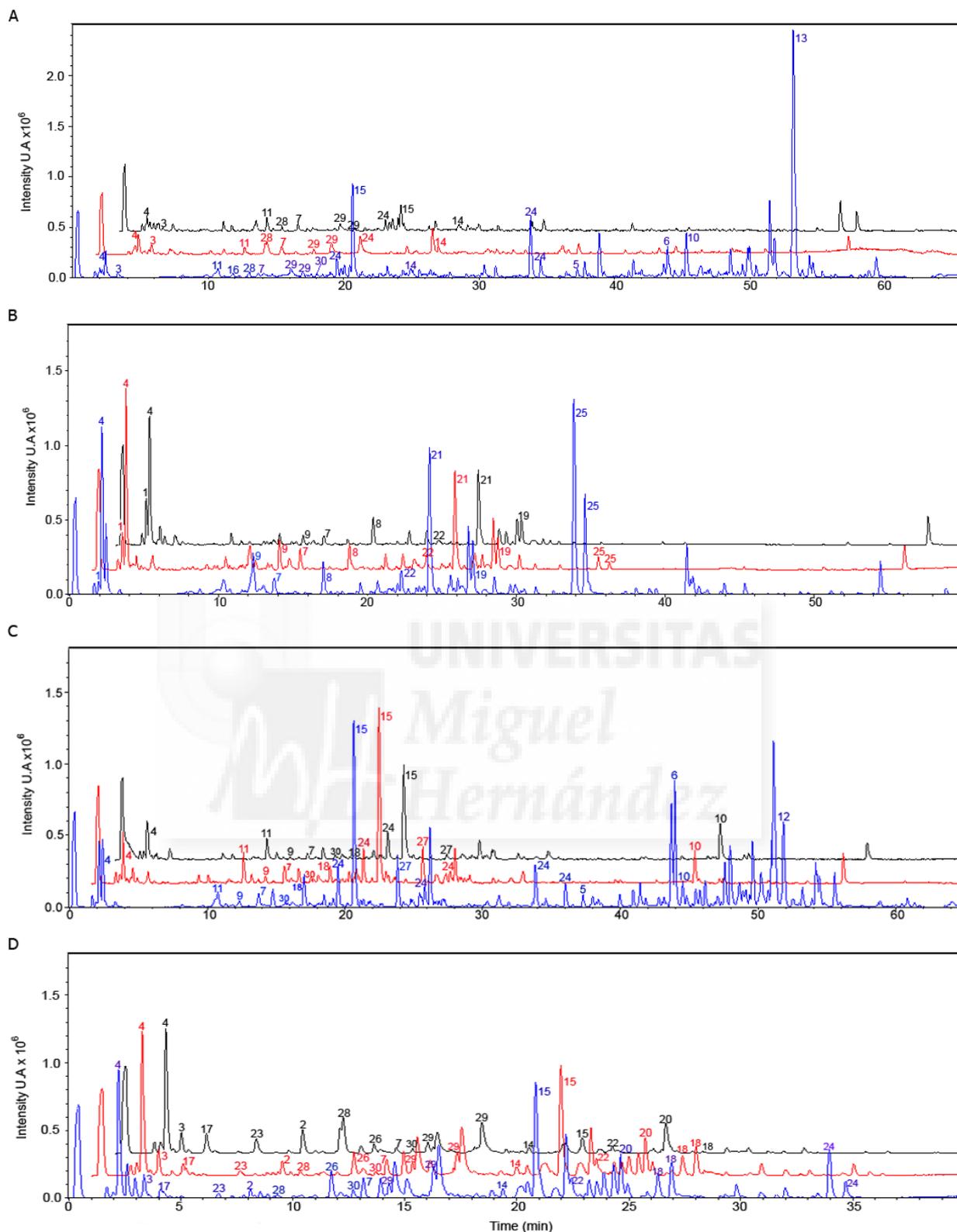


Figura 1. Cromatograma de pico base RRLC-ESI-TOF-MS de los extractos derivados de diferentes especies de *Cistus*: *C. ladanifer* (A); *C. albidus* (B); *C. clusii* (C); *C. salviifolius* (D). El número indica el tipo de extracción de acuerdo con la Tabla 1 (1 y línea negra para la extracción acuosa y liofilización; 2 y línea roja para la extracción acuosa y secado por SDY; 3 y línea azul para la extracción hidroalcohólica y secado por SDY).

En los extractos de *C. salviifolius*, el ácido quínico (pico 4) fue el compuesto mayoritario (Fig. 1D), aunque este compuesto también estuvo presente en los extractos procedentes de las otras plantas. Los ácidos gálico (pico 2) y siquímico (pico 3), un derivado del ácido ascórbico (pico 17) y betulósido (pico 15) estuvieron presentes en los tres extractos de *C. salviifolius*, además de varios elagitaninos, tales como punicalina, punicalagina, y galato de punicalagina (picos 28, 29 y 30), y un dímero de galocatequina (pico 26). También se encontraron flavonoles como, por ejemplo, glucósidos de miricetina (picos 20 y 22) y un glucósido de quercetina (pico 18), que no estaban presentes en S1. Sin embargo, el kaempferol diglicósido (pico 24) sólo se identificó en el S3.

Aunque el análisis semicuantitativo de la composición de los extractos utilizando RRLC-ESI-TOF-MS no reveló grandes diferencias entre los cuatro extractos de *Cistus*, sí pueden hacerse algunas observaciones con la intención de establecer una posible correlación entre la composición y las actividades antimicrobianas de los mismos. Así, los ácidos simples, como el ácido gálico y algunos derivados de flavonoles tales como la quercetina glicosilada y derivados de miricetina (compuestos relativamente polares), fueron especialmente abundantes en extractos de *C. albidus*, *C. clusii* y de *C. salviifolius*. Por el contrario, el ácido labdanoico, betulósido, apigenina, derivados de kaempferol, galocatequina y epigalocatequina, fueron los compuestos más abundantes en los extractos que mostraron la actividad más potente contra *E. coli*, es decir, los extractos hidroalcohólicos de *C. ladanifer* y de *C. clusii*.

ESI(-)TOF Exp. Acc. Mass [M-H]-	Compuesto propuesto	Número pico	Extracto									S1	S2	S3
			L1	L2	L3	A1	A2	A3	C1	C2	C3			
165.0479	Ácido arabónico	1	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	-	-
169.015	Ácido gálico	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+
173.0458	Ácido siquímico	3	++	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++
191.0559	Ácido quínico	4	+	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++
269.0448	Apigenina	5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
283.0609	Apigenina metiléter	6	-	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
285.0617	Uralennoésido	7	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
289.0718	(-) (Epi)catequina	8	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-
305.0652	(Epi)galocatequina	9	-	-	-	+	++	++	+	+	+	-	-	-
313.07818	Kaempferol dimetiléter	10	-	-	++	-	-	-	++	++	+	-	-	-
315.0696	Gentisoil glucósido	11	++	+	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-
321.2352	Ácido 10- α -Labdan-14-oico metilester	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
323.2	Ácido labdanólico	13	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
327.1071	3,4'-Dihidroxipropiofenona-3- β -D-glucósido	14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
327.1522	Betulósido	15	++	-	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+
331.0677	Glucogalina	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
337.075	Ácido ascórbico glicósido	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+
433.077	Quercetina glicósido	18	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+	+++	+++
447.0824	Quercetina 3-O-rutinósido	19	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-
449.0719	Miricetina 3-arabinósido	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
463.0873	Quercetina glucósido	21	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-
479.0831	Miricetina hexósido	22	-	-	-	+	++	++	-	-	-	+	+++	+++
481.0632	Hexahidroxi difenoil-D-glucósido	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
593.1202	Kaempferol diglicósido	24	+	+	++	-	-	-	+	++	+++	-	-	+++
593.1483	Kaempferol 3-rutinósido	25	-	-	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-
609.1214	Galocatequina-(4 α -8)-Galocatequina	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++
623.1612	Isoramnetina-O-rutinósido	27	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-
781.0531	Punicalina	28	+	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+
10830.565	Punicalagina	29	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
12510.691	Punicalagina galato	30	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabla 2. Estimación semicuantitativa de los principales compuestos identificados en los diferentes extractos de *Cistáceas* por RRLC-ESI-TOF-MS. Presencia de compuestos: -, no detectados; +++, Área > 4000000; ++, 4000000 > área > 1000000; + 1000000 > área. Los números de pico corresponden a los de la fig. 1. (L para *C. ladanifer*, A para *C. albidus*, C para *C. clusii* y S para *C. salviifolius*). El número indica el tipo de extracción (1 para la extracción acuosa y secado por liofilización; 2 para la extracción acuosa y secado por SDY; 3 para la extracción hidroalcohólica y secado por SDY).

IVa.3. Estudio de la actividad antibacteriana y antioxidante de la fracción polifenólica del extracto de *C. salviifolius* y estudio de la influencia de la estacionalidad en su composición.

Debido a la fuerte actividad inhibidora del extracto de *C. salviifolius* mostrada frente a *S. aureus*, se decidió realizar un fraccionamiento del mismo mediante cromatografía para caracterizar las fracciones obtenidas y compararlas tanto en composición como en actividad con el extracto inicial. Para este objetivo, se seleccionó el extracto acuoso de *C. salviifolius* secado por atomización (S2), el cual fue fraccionado utilizando una columna de cromatografía de afinidad que contenía una resina de Amberlite. Además, el procedimiento utilizado para obtener este extracto suponía un proceso de escalado industrial que era más económico, respetuoso con el medio ambiente y mediante este procedimiento, se obtenía el mayor rendimiento así como el mayor contenido polifenólico (Tabla 1).

La primera consecuencia de este fraccionamiento, fue un aumento sustancial en el contenido de polifenoles y flavonoides en comparación con el extracto inicial S2 (Tabla 3). Tanto la fracción polifenólica retenida y eluída posteriormente con etanol (S2a), como la fracción no retenida (S2b) fueron evaluadas para comprobar su actividad antibacteriana (Tabla 3). La fracción S2a presentó la mayor actividad antimicrobiana contra ambas cepas bacterianas, siendo especialmente potente contra *E. coli*. En cuanto a la fracción S2b, exhibió mayor actividad contra *E. coli* que la fracción S2. Si se comparan las curvas de dosis-respuesta para S2 y su fracción purificada, fracción S2a (figura 2), se observa una fuerte disminución del CIM₅₀ para ambas bacterias, además de un aumento de la cooperatividad para el caso de *E. coli*, lo que indica un mecanismo de acción más selectivo en el caso del extracto enriquecido mediante fraccionamiento.

Tabla 3: Valores CIM₅₀, CBM, contenido fenólico y contenido en flavonoides de diferentes extractos de *C. salviifolius* obtenidos por extracción directa acuosa/spray drying y aquellos obtenidos después del fraccionamiento.

Extractos		<i>E. coli</i> ^a CIM ₅₀	<i>S. aureus</i> ^a CIM ₅₀	<i>E. coli</i> ^b CBM	<i>S.aureus</i> ^b CBM	Folin- Ciocalteu ^c	Flavonoides ^d
Acuoso / SDY ¹	S2	289 ± 96	50 ± 2	500	125	24.38 ± 0.95	1.05 ± 0.06
Fraccionado H ₂ O/ liofilización ¹	S2a	14 ± 2	11 ± 1	62	31	36.80 ± 0.15	2.10 ± 0.18
FT H ₂ O/ liofilización ¹	S2b	195 ± 24	77 ± 89	500	250	14.84 ± 0.84	NE
Acuoso / SDY ²	S4	74 ± 12	74 ± 12	125	125	45.13 ± 0.32	2.07 ± 0.01

a Concentración mínima que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano (µg/mL).

b Concentración bactericida mínima (µg/mL).

c g de equivalentes de ácido gálico /100 g de extracto de peso seco.

d mg de equivalentes de quercetina /100 mg de extracto de peso seco.

1 Material recolectado en noviembre.

2 Material recolectado en agosto

FT Fracción no retenida durante el proceso de fraccionamiento

NE No encontrado

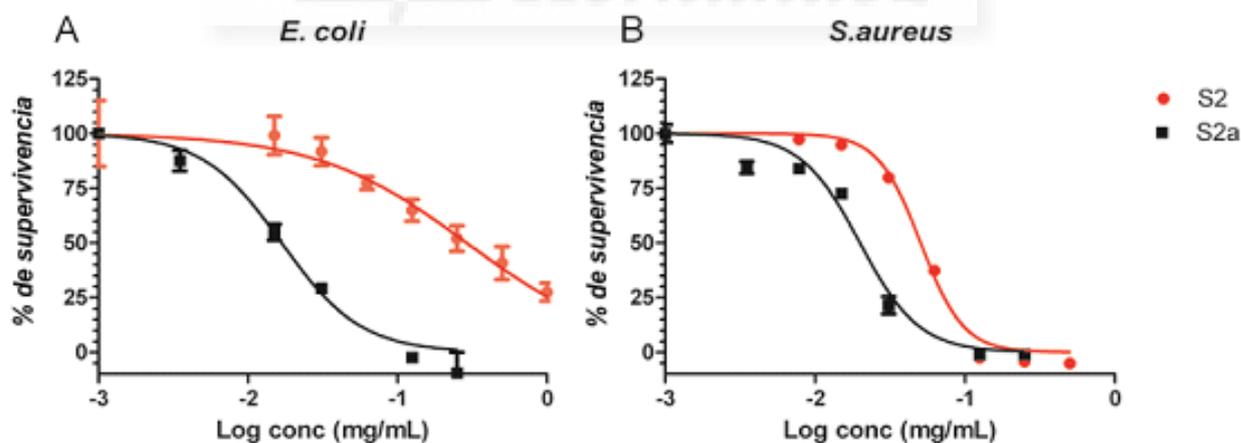


Figura 2. Gráficos de supervivencia de *E. coli* (A) y *S. aureus* (B) en presencia de concentraciones crecientes del extracto acuoso de *C.salviifolius* S2 y su extracto fraccionado S2a.

Por otro lado, los extractos procedentes de las plantas *Cistáceas* han demostrado previamente tener variabilidad en su composición dependiendo de la estacionalidad (Chaves et al., 1997, 2001; Sosa et al., 2005). Por lo tanto, para comprobar si la estacionalidad de recolección influía en su composición, otra muestra de *C.salviifolius* fue recolectada después de la temporada de floración, es decir, en una fecha entre agosto-septiembre y procedente de la misma plantación que la muestra S2, la cual fue recogida en noviembre. Este nuevo periodo de recolección, correspondería con una mayor exposición solar, hecho que debería producir una mayor síntesis de polifenoles (extracto S4).

Tal y como se esperaba, el extracto S4 exhibió un contenido en polifenoles y flavonoides casi dos veces mayor que el S2 (Tabla 3), debido probablemente a un aumento de la síntesis de los polifenoles de las plantas durante el verano como una respuesta de protección a la radiación UV. Este extracto (S4) también mostró una mayor capacidad antibacteriana contra *E. coli* que el S2, y casi comparable a la del extracto purificado S2a, llegando a mostrar una capacidad de inhibición 20 veces y 4,5 veces mayor contra *E. coli* y *S. aureus* respectivamente, en comparación con S2.

La actividad bactericida de los extractos acuosos S2, S2a, S2b y S4, también fue analizada con el fin de comprobar si los extractos de *C. salviifolius* eran capaces de acabar con la población total de bacterias inoculada. El extracto S2a se mostró como un buen bactericida frente a ambas cepas, hecho que no ocurrió con el extracto S2 (tabla 4). El extracto S2a, mostró los valores más potentes de CBM, destacando, sobre todo, los valores frente a *S. aureus* (31,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Estos resultados, junto con los valores anteriormente citados del CIM_{50} , indican un claro enriquecimiento en compuestos que promueven la acción antibacteriana.

Por otra parte, los extractos que tuvieron un alto contenido en polifenoles, tales como S2, S2a y S4, mostraron a su vez una gran capacidad antioxidante, determinada a través de un panel de determinaciones de capacidad antioxidante (Tabla 4).

Como era de esperar, el extracto S2a exhibió la capacidad antioxidante más potente en casi la totalidad de los ensayos, en consonancia con su gran contenido en polifenoles. El extracto S4, que se recolectó en agosto, mostró similares valores antioxidantes al S2a, que se había obtenido a través de purificación cromatográfica. Estos valores de capacidad antioxidante, fueron aproximadamente 4-10 veces más altos que los mostrados previamente para otros extractos de la misma familia (Barrajón-Catalán et al., 2010) y los valores antioxidantes de TBARS de los extractos de *C. salviifolius* fueron superiores a los exhibidos por extractos con una capacidad antioxidante potente (Laporta et al., 2007) o comparables a los observados para compuestos puros tales como vesbascósido o quercetina (Funes et al., 2009).

Tabla 4. Valores de diversas medidas antioxidantes obtenidos de los diferentes extractos acuosos de *C. salviifolius* también representados en la Tabla 3. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar, (n = 8).

Extractos de <i>C. salviifolius</i>		TEAC (TE) ^a	FRAP ^b	ORAC (TE) ^c	TBARS ^d (Cl ₅₀)
Acuoso / SDY ¹	S2	247.64 \pm 8.48	318.75 \pm 10.30	3545.28 \pm 49.67	0.011 \pm 0.003
Fractionado H ₂ O/ liofilización ¹	S2a	357.99 \pm 6.15	652.99 \pm 10.83	5259.64 \pm 35.07	0.004 \pm 0.001
Acuoso / SDY ²	S4	365.85 \pm 5.28	435.77 \pm 5.87	5459.00 \pm 66.53	0.007 \pm 0.003

a Equivalentes Trolox (mmol TE/100 g dw).

b mmol Fe²⁺/100 g dw.

c Equivalentes Trolox (μ mol TE/g dw).

d Valor de Cl₅₀ para la inhibición de la peroxidación lipídica: mg/mL.

1 Material recolectado en noviembre.

2 Material recolectado en agosto.

IVa.4. Estudio detallado de la composición de los extractos acuosos de *C. salviifolius* utilizando RRLC-ESI-TOF-MS

Para identificar los compuestos potencialmente responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos más activos de *C. salviifolius* (S2, S2a y S4), se realizó un estudio detallado de la composición de estos extractos utilizando RRLC-ESI-TOF-MS.

Como se observa en los perfiles de espectrometría de masas RRLC (figura 3), la composición de estos extractos es extremadamente compleja. En la Tabla 5 se muestran los tiempos de retención de los compuestos identificados y un análisis semicuantitativo a partir de las áreas de los picos de los compuestos identificados en los tres extractos.

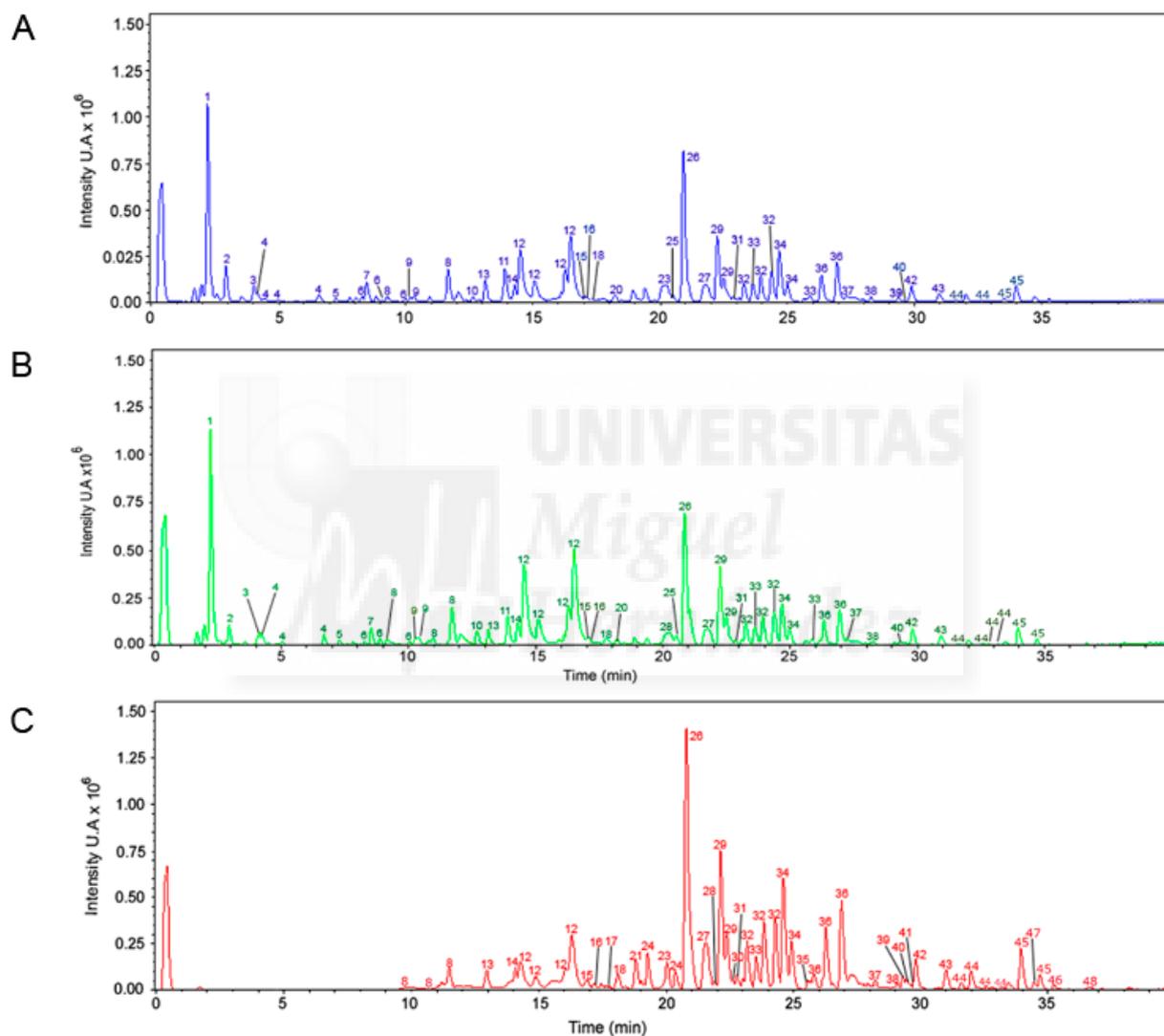


Figura 3. Cromatograma de pico base por RRLC-ESI-TOF-MS de los extractos acuosos de *C. salviifolius*. S2 (A), S4 (B), S2a (C). Los datos más relevantes de MS para todos los picos se muestran en la Tabla 5.

Se determinaron un total de 48 fórmulas moleculares que correspondieron a los 48 picos observados en el cromatograma, de las cuales, 39 se identificaron utilizando los datos precisos de m/z obtenidos a través del TOF para las diferentes muestras de los extractos de *C. salviifolius*.

Los ácidos simples (ácidos quínico y siquímico), flavanoles (catequinas), betulósido (rododendrina), ácido gálico y derivados de ácido elágico (punicalaginas y punicalinas) y flavonoles glicosilados (miricetina y quercetina glucósidos) fueron los compuestos más abundantes en todas las muestras de *C. salviifolius*.

Tabla 5. Datos espectrales relevantes y áreas de los picos de los compuestos identificados en los extractos acuosos de *C. salviifolius* por RRLC-ESI-TOF-MS. Los números de los picos corresponden a los mostrados en la figura 3.

Tiempo de retención (TR) (min)	Identificación	Pico	Área		
			S2	S2a	S4
2.26	Ácido quínico	1	8825814		9453396
2.98	Ácido siquímico	2	1510173		804404
4.08	Ácido ascórbico glicósido	3	738455		544406
4.21	Hexahidroxidifenoil-D-glucosa I (isómero)	4	420910		566283
4.49	Hexahidroxidifenoil-D-glucosa II (isómero)	4	53670		106070
5.00	Hexahidroxidifenoil-D-glucosa III (isómero)	4	150028		208650
6.72	Hexahidroxidifenoil-D-glucosa IV (isómero)	4	385317		465430
7.29	Arbutina	5	129424		234484
8.09	Glucogalina I (isómero)	6	167638		25008
8.50	Ácido gálico	7	952231		751483
9.12	(-)-(Epi)galocatequina-(epi)galocatequina dímero I (isómero)	8	75151	322421	220759
10.82	(-)-(Epi)galocatequina-(epi)galocatequina dímero II (isómero)	8		457609	209865
11.74	(-)-(Epi)galocatequina-(epi)galocatequina dímero III (isómero)	8	1672211	1187673	1942534
8.09	Glucogalina II (isómero)	6	231642		307276
8.87	Glucogalina III (isómero)	6	145472		195056
10.23	Punicalina I (isómero)	9	151965		257665
10.35	Punicalina II (isómero)	9	283800		390862
12.66	Epigalocatequina	10	180254		742976
13.91	Uralenneósido	11	1686905		1465160
14.52	Punicalagina	12	3861955	2119931	5728138
15.08	Punicalagina galato	13	1549911	1018042	1731421
14.11	Prodelfinidina B2, 3'-O-galato	14	840094	1378171	993475
16.49	fragmento de punicalagina (isómero)	12	4769833	4532601	6861677
17.05	Cornusiina B	15	250560	652657	381170
17.32	(-)-(epi)catequina	16	22876	229041	17170
17.67	Ácido vanilínico β-glucósido	17		92776	
18.24	Naringenina dihexósido	18	347846	921102	227723
18.41	Desconocido	19		176435	
18.48	3,4'-Dihidroxiopropiofenona-3-β-D-glucósido	20	89840		68284
18.94	Desconocido	21		1552019	
19.15	Vomifoliol β-D-glucopiranosido	22	104823	282567	52075
20.04	1-O-β-D-(6'-O-Galloil)glucuropiranosil-3-metoxi-5-hidroxi-benzo	23		1691557	
19.29	Desconocido	24		1881012	
20.50	(-)-(Epi)galocatequina galato	25	311407	979819	396667
20.92	Betulósido	26	8408892	15977041	8068000
21.80	Daidzin 6''-O-acetato	27	1853812	4369759	1717758

21.92	Desconocido	28		359065	
22.25	Miricetina hexósido I (isómero)	29	3357129	7235765	3960995
22.49	Miricetina hexósido II (isómero)	29	1539125	3005835	1613762
23.29	Desconocido	30		378083	
22.86	Quercetina diglicósido	31	273922	701364	193556
23.11	Miricetina 3-arabinósido I (isómero)	32	158751	371934	155763
23.63	Ácido elágico -7-xilósido	33	978612	1852009	880306
23.94	Miricetina 3-arabinósido II (isómero)	32	1358646	3595339	1331687
24.37	Miricetina 3-arabinósido III (isómero)	32	1607473	3845340	1715921
24.68	Quercetina glucósido I (isómero)	34	2785871	6184886	2128048
24.99	Quercetina glucósido II (isómero)	34	1047897	2854565	862214
25.63	Secoisolariciresinol β-D-glucósido	35	144060	377298	268276
25.87	Quercetina glicósido I (isómero)	36	367069	1056520	278714
26.33	Quercetina glicósido II (isómero)	36	1379491	3574817	1356858
26.93	Quercetina glicósido III (isómero)	36	1941852	4954426	1705299
27.31	Lioniresinol 3α-O-L-ramnósido	37	137675		145246
28.26	Desconocido	38	169923	369769	138390
28.76	Isosibiricina	39	143241	64258	
29.27	Catequina 3-O-α-L-ramnopiranosido	40	214327	457027	118748
29.42	Miricetina	41		520694	
29.85	Tetrahydroxiestilbeno glucósido	42	884437	1583853	730208
30.93	Desconocido	43	465484	1143508	604583
31.60	Quercetina-coumaroil hexósido I (isómero)	44	77652	381395	209865
31.99	Quercetina-coumaroil hexósido II (isómero)	44	325922	1024248	1942534
32.22	Quercetina-coumaroil hexósido III (isómero)	44		99508	90628
33.95	Kaempferol diglicósido I (isómero)	45	796265	2279245	868884
33.15	Quercetina-coumaroil hexósido IV (isómero)	44		150884	240455
32.75	Desconocido	46		131192	
34.41	Quercetina	47		392322	
34.69	Kaempferol diglicósido II (isómero)	45	249665	829600	286276
36.63	Desconocido	48		59742	

Al comparar la composición de los 3 extractos de *C. salviifolius* se observa que, a pesar de que tienen en común hasta un total de 24 compuestos en los 3 extractos y hasta 36 compuestos para los extractos S2 y S4, hecho normal para estos últimos porque derivan de la misma materia prima, existen diferencias significativas entre los perfiles. Por una parte, la purificación del extracto S2 mediante cromatografía, dio lugar a una disminución significativa en el número de compuestos polares, los cuales se observan a tiempos de retención hasta aproximadamente 15 min (ácidos simples, ácidos fenólicos, galotaninos y derivados de la hexahidroxifenil glucosa), aun así, este extracto mantiene 31 compuestos en común con su extracto original. Por otra parte, la mayoría de compuestos hidrofóbicos, tales como flavonoles glicosilados y otros flavonoides, aumentaron significativamente en comparación con los extractos originales S2 y S4.



Los extractos de plantas *Cistáceas* han demostrado tener una actividad relevante contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, tal y como se describe en el capítulo primero, en trabajos previos del grupo y es corroborado por otros trabajos que estudian las plantas *Cistáceas* recolectadas de otras zonas geográficas (Barrajon-Catalán et al, 2010; Tomás-Menor et al, 2013; Güvenç et al., 2005; Bedoya et al., 2009). De todos los extractos cribados de este género, los extractos de *C. salviifolius* recolectados de la zona alicantina y obtenidos mediante extracción acuosa, son los que presentaron una actividad antimicrobiana más alta contra *S. aureus* (Tomás-Menor et al., 2013).

Una primera aproximación a la composición polifenólica de este extracto, reveló que los compuestos principales eran los elagitaninos (Barrajon-Catalán et al., 2011). Esta composición quedó detallada gracias a la identificación semicuantitativa realizada en el apartado anterior por RRLC-ESI-TOF-MS, identificándose más compuestos que en el análisis de partida y que podrían resultar de interés para la actividad antimicrobiana. Estos compuestos, podrían ser los pertenecientes a la familia de los flavanoles y flavonoles (Tomás-Menor et al., 2013).

Tanto los flavonoides como los elagitaninos de extractos vegetales tienen una actividad antimicrobiana reconocida (Howell y D'Souza, 2013; Machado et al., 2002; Ong y Khoo, 1997; Taguri et al., 2004). No obstante, sólo para los flavanoles como las catequinas y derivados y para los flavonoles como quercetina o kaempferol, se han realizado la mayor parte de estudios de sinergia publicados en combinación con los tratamientos existentes para la terapéutica actual antimicrobiana. Estos flavonoides, han sido testados bien como compuestos puros (Camargo et al., 2011; Eumkeb et al., 2012a), o formando parte de los compuestos mayoritarios de un extracto (Aiyegoro et al., 2010; Aiyegoro et al., 2009; Eumkeb et al., 2012b), y la sinergia que exhiben en combinación con los antibióticos actuales, da lugar en la mayoría de los casos a una disminución de la resistencia antibiótica.

Para la familia de los elagitaninos se han encontrado muy pocas referencias bibliográficas sobre sinergia, existiendo un estudio que sólo se centra en las combinaciones de un producto natural botánico rico en ácido elágico y sus derivados (*Rubus ulmifolius*) con la oxacilina o clindamicina, y cuya finalidad es la de inhibir el biofilm bacteriano (adherencia a un sistema vivo o inerte de un grupo bacteriano, frente a cepas de *S.aureus* que provocan infecciones en piel y tejidos blandos (Cassandra et al., 2012).

En el presente capítulo, se ha examinado la interacción sinérgica de diferentes combinaciones binarias entre los principales polifenoles del extracto acuoso de *C. salviifolius* contra *S. aureus*, con el fin de comprobar si las mejores combinaciones de compuestos a las que se observa un incremento en la actividad antibacteriana, son las mismas que se encuentran en el extracto.

El método isobolol (Wagner, 2011) y el cálculo FICI (Rosato et al., 2007) descritos previamente, se han utilizado para valorar las diferentes combinaciones de los compuestos y el posible efecto sinérgico.

IVb.1. Cuantificación de los polifenoles de *C. salviifolius* S2a y elección de los compuestos para los estudios de sinergia

En el presente capítulo se ha realizado una evaluación sistemática de los principales compuestos que se encuentran en el extracto clasificado como más activo en el capítulo primero de resultados, tanto a nivel de inhibición de crecimiento bacteriano como de actividad bactericida, es decir, el extracto acuoso fraccionado S2a (Tomás-Menor et al., 2013).

Para este propósito, y para corroborar la identificación de los compuestos mayoritarios de este extracto, se procedió a cuantificar el extracto por HPLC-DAD-ESI-IT-MS / MS utilizando los estándares adecuados, tal y como se menciona en la sección de Material y Métodos.

Los compuestos identificados como los más abundantes fueron seleccionados para los estudios posteriores de sinergia. Para proceder a dicha cuantificación, se escogieron varios compuestos que se utilizaron como estándares puros para cromatografía disponibles comercialmente y que tenían una estructura química similar a los compuestos del extracto. Los patrones elegidos fueron los siguientes: catequina, ácido elágico, ácido gálico, punicalagina y quercetina. La tabla 1 muestra el patrón utilizado para cada compuesto identificado. Por ejemplo, se cuantificaron con un patrón de catequina las áreas de los picos de galocatequina, epigalocatequina galato y de prodelfinidina.

La cuantificación realizada, muestra dos grandes familias de compuestos polifenólicos (Tabla 1 y figura 1). Por un lado la familia de elagitaninos, compuesta por punicalina, punicalagina, punicalagina galato y el monómero de ácido elágico, y por otro lado la familia de los flavonoides, algunos de los cuales pertenecen a la subfamilia flavanoles (monómero y dímero de epigalocatequina) y el resto, forman parte de la subfamilia de los flavonoles (miricetina, quercetina y kaempferol glucósidos).

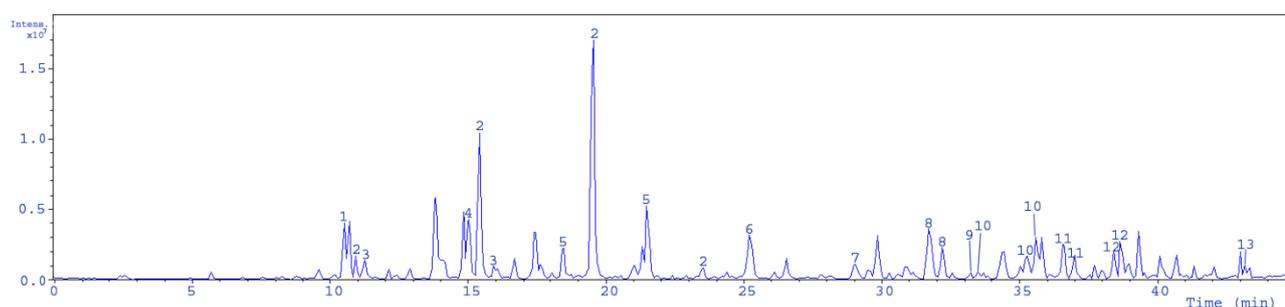


Figura 1. Cromatograma de pico base obtenido por HPLC-ESI-IT-MS / MS, del extracto acuoso *C. salviifolius* (S2a) obtenido por cromatografía de afinidad usando la resina Amberlite. Los números de los picos identificados corresponden a los números mostrados en la Tabla 1.

TR (min)	[M-H] ⁻	Ms/Ms	Compuestos cuantificados	Pico n°	% del total del extracto (w/w)	% del total de polifenoles (w/w)
10.5	609	423, 441	Dímero de (-)-(Epi)galocatequin-(epi)galocatequina (2)	1	0.19	0.51
10.9	1083	781, 601,301	Punicalagina isómero I (1)	2	0.40	1.09
11.3	781	601, 721	Punicalina isómero I (1)	3	0.49	1.33
15.1	761	609, 423	Prodelfinidina B2-3'-O-galato (2)	4	0.27	1.10
15.4	1251	781, 601,301	Punicalagina isómero II (1)	2	1.70	4.63
15.9	781	601, 721	Punicalina isómero II (1)	3	0.34	0.92
18.5	1251	1207	Punicalagina galato isómero I (1)	5	1.01	2.75
19.6	1083	781, 601,301	Punicalagina isómero III (1)	2	3.05	8.28
21.5	1251	1207	Punicalagina galato isómero II (1)	5	2.10	5.71
23.5	1083	781, 601,301	Punicalagina isómero IV (1)	2	1.21	3.29
25.2	327	165,101	3,4'-Dihidroxiopropiofenona-3-β-D-glucósido (5)	6	0.76	2.07
29.0	457	259, 329	Epigalocatequin galato (2)	7	0.93	2.53
31.7	479	315	Miricetina hexósido isómero I (4)	8	1.71	4.66
32.2	479	315	Miricetina hexósido isómero II (4)	8	1.08	2.94
33.2	595	301	Quercetina diglicósido (4)	9	0.80	1.78
33.5	449	317	Miricetina 3-arabinósido isómero I (4)	10	1.06	2.88
35.2	449	317	Miricetina 3-arabinósido isómero II (4)	10	0.82	2.24
35.6	449	317	Miricetina 3-arabinósido isómero III (4)	10	0.99	2.69
36.5	463	301,151	Quercetina glucósido isómero I (4)	11	2.45	10.05
36.9	463	301,151	Quercetina glucósido isómero II (4)	11	1.68	4.56
38.4	433	301	Ácido elágico -7-xilósido isómero I (3)	12	0.80	2.16
38.6	433	301	Ácido elágico -7-xilósido isómero II (3)	12	1.51	4.10
43.1	593	447, 285	Kaempferol diglicósido isómero I (4)	13	0.13	0.36
43.3	593	447, 285	Kaempferol diglicósido isómero II (4)	13	0.38	1.04

Tabla 1: Resultados de la cuantificación por HPLC-DAD-ESI-IT-MS / MS para los polifenoles identificados en el extracto de *C. salviifolius* S2a. Los compuestos se cuantificaron como equivalentes de punicalagina (1), catequina (2), ácido elágico (3), quercetina (4) o ácido gálico (5), dependiendo de la estructura química. Los colores indican la familia en la que los compuestos están agrupados.

En conjunto, estas familias representaron aproximadamente el 70% de los polifenoles totales del extracto (tabla 2) distribuyéndose en un 34% de elagitaninos y un 37% de flavonoides totales.

Compuestos cuantificados con equivalentes de	Familia	% del total del extracto (w/w)	% del total de polifenoles (w/w)
Catequina	Flavonoles	1.39	3.76
Punicalagina	Elagitaninos	10.3	28.00
Ácido gálico	Otros	0.76	2.05
Quercetina	Flavonoles	11.1	33.20
Ácido elágico	Elagitaninos	2.31	6.26

Tabla 2. Porcentaje de distribución de los compuestos del *C. salviifolius* S2a por familias mayoritarias

Los elagitaninos y flavonoides, fueron las familias de compuestos con una mayor concentración, por tanto, se decidió estudiar los compuestos más abundantes pertenecientes a ambas familias. De ese modo, de los elagitaninos se seleccionó a la punicalagina (P) y al ácido elágico (AE); y de los flavonoles a la quercetina-glucósido (Q3G) y la miricetina (M) (figura 2). Los compuestos fueron adquiridos de forma comercial.

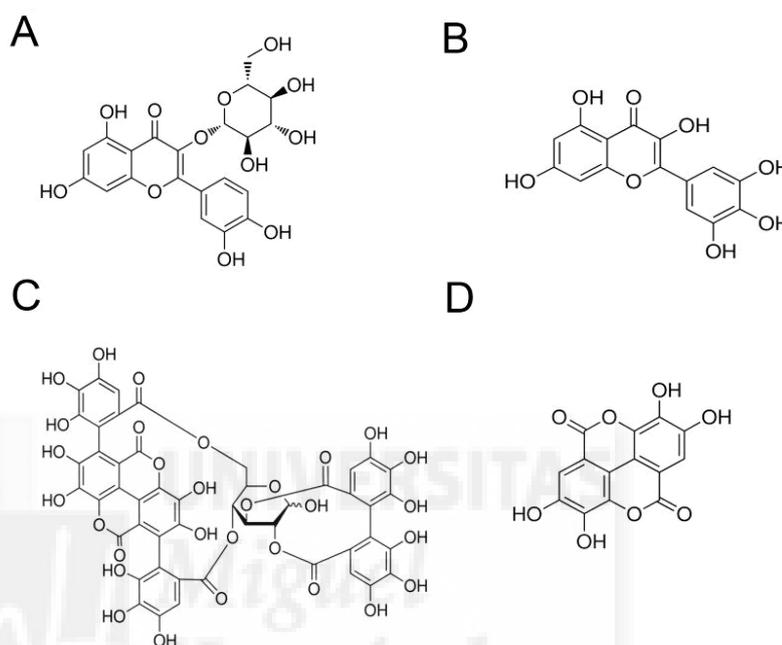


Figura 2. Estructuras de los compuestos elegidos para estudiar los posibles efectos sinérgicos existentes en el extracto de *C. salviifolius* (A) Q3G; (B) M; (C) P; (D) AE.

IVb.2. Estudio isobolográfico del efecto sinérgico de los polifenoles seleccionados derivados del extracto S2a de *C. salviifolius*

Para el presente estudio, las pruebas de sinergia para los compuestos puros seleccionados, se centraron en las estimaciones de inhibición bacteriana de un microorganismo, el *S. aureus*.

En primer lugar, se determinó la concentración inhibitoria mínima requerida para inhibir el crecimiento del 50% de la población bacteriana (CIM₅₀), para cada uno de los compuestos seleccionados de forma individual, siguiendo el método de microdilución en placa de 96 pocillos y usando el reactivo de INT para determinar el crecimiento microbiano.

A continuación y una vez conocida la inhibición de los compuestos puros, se procedió al análisis de la capacidad antimicrobiana de combinaciones binarias de los compuestos a diferentes proporciones. Todas las posibles combinaciones, en total seis, se ensayaron a diferentes proporciones peso / peso (w/w) de los compuestos.

Para dichas mezclas entre compuestos, se probaron tanto las combinaciones de polifenoles que pertenecen a la misma familia, es decir, entre flavonoides (Q3G + M) y entre elagitaninos (AE + P) como de todas las combinaciones posibles entre flavonoides y elagitaninos (Q3G + P; M + AE; M + P; AE + Q3G). Los resultados de los valores de CIM₅₀ para las combinaciones se muestran en la tabla 3. Una vez obtenidos los valores de inhibición, se procedió al cálculo de los valores del FICI y a la representación del isoblograma, en el que cada punto está representado por la contribución al CIM₅₀ de cada uno de los compuestos en la mezcla. Según el método isobolol de Berenbaum, las combinaciones Q3G + M, AE + P, M + P y AE + Q3G (figuras 3A, 3B, 3E y 3F) mostraron una claro isoblograma cóncavo hacia el punto cero, que indica una interacción sinérgica entre los compuestos de la mezcla.

Por el contrario, la combinación M + AE (figura 3D) mostró un patrón paralelo con respecto a la recta control, que indica que no hay interacción entre los compuestos.

La combinación Q3G + P (figura 3C) por otro lado, no presentó una forma clara de isobolol, no habiéndose podido ajustar a ningún tipo de ecuación. Esto indica que el tipo de interacción mostrada, depende en gran medida de la proporción usada.

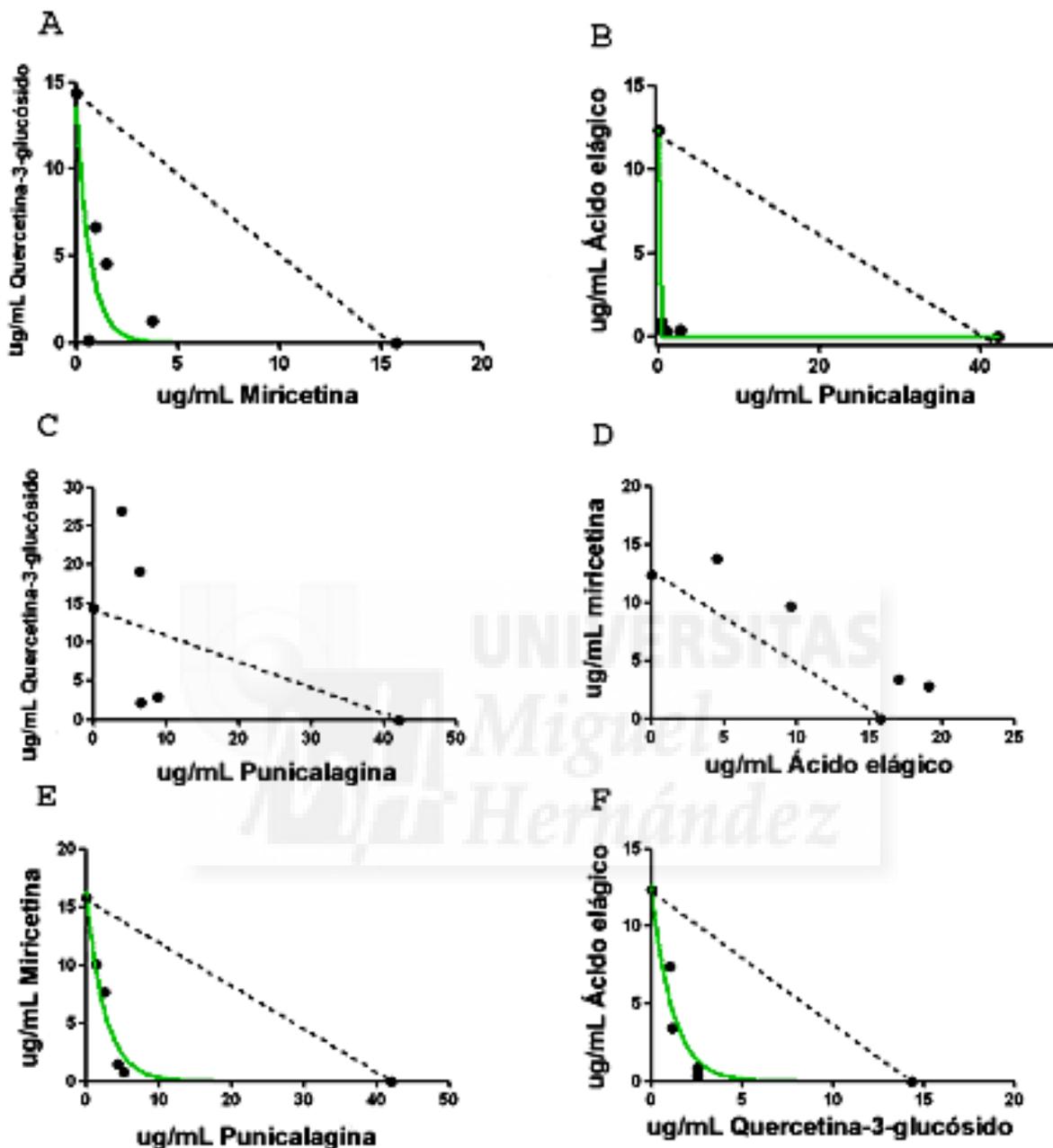


Figura 2. Isobogramas representados con los valores de CIM_{50} resultantes de las combinaciones de compuestos polifenólicos frente a *S. aureus*: Q3G+M (A), AE+P (B), Q3G+P (C), M+AE (D), M+P (E) y AE+Q3G (F).

Después de este análisis inicial que proporciona la observación de los gráficos isobolol, se procedió seguidamente a realizar un análisis más detallado, estudiando de forma específica el comportamiento de cada una de las proporciones en las diferentes mezclas de compuestos

mediante el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionada (FICI), el cual nos permitió confirmar los resultados obtenidos (tabla 3).

Combinación A (Q3G+M)				Combinación B (AE+P)			
Proporción (w/w)	CIM ₅₀	FICI		Proporción (w/w)	CIM ₅₀	FICI	
1:0	14.37 ± 4.10	---	---	1:0	12.35 ± 4.29	---	---
7:1	7.62 ± 2.40	0.52	Aditiva	7:1	3.06 ± 0.94	0.095	Sinérgica
3:1	6.03 ± 4.14	0.41	Sinérgica	3:1	1.20 ± 0.40	0.045	Sinérgica
1:3	5.02 ± 2.47	0.32	Sinérgica	1:3	1.16 ± 0.49	0.077	Sinérgica
1:7	0.76 ± 0.24	0.05	Sinérgica	1:7	0.52 ± 0.45	0.038	Sinérgica
0:1	15.76 ± 3.41	---	---	0:1	42.11 ± 9.33	---	---
Combinación C (Q3G+P)				Combinación D (M+AE)			
Proporción (w/w)	CIM ₅₀	FICI		Proporción (w/w)	CIM ₅₀	FICI	
1:0	14.37 ± 3.41	---	---	1:0	12.35 ± 4.29	---	---
7:1	30.75 ± 1.41	1.96	Indiferente	3:1	18.29 ± 7.15	1.40	Indiferente
3:1	25.46 ± 2.37	1.48	Indiferente	1:1	19.31 ± 7.31	1.39	Indiferente
1:3	11.80 ± 7.60	0.41	Sinérgica	1:3	20.48 ± 11.17	1.36	Indiferente
1:7	8.67 ± 15.52	0.31	Sinérgica	1:7	21.84 ± 11.49	1.43	Indiferente
0:1	42.11 ± 9.30	---	---	0:1	15.76 ± 3.41	---	---
Combinación E (M+P)				Combinación F (AE+Q3G)			
Proporción (w/w)	CIM ₅₀	FICI		Proporción (w/w)	CIM ₅₀	FICI	
1:0	15.76 ± 3.41	---	---	1:0	12.35 ± 4.29	---	---
7:1	11.48 ± 2.09	0.67	Aditiva	7:1	8.47 ± 2.61	0.67	Aditiva
3:1	10.28 ± 3.45	0.55	Aditiva	3:1	4.55 ± 1.13	0.36	Sinérgica
1:3	6.06 ± 0.58	0.17	Sinérgica	1:3	3.42 ± 1.77	0.25	Sinérgica
1:7	5.83 ± 1.79	0.19	Sinérgica	1:7	2.91 ± 0.73	0.21	Sinérgica
0:1	42.11 ± 9.30	---	---	0:1	14.37 ± 4.10	---	---

Tabla 3: CIM₅₀ (µg / mL), valores FICI y evaluación de la sinergia de las combinaciones de compuestos pertenecientes a diferentes familias polifenólicos en diferente w / w proporciones.

Este cálculo del valor FICI, confirmó los potentes efectos sinérgicos para las combinaciones entre Q3G + M, AE + P, Q3G + M (tabla 3), con valores FICI ≤ 0,5. Concretamente es de destacar la combinación AE + P, con la que se obtuvieron unos valores FICI notablemente bajos e indicativos por tanto de un gran efecto sinérgico en todas las proporciones estudiadas. A continuación, se describen en primer lugar los resultados de las combinaciones polifenólicas entre compuestos pertenecientes a la misma familia (entre flavonoides: Q3G + M y elagitaninos: AE + P).

En estas combinaciones, se puede ver como la combinación entre Q3G + M (figura 3A), muestra una curva isobolol cóncava que marca la fuerte inhibición bacteriana de la mezcla de compuestos en comparación con los compuestos individuales.

Además, es destacable que la combinación entre estos flavonoides produce una inhibición del crecimiento bacteriano casi veinte veces mayor cuando la combinación se enriquece en M en la proporción 1: 7 (w/w) (tabla 3).

La combinación de elagitaninos AE + P, mostró valores muy bajos de FICI (tabla 3) en todas las proporciones ensayadas, siendo por tanto la combinación estudiada que más fuerte efecto sinérgico mostró de un modo general y que queda representado también en la curva isobolol (figura 3).

En cuanto a los resultados de las combinaciones de compuestos de diferentes familias, se pudo observar como la combinación AE + Q3G y la combinación M + P, fueron las únicas que presentaron sinergia (figura 3). Pero el cálculo del FICI (tabla 3), refleja que no todas las proporciones para ambas combinaciones de compuestos, fueron sinérgicas.

Para el caso de la combinación AE + Q3G, las mezclas que muestran sinergismo de acuerdo con el FICI son las proporciones 3: 1, 1: 3 y 1: 7 (w/w), siendo las proporciones enriquecidas en Q3G (1: 3 y 1: 7 w/w) las que descendían el valor de CIM₅₀ hasta casi cinco veces más que si eran comparados con los resultados de inhibición obtenidos con el compuesto puro Q3G.

Para la combinación M + P, es interesante destacar que aunque sólo se observó sinergia en dos de las proporciones ensayadas 1: 3 y 1: 7 (w/w), en dichas proporciones, se alcanzaron los valores más bajos de FICI estudiados de todas las combinaciones de compuestos y, por tanto, los

mejores valores de sinergia. Además y a pesar de que el gráfico isobolol para esta combinación, muestra sinergia de forma general (figura 3E), el análisis en detalle de las proporciones de ambos compuestos mediante el cálculo del FICI, nos indica que las proporciones enriquecidas en M son aditivas (los 2 puntos más cercanos a la recta control en el gráfico isobolol), mientras que las proporciones enriquecidas en P, fueron hasta 8 veces más potentes que las que contenían sólo el compuesto punicalagina, presentando por tanto sinergia.

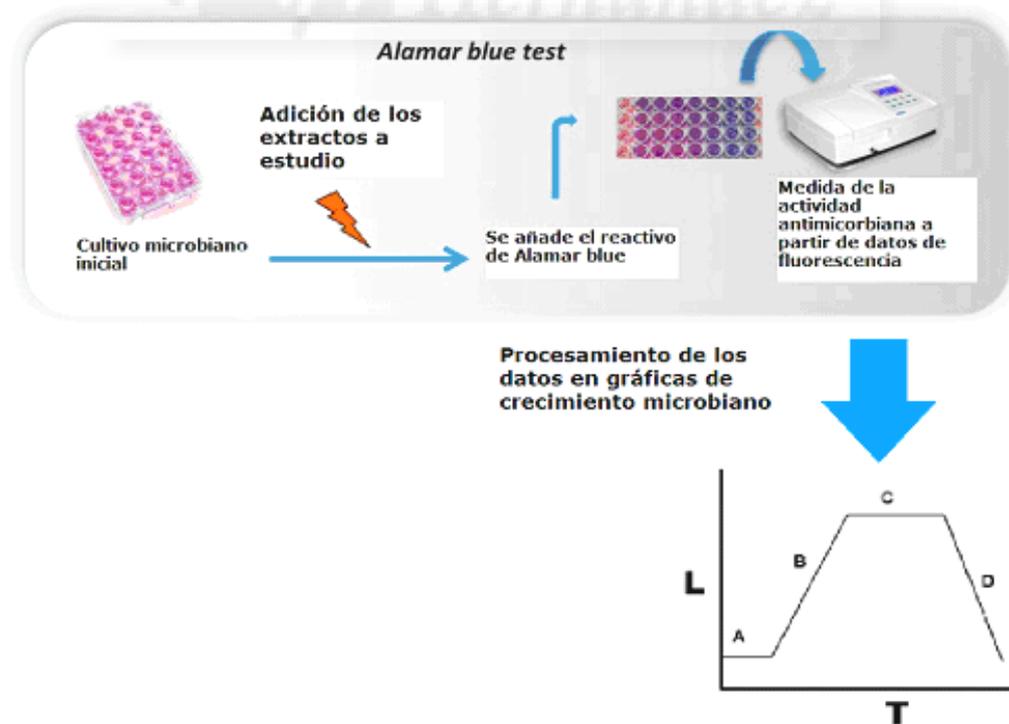
En cuanto a la combinación Q3G + P, dos de las proporciones probadas mostraron una interacción indiferente (tabla 3 y figura 3C). Este resultado pone de manifiesto que la interacción entre ambos compuestos, no fue tan potente como las que se pudieron observar para las combinaciones ya comentadas, a pesar de que también se observó sinergia. Por tanto, la potencia de una combinación depende en gran medida de la proporción de la mezcla utilizada entre los compuestos.

Finalmente, el comportamiento de la combinación M + AE se consideró indiferente porque los valores FICI (tabla 3) se encontraban entre 1 -2, que indica que no se produce interacción entre ambos compuestos. De ese modo, se confirman los resultados del gráfico isobolol (Figura 3D).



Capítulo tercero

Ensayos de cinética bacteriana



La curva del crecimiento microbiano representa la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo del tiempo. En la curva de crecimiento se diferencian cuatro fases: la fase de latencia, la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte celular. De estas cuatro fases, habitualmente la fase de crecimiento exponencial o fase logarítmica es la que presenta mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Durante esta fase, el tiempo de duplicación microbiana o tiempo de generación (g) de los microorganismos se mantiene constante.

El presente capítulo está centrado en el estudio de la cinética de crecimiento de microorganismos en modelos patógenos y en presencia de diferentes extractos vegetales. Los extractos ensayados pertenecen a las plantas *Cistáceas* con extracción acuosa utilizados en el capítulo primero (*C. ladanifer*, *C. clusii*, *C. albidus* y *C. salviifolius*) y cuya actividad será comparada con otros extractos acuosos de diferentes especies vegetales (*Hypoxis rooperi*, *Hibiscus sabdariffa*, *Hibiscus arnottianus* y *Lippia citriodora*).

De estos últimos extractos con los que van a ser comparados los extractos de plantas *Cistáceas*, es destacable, que a pesar de que han sido estudiados principalmente por su actividad anti-inflamatoria (Caturla et al., 2011; Funes et al., 2009; Funes et al., 2010; Fernández-Arroyo et al., 2012., Fernández-Arroyo et al., 2011) y disminución de la resistencia a la insulina (Herranz-López et al., 2012), también existen estudios que respaldan su capacidad antimicrobiana (Fullerton et al., 2011; Jung et al., 2013; Collins et al., 1997; Laporta et al., 2007).

Todos estos extractos fueron seleccionados por su diferente composición y contenido polifenólico. De ese modo, se pretende comparar las posibles diferencias que pueden producir en la cinética microbiana y concretamente en los tiempos de generación (g) y las tasas de crecimiento microbiano (k).

IVc.1. Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano

Para seguir el curso del crecimiento microbiano, se seleccionaron 3 cepas de microorganismos. Los organismos modelo de bacterias utilizadas fueron: *E. coli* WA321 (DSMZ # 4509) como bacteria Gram-negativa y *S. aureus* 533R4 Serovar 3 (DSMZ # 20 231) como bacteria Gram-positiva. Además, se eligió un organismo modelo de hongo levaduriforme: *Candida albicans* BSMY 212 (DSMZ # 10697) (tabla 1).

Especie	Colección	Modelo de Patogenicidad
<i>Candida albicans</i> BSMY 212	DSMZ 10697	Organismo modelo patógeno para hongos levaduriformes
<i>Escherichia coli</i> WA321	DSMZ 4509	Organismo humano modelo para las bacterias Gram-negativo patógenas
<i>Staphylococcus aureus</i> 533R4 Serovar 3	DSMZ 20231	Organismo humano modelo para las bacterias Gram-positivas patógenas

Tabla 1. Cepas diana para los ensayos de cinética

El seguimiento del crecimiento de la población bacteriana a tiempo real se realizó a través de medidas de fluorescencia, con un método validado para estudiar dicho crecimiento, el método Alamarblue assay®.

Estas medidas se realizaron en un fluorímetro y mediante la adición del reactivo de Alamarblue a las muestras ensayadas. El reactivo Alamarblue permitió seguir por fluorescencia la viabilidad microbiana. El reactivo reducido por el ambiente creado en el citosol debido a la actividad microbiana, aumentó los niveles de fluorescencia que eran proporcionales al número de células vivas.

No obstante, dado que los resultados del ensayo espectrofotométrico se obtuvieron en unidades relativas de fluorescencia (URF), se hizo una correlación entre las URF y las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) durante la fase exponencial de crecimiento.

Para ello, y tal como se expone en el apartado de Material y Métodos, se procedió validando el método para cada uno de los microorganismos, a partir de los cuales, cada 2 horas además de tomar los datos de URF, se realizaba un recuento en placa de las células viables. Con estos datos, se construyeron unos gráficos (figuras 1A, 1B, 1C) en los que se representaron la URF vs las unidades formadoras de colonias (UFC/mL), lo que permitió extrapolar la medida de unidades de fluorescencia a recuentos microbianos (UFC/mL) para todos los casos estudiados y posterior análisis de la cinética.

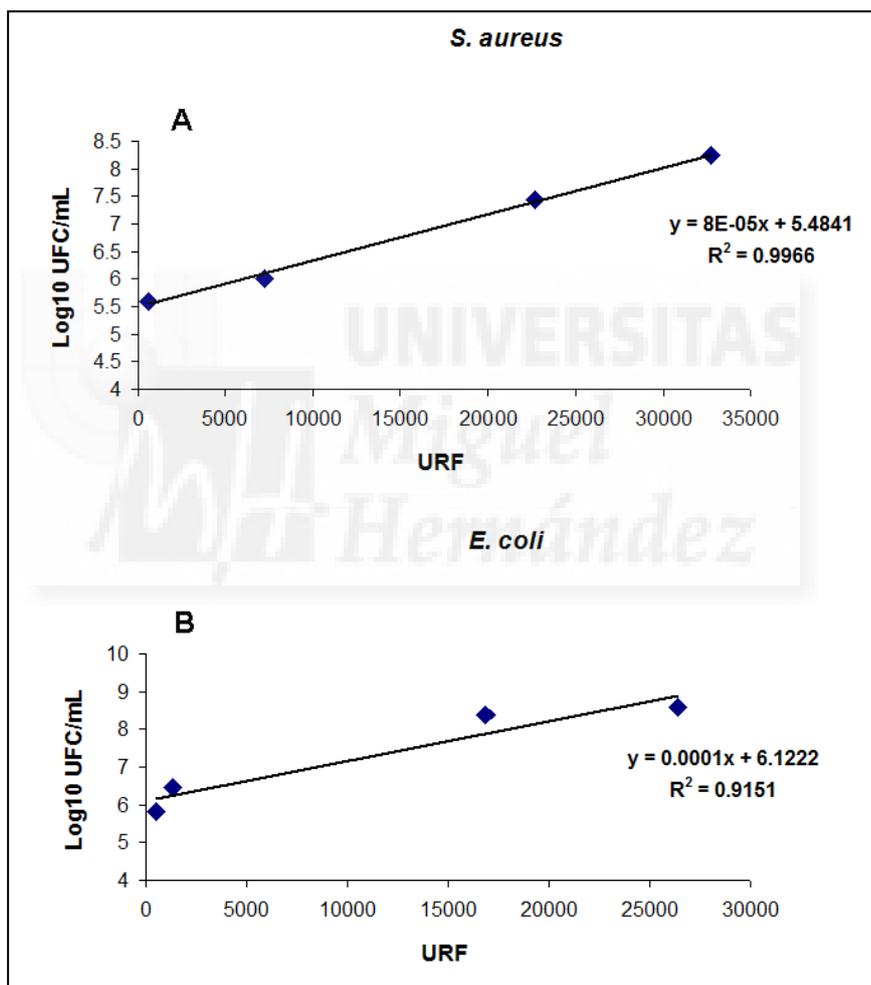


Figura 1A/1B. Ajuste lineal de la correlación entre las unidades relativas de fluorescencia (URF) y el Log10 de las unidades formadoras de colonias (UFC/ mL) de los distintos organismos control utilizados en el presente estudio. A: correlación para *S. aureus* 533R4, B: correlación para *E. coli* WA321. Los tiempos en los que se realizó la toma de muestras y que corresponden a los puntos que se muestran en cada uno de los gráficos para representar la confrontación URF vs UFC fueron: T1= 0h, T2= 2h, T3= 4h y T4= 6h.

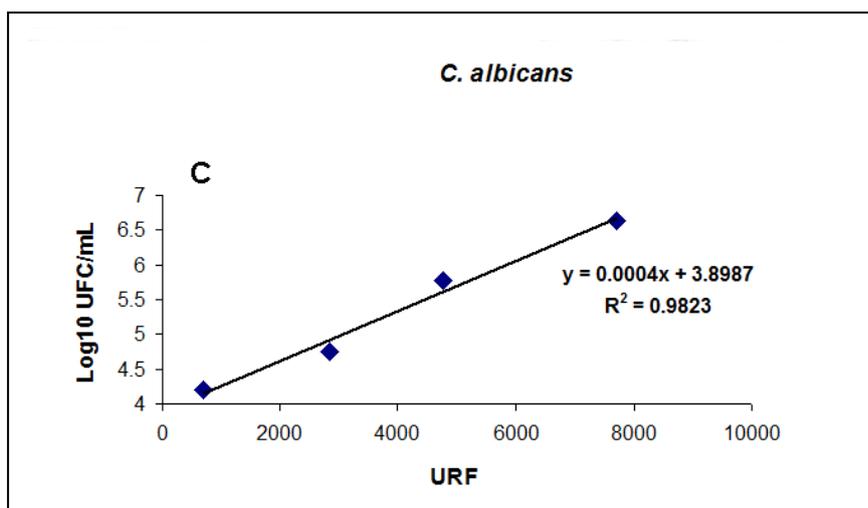


Figura 1C. Ajuste lineal de la correlación entre las unidades relativas de fluorescencia (URF) y el Log₁₀ de las unidades formadoras de colonias (UFC/ mL) de los distintos organismos control utilizados en el presente estudio. C: correlación para *C. albicans*. Los tiempos en los que se realizó la toma de muestras y que corresponden a los puntos que se muestran en cada uno de los gráficos para representar la confrontación URF vs UFC fueron: T1= 0h, T2= 2h, T3= 4h y T4= 6h.

Una vez que el método fue validado, se comenzó con los ensayos para la búsqueda de los extractos que mejoren la cinética con respecto al control positivo de crecimiento microbiano, siendo capaces de aumentar (g) y disminuir (k) para cada organismo modelo.

Para el ensayo, se planteó una estrategia progresiva en la cual, de todos los extractos que se ensayaron a una concentración de 2 mg / mL frente a *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, se seleccionaron los extractos con un tiempo de generación superior al control microbiano para probarlos a una concentración más baja (1 mg / mL). Finalmente, se procedió del mismo modo para testar los extractos a una concentración de 500 µg / mL. La tabla 2 resume los extractos de plantas estudiados, la principal familia de compuestos polifenólicos que contienen y el contenido polifenólico total cuantificado por el método de Folin-ciocalteu que se puede consultar en el apartado de Material y Métodos.

Extracto	Abreviatura	Referencias	Principal familia de polifenoles	Contenido polifenólico total
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	HS	(Fernández-Arroyo et al., 2011; Herranz-Lopez et al., 2012)	Antocianidinas, ácido cinámico	5.42 ± 0.15
Purificado polifenólico de <i>H. sabdariffa</i>	HSP	(Fernández-Arroyo et al., 2011)	Ácido cinámico, flavonoides, antocianidinas	33.88 ± 0.88
<i>Hibiscus arnottianus</i>	HA	---*	Ácido cinámico, flavonoides	2.10 ± 0.07
<i>Lippia citriodora</i> (10% verbascósido)	LC10	(Quirantés-Piné et al., 2009)	Feniletanoides	6.37 ± 0.35
<i>Lippia citriodora</i> (32% verbascósido)	LC 32	(Quirantés-Piné et al., 2009)	Feniletanoides	37.86 ± 0.40
<i>Cistus albidus</i>	A2	(Tomás-Menor et al., 2013)	Catequina, flavonoides	19.72 ± 0.74
Purificado polifenólico de <i>Cistus ladanifer</i>	L2P	---*	Elagitaninos, flavonoides	30.84 ± 0.92
<i>Cistus clusii</i>	C2	(Tomás-Menor et al., 2013)	Flavonoides	15.47 ± 0.45
<i>Cistus salviifolius</i>	S2	(Tomás-Menor et al., 2013)	Elagitaninos, flavonoides	45.13 ± 0.32
<i>Hypoxis rooperi</i>	HR	(Laporta et al., 2007)	Nor-lignanós	10.11 ± 0.88

Tabla 2. Extractos de plantas estudiados en el presente trabajo y referencias bibliográficas en las que se analiza su composición y principal familia de polifenoles de cada uno de ellos * Extractos que han sido caracterizados mediante HPLC-DAD-MS/MS en el presente trabajo. El contenido total de polifenoles, se expresa en g de equivalentes de ácido gálico /100 g de extracto de peso seco.

Para definir la cinética de la fase exponencial de crecimiento en cada uno de los casos, se procedió a representar gráficamente las curvas de crecimiento con los datos de viabilidad microbiana obtenidos tras la lectura de fluorescencia (figura 2 y 3). Con la curva de crecimiento, se obtuvo el valor de (k) o número de población microbiana, que es equivalente a la pendiente en la fase exponencial.

Este número de microorganismos, se relacionó con el tiempo de generación de un microorganismo (g) utilizando la siguiente ecuación básica que define la cinética de la fase exponencial de crecimiento.

$$K = \frac{\log_{10}(N) - \log_{10}(N_0)}{t - t_0} ; K = \frac{0.301}{g}$$

A modo general, no se ha encontrado ningún extracto que sea eficaz en las 3 cepas a la concentración más baja probada. De hecho, los mejores extractos cribados en *C. albicans* llegan hasta una concentración de 1 mg/mL, ya que a la concentración de 500 µg/mL apenas se observa actividad antifúngica (figura 4).

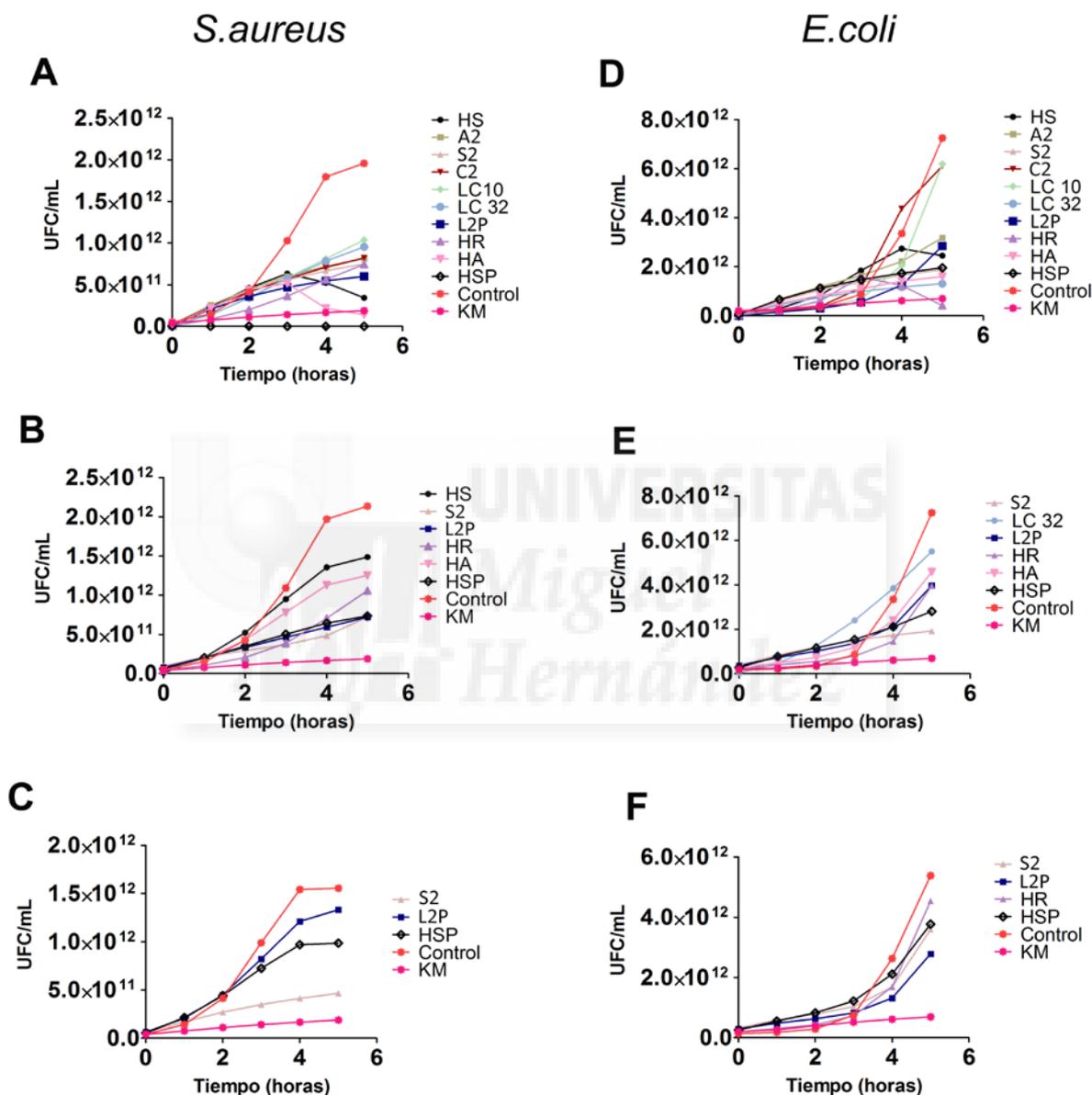


Figura 2. Curvas de crecimiento en fase exponencial con los extractos cribados en organismos modelos patógenos humanos a diferentes concentraciones. Los errores entre replicados fueron de un 13.96% para *S. aureus* (A, B y C) y 12.18% para *E. coli*. (D, E y F). Las letras de los diferentes gráficos representan la cepa estudiada y la concentración de extractos utilizada como tratamiento: A (*S. aureus*/2mg/mL); B (*S. aureus*/ 1mg/mL); C (*S. aureus*/ 500 µg/mL); D (*E. coli*/2mg/mL); E (*E. coli*/1mg/mL); F (*E. coli*/ 500 µg/mL) (HS) *Hibiscus sabdariffa*; (A2) *Cistus albidus*; (S2) *Cistus salviifolius*; (C2) *Cistus clusii*; (LC 10) *Lippia citriodora* (10% verbascósido); (LC 32) *Lippia citriodora* (32% verbascósido); (L2P) extracto purificado polifenólico de *Cistus ladanifer*; (HR) *Hypoxis rooperi*; (HA) *Hibiscus arnottianus*; (HSP) extracto purificado polifenólico de *Hibiscus sabdariffa*; (Control) Control de crecimiento microbiano; (KM) antibiótico aminoglucósido de amplio espectro, kanamicina.

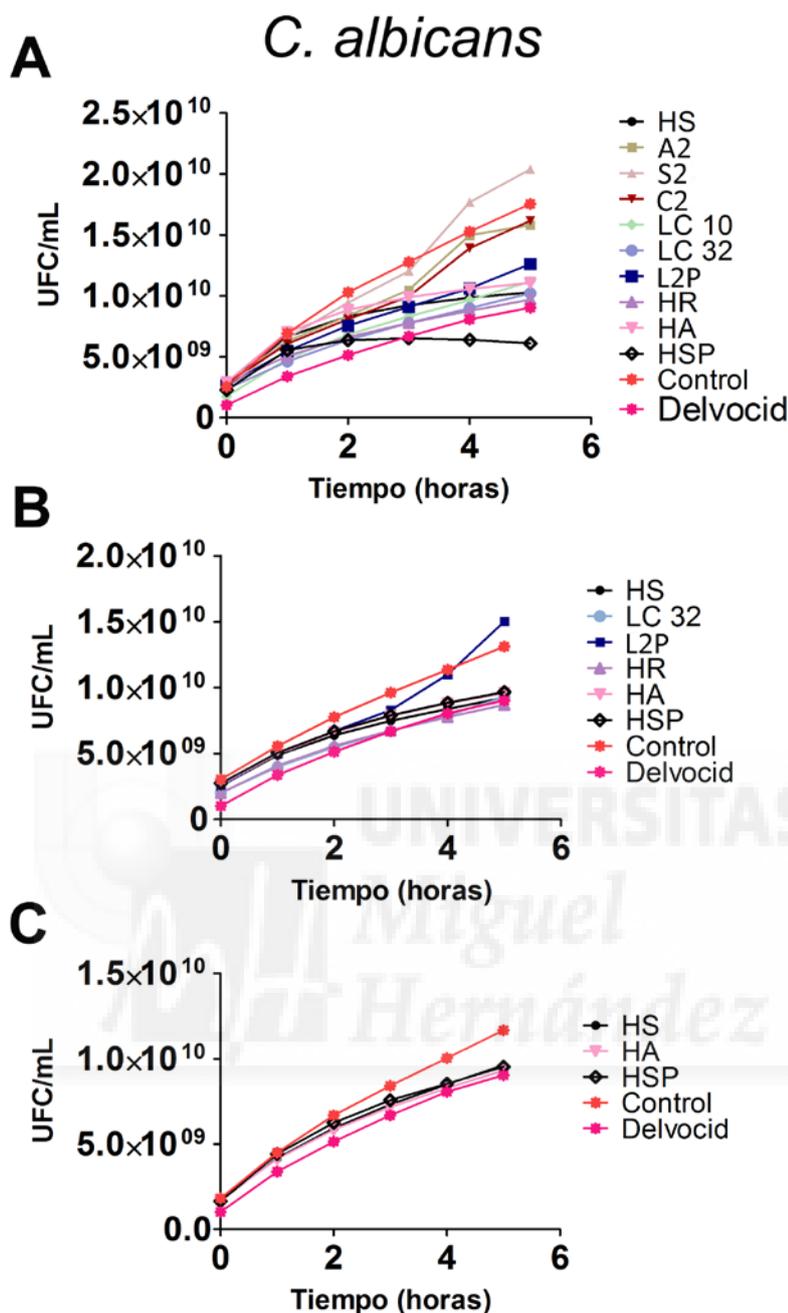


Figura 3. Curvas de crecimiento en fase exponencial con los extractos cribados en organismos modelos patógenos humanos a diferentes concentraciones. Los errores entre replicados fueron de 5.48%. Las letras de los diferentes gráficos representan la concentración de extractos utilizada como tratamiento: A (2mg/mL); B (1mg/mL); C (500 µg/mL). (HS) *Hibiscus sabdariffa*; (A2) *Cistus albidus*; (S2) *Cistus salviifolius*; (C2) *Cistus clusii*; (LC 10) *Lippia citriodora* (10% verbascósido); (LC 32) *Lippia citriodora* (32% verbascósido); (L2P) extracto purificado polifenólico de *Cistus ladanifer*; (HR) *Hypoxis rooperi*; (HA) *Hibiscus arnottianus*; (HSP) extracto purificado polifenólico de *Hibiscus sabdariffa*; (Control) Control de crecimiento microbiano; (Delvovid) fungicida específico para hongos.

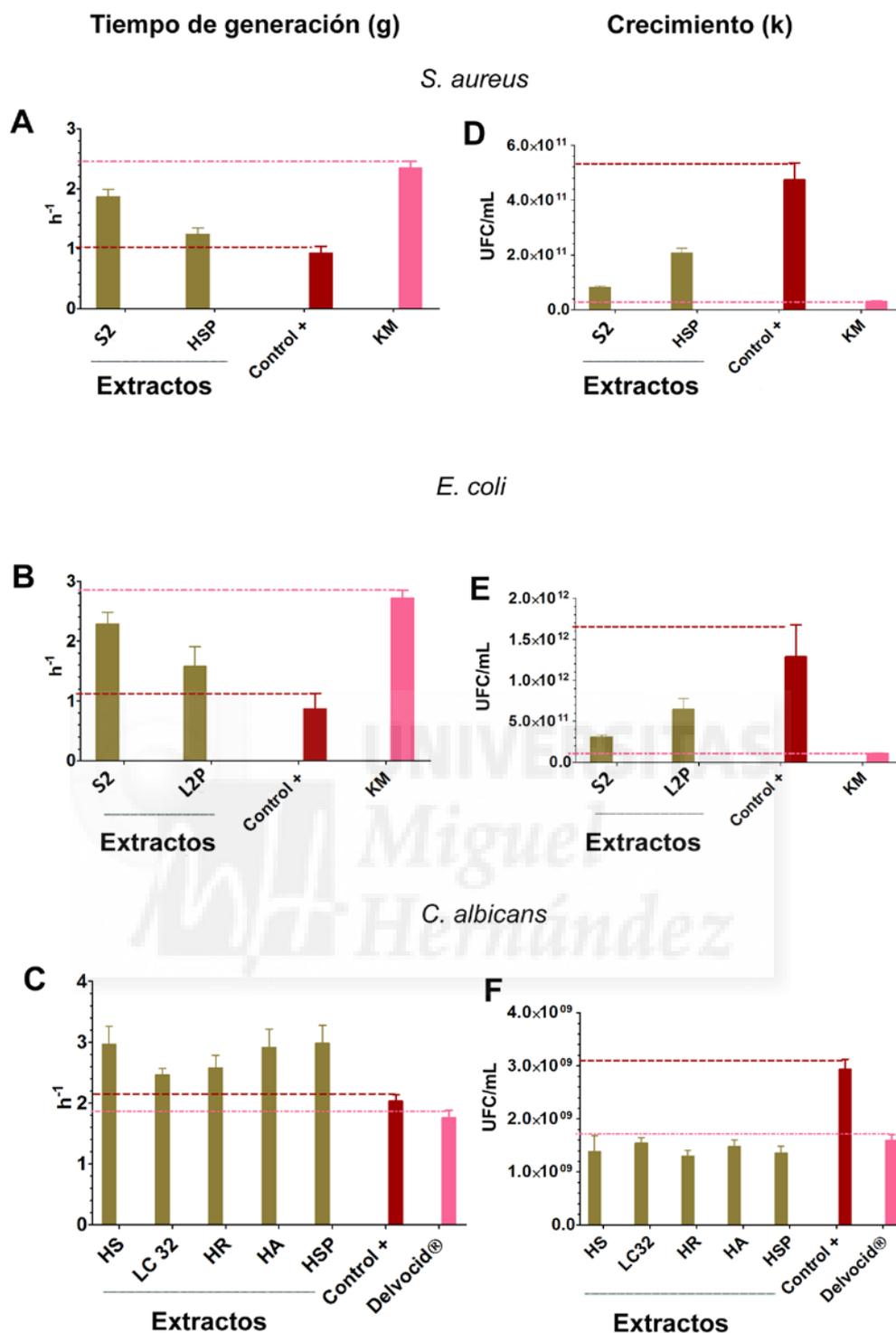


Figura 4. Gráficos de barras que resumen los mejores resultados de los datos cinéticos calculados para todos los extractos procesados. El tiempo de generación está representado por las letras A para *S. aureus*, B para *E. coli* y C para *C. albicans*. Las letras D para *S. aureus*, E para *E. coli* y F para *C. albicans* representan el crecimiento microbiano en la fase exponencial. (S2) *Cistus salviifolius*; (HSP) extracto purificado polifenólico de *Hibiscus sabdariffa*; (L2P) extracto purificado polifenólico de *Cistus ladanifer*; (HS) *Hibiscus sabdariffa*; (HR) *Hypoxis rooperi*; (LC 32) *Lippia citriodora* (32% verbascósido). Los extractos que mejores resultados dieron para las bacterias están probados a 500µg/mL y para *C. albicans* a 1mg/mL. En rojo se representa el control de crecimiento microbiano y rosa el control fungicida o antibiótico de amplio espectro.

Si se observan los resultados obtenidos para cada cepa de microorganismo patógeno estudiada, podemos observar que para *S. aureus*, los extractos más activos a 500 µg/mL fueron el S2 en primer lugar con un tiempo de generación (g) de 1,87 h⁻¹ seguido del HSP con una g de 1,24 h⁻¹. Se puede destacar sobre todo la cinética del S2 comparada con la de la KM, en la que se ve que la KM es más potente en la disminución del número de colonias con respecto al S2 en la fase exponencial, en tan sólo 5,11 × 10¹ UFC/mL, existiendo en ambos casos una disminución logarítmica decimal del crecimiento microbiano con respecto al control.

En cuanto al tiempo que tarda en duplicar la población, el S2 fue capaz de doblar el tiempo de duplicación y por tanto de replicación bacteriana con respecto al control de crecimiento bacteriano hasta 1,87 h⁻¹, mientras que KM aumentó ese tiempo hasta 2,34 h⁻¹.

Por tanto, el S2 es capaz de provocar un tiempo de acción y disminución del número de bacterias en *S. aureus* 533R4 Serovar 3 y a una concentración de 500 µg/mL similares a los que produce el control antibiótico KM.

Para el microorganismo modelo Gram-negativo, *E. coli* WA321, fueron 2 extractos de plantas *Cistáceas* los mejores del cribado, el S2 y L2P. Para ambos casos, se observó un retraso en la duplicación bacteriana con respecto al control. El L2P dobló el tiempo de generación bacteriana hasta 1,57h⁻¹ y el S2 consiguió un tiempo similar al de la KM como en el caso anterior, aumentando ese tiempo en 2,5 h⁻¹, frente al control con KM que lo aumentó en casi 3h⁻¹ con respecto al control.

Ese retraso en el tiempo de duplicación microbiana, provoca en ambos extractos un descenso de la población de una unidad logarítmica decimal con respecto al control, siendo el S2 el que alcanzó un recuento más próximo a KM, con un recuento en el número de colonias para S2 de 3,06 × 10¹¹ UFC/mL, para L2P 6,44 × 10¹¹ UFC/mL y para KM 1,03 × 10¹¹ UFC/mL.

Finalmente, para el modelo patógeno de *C. albicans* BSMY 212, como se ha comentado anteriormente, no se obtuvieron resultados destacables a 500 µg/mL y por ello se eligieron los extractos que mejores resultados dieron a la concentración de 1 mg/mL. En este caso, fueron 6 los extractos que mostraron una disminución del crecimiento microbiano con respecto al control: HS, LC 32, HR, HA, y HSP. Todos ellos, mostraron un recuento microbiano muy similar, situado entre $1,35 \times 10^9$ – $1,54 \times 10^9$ UFC/mL, un descenso de igual proporción que el ocasionado por la pimaricina Delvocid®. Tanto el fungicida utilizado como los extractos, consiguieron reducir la población microbiana hasta un recuento microbiano de $1,5 \times 10^9$ UFC/mL (valores similares al control). No obstante, el tiempo en que tardó en duplicarse la población, osciló entre 2,92 – 2,98 h⁻¹ para los extractos con mejor comportamiento que son HS, HA y HSP. Estos valores, superan al control positivo de crecimiento microbiano y a los tiempos de generación obtenidos con el Delvocid® en casi cerca de una hora.

IVc.2. Análisis de la composición de los extractos analizados por HPLC-DAD-MS/MS

La composición de los extractos de plantas *Cistáceas* (S2, A2 y C2) (Tomás-Menor et al., 2013) e *Hibiscus sabdariffa* (HS y HSP) (Fernández-Arroyo et al., 2011; Herranz-Lopez et al., 2012) fue analizada previamente por este grupo de investigación, al igual que los extractos de *Lippia citriodora* (LC 10 y LC 32) (Quirantés-Piné et al., 2009) e *Hypoxis rooperi* (HR) (Laporta et al., 2007). Las principales familias de compuestos de todos ellos se resumen en la tabla 2 del apartado anterior.

Por lo tanto, para acabar de complementar este estudio, se realizó un análisis de la composición, sólo para el extracto purificado de *C. ladanifer* (L2P) e *Hibiscus arnottianus* (HA), ya que no habían sido caracterizados previamente.

La figura 4 muestra los perfiles de HPLC donde se especifican los principales compuestos identificados para cada extracto. Se han identificado ocho compuestos en el extracto de HA (tabla 3), mientras que para el extracto de L2P se han identificado 22 picos, quedando 4 pendientes de identificación (tabla 4).

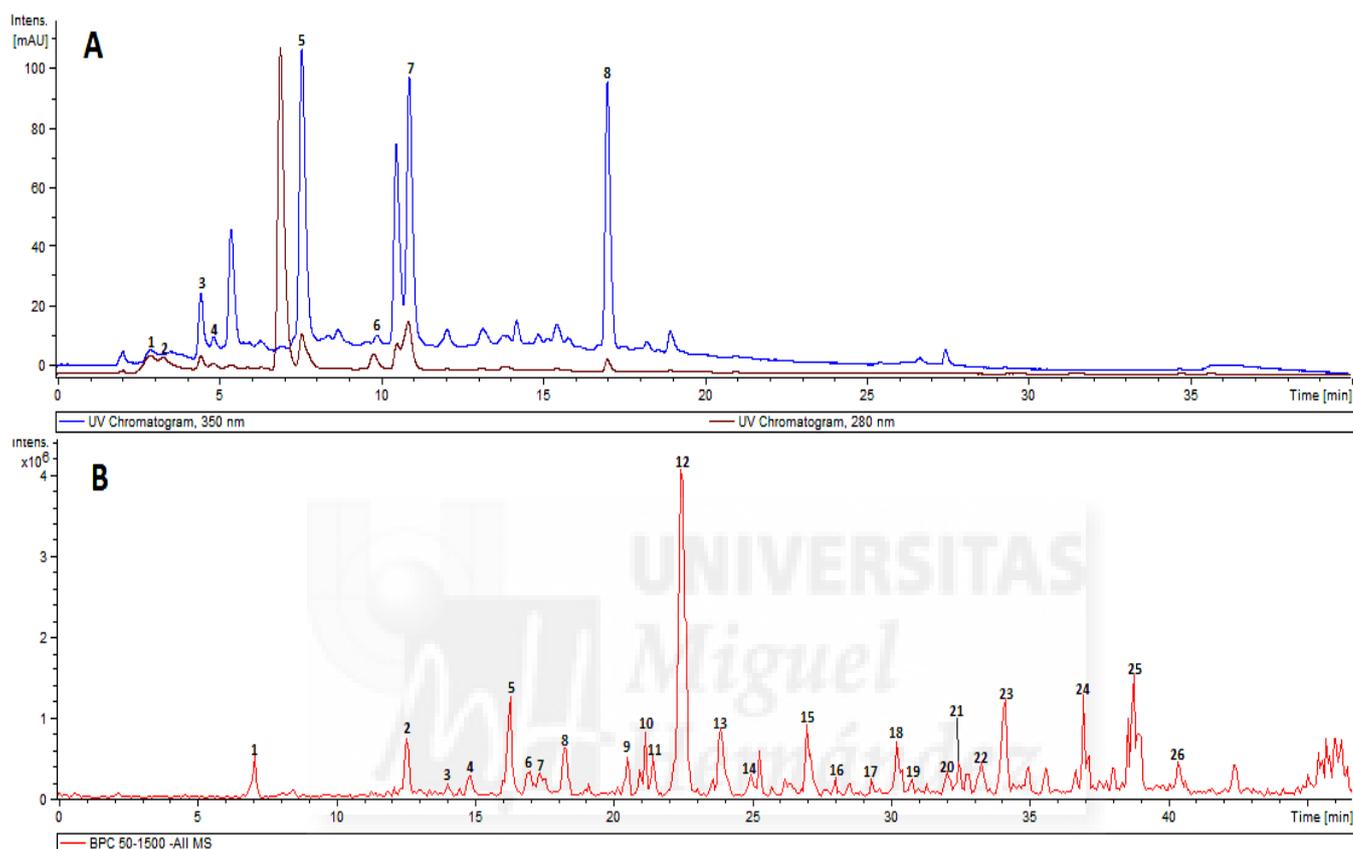


Figura 4. Perfiles cromatográficos para los extractos HA y L2P. El gráfico A representa el perfil cromatográfico de HPLC-DAD para el extracto HA: en color azul se representa el cromatograma para el UV a 350 nm y en marrón el cromatograma para el UV a 280nm. El gráfico B representa el cromatograma de pico base HPLC-ESI-IT-MS/MS para el L2P. Los números en la figura identifican los picos de los compuestos que quedan detallados en la tabla 2 para el HA y tabla 3 para L2P respectivamente.

Número de pico	TR(min)	[MS-H] ⁺	Uv max.	Compuesto propuesto
1	3	206.9	280, 350	Ácido hidroxicátrico
2	3.4	188.9	280, 350	Ácido hibisco
3	4.5	386.8	350	Desconocido
4	4.8	363.3	350	Desconocido
5	7.5	352.9	350	Ácido clorogénico I (dímero)
6	9.7	593	280, 350	Kaempferol-3-O-rutinosido
7	10.9	352.9	350	Ácido clorogénico II (dímero)
8	16.9	609	350	Quercetina-3-rutinosido

Tabla 3. Datos cromatográficos e identificación de los principales picos del extracto HA.

Número de pico	TR (min)	[MS-H]	Fragmentos	Compuesto propuesto
1	7.1	780	601,721	Punicalina
2	12.6	1081	780, 600	Punicalagina (isómero I)
3	14	508	460.7	Desconocido
4	14.8	524	488.6, 326.8	Desconocido
5	16.3	1081	780.2, 600	Punicalagina (isómero II)
6	16.9	373	206.6, 164.7, 112.9	Ácido hidroxí ferúlico hexósido
7	17.4	445	400.7	Apigenina-7-O-glucuronido
8	18.2	432	228.8, 152.8	Apigenina-7-O-glucósido
9	20.5	524	488.7	Desconocido
10	21.1	222	-	Flavona
11	21.4	478	314.6, 362.7, 254.8	Isorhamnetina-3-O-galactósido
12	22.4	326.8	164.7, 112.8	Ácido p-coumárico-4-O-glucósido
13	23.8	593	353	Kaempferol diglicósido
14	24.9	463	301,151	Quercetina glucósido
15	27.0	624.6	463, 301	Quercetina diglicósido
16	28.0	608.5	447, 285	Kaempferol diglicósido
17	29.3	565	316	Miricetina hexósido-malonato (isómero I)
18	30.2	533	285	Miricetina hexósido-malonato (isómero II)
19	30.7	595	301	Quercetina diglicósido
20	32.0	463	301, 271, 255, 151	Quercetina-3-O-galactósido
21	32.4	505	-	Ácido dimetil elágico glucuronido
22	33.2	493	319	Miricetina-3-O-glucuronido (isómero I)
23	34.1	493	319	Miricetina-3-O-glucuronido (isómero II)
24	36.9	339	177	Esculetina-O-glucósido
25	38.7	537	-	Desconocido
26	40.3	533	334	Kaempferol hexósido-malonato (isómero III)

Tabla 4: Datos cromatográficos e identificación de los principales picos del extracto L2P.

IVc.3 Correlación entre la composición polifenólica de los extractos y la cinética observada

Una vez completado el estudio del efecto de los extractos en el crecimiento microbiano y el análisis de los principales compuestos polifenólicos, se procedió a estudiar la correlación entre los principales compuestos de los extractos y su actividad.

En general, se puede decir que los compuestos que se identificaron en el HSP son capaces de presentar a 1mg/mL, una amplia acción antimicrobiana frente a bacterias tanto Gram-positivas y Gram-negativas como contra hongos levaduriformes. Por otro lado, se ha podido comprobar como el S2 tiene una actividad a la concentración más baja, a 500 µg/mL, ejerciendo dicha actividad sólo para las bacterias y sobre todo frente a microorganismos Gram-positivos. Por otro lado, tampoco es descartable la actividad del L2P, sobre todo frente a bacterias Gram-negativas.

Debido a estas actividades mostradas, se puede decir, que los extractos ricos en flavonoides como la quercetina y derivados, antocianinas y ácido cinámico lograron amplio espectro de efecto antimicrobiano en las 3 cepas probadas. Un extracto de amplio espectro con un efecto notable en el tiempo de generación podría ser el HSP. Si nos centramos en la actividad de las cepas, por un lado, podemos ver que para *S. aureus* los principales compuestos responsables de la actividad antibacteriana fueron flavonoides como la quercetina, miricetina y sus derivados. El extracto de S2 es un extracto con un gran contenido en estos compuestos y para el cual se ha podido comprobar una actividad antibacteriana significativa preferentemente frente a Gram-positivos (Tomás-Menor et al., 2013). Para *E. coli*, al igual que para *S. aureus*, la principal familia de compuestos con actividad antimicrobiana fueron los flavonoides, pero parece ser que en esta cepa, tienen una mayor influencia la apigenina o kaempferol y derivados y sobre todo elagitaninos tales como ácido elágico y punicalagina (tabla 3). Por ello, tanto el S2 como el L2P obtuvieron los mejores resultados frente a bacterias para el incremento del tiempo de generación (g) y descenso del número de colonias (k) de todos los extractos ensayados. Por último, la actividad antifúngica, puede deberse a antocianidinas tales como cianidina, delphinidina y derivados, ésteres de ácidos hidroxicinámicos tales como el ácido clorogénico, y como en las otras cepas, también a la actividad de los flavonoides tales como quercetina, kaempferol y derivados (tabla 2) (Fernández-Arroyo et al., 2011; Herranz-Lopez et al., 2012), compuestos que se observan en el HSP e HR.

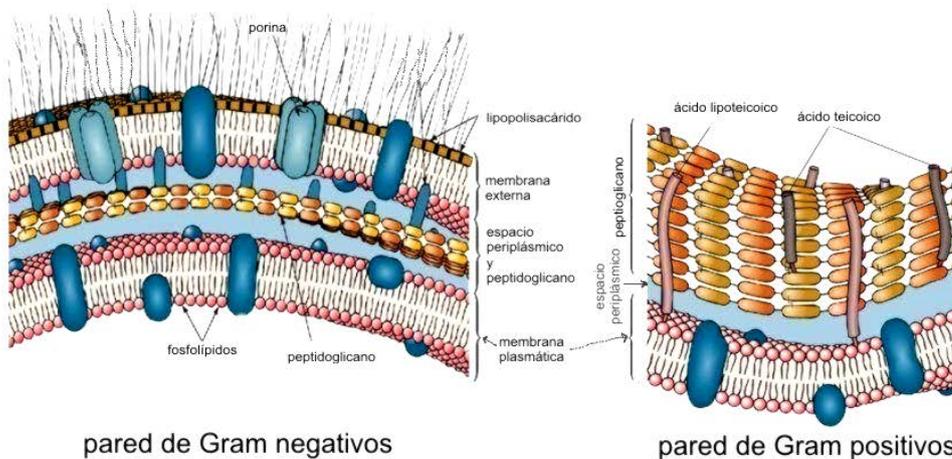
Los nor-lignanós como el hipoxósido (Laporta et al., 2007) y los feniletanoides tales como el verbascósido, podrían también contribuir a esta actividad observada (Quirantés-Piné et al., 2009), compuestos que se identificaron en la LC 32 e HR.





Capítulo cuarto

Interacción de los compuestos principales del extracto de *C. salviifolius* en membranas modelo bacterianas



En los capítulos previos se ha mostrado como existe una actividad antimicrobiana preferencial de ciertos polifenoles (miricetina, quercetina, ácido eláxico y punicalagina). Dado el interés de los resultados obtenidos, se ha abordado el estudio correspondiente al presente capítulo con el objetivo de obtener información sobre si el mecanismo de acción de dichos compuestos, pudiese estar relacionado con la membrana bacteriana y de ese modo, empezar a obtener la comprensión necesaria del posible mecanismo de acción de estos potenciales agentes antimicrobianos frente a cepas de relevancia clínica. En este contexto, y dado que no existen estudios previos que describan la interacción de los compuestos mayoritarios presentes en las plantas del género *Cistus* con modelos de membrana bacterianos, se procedió a abordar este capítulo.

Estudios previos sugieren que la disminución de la resistencia de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) está relacionada, entre otros factores, con una modulación de la expresión génica en la bacteria que provoca un aumento en la síntesis de un fosfolípido inusual, el lisil-dipalmitoilfosfatidilglicerol (L-DPPG), el cual confiere una menor fluidez y permeabilidad a la membrana fosfolipídica de la bacteria (Patricia Bernal et al., 2010; Haest et al., 1972). A continuación se muestra un análisis mediante cromatografía en capa fina de lípidos extraídos de la membrana de *S. aureus* en fase de crecimiento logarítmico (figura 1).

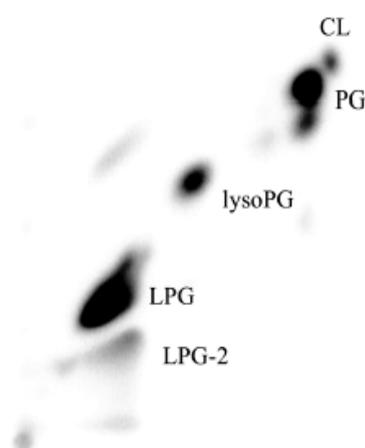


Figura 1. Análisis de TLC de los lípidos de membrana extraídos de MRSA en fase logarítmica. Las manchas se visualizaron por autorradiografía, y su intensidad se cuantificó usando un FX Bio-Rad Molecular Imager. (CL) Cardiollipina; (PG) Fosfatidilglicerol; (LysoPG) Lisofosfatidilglicerol; (LPG) Lisil-fosfatidilglicerol.

Para abordar el estudio de interacción de los polifenoles seleccionados con membranas, se prepararon dos tipos de mezclas de lípidos modelo, uno que consistía en los principales lípidos presentes en la membrana de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), habida cuenta de la importancia clínica de esta cepa, basado en datos obtenidos previamente (Patricia Bernal et al., 2010), y otra que consistía en la mezcla de lípidos de la membrana de *E. coli*, como modelos de membranas Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente. En este último caso, se trata de un extracto de origen comercial que contenía todos los lípidos de la membrana externa de *E. coli* (tabla 1).

Para esta investigación, se utilizaron técnicas biofísicas complementarias entre sí, tal y como se describen en el apartado de Material y Métodos, para determinar si los compuestos seleccionados son capaces de perturbar propiedades físicas de las membranas seleccionadas como modelo.

IVd.1. Efecto de diferentes tampones en la estabilidad y el tamaño de partícula de las vesículas fosfolipídicas.

En primer lugar, se comprobó el tampón más adecuado en la estabilidad de las vesículas fosfolipídicas para cada una de las membranas sintéticas a estudio.

Inicialmente, fue posible elegir las mejores condiciones para los MLVs. La elección de estos tampones, se realizó partiendo de revisiones bibliográficas previas y con el objetivo de conseguir que la muestra fosfolipídica mostrase homogeneidad sin presencia de agregados. De ese modo, se escogió el tampón fosfato con 130 mM de NaCl para las vesículas fosfolipídicas de MRSA (Patricia Bernal., et al 2010) y el tampón HEPES (10mM HEPES, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA) para las vesículas fosfolipídicas de *E.coli* (Laporta, et al. 2007).

Una vez obtenidas las condiciones de formación de las vesículas multilamelares, se comprobó la estabilidad de los liposomas unilamelares obtenidos por extrusión con los mismos tampones tal y como queda detallado en el apartado de Material y Métodos, y se procedió a analizar su tamaño de partícula mediante la técnica de difracción láser.

En estas pruebas se observó una dificultad en la formación de LUVs para el modelo de membrana MRSA, debido a que el diámetro de estos liposomas después de la extrusión, correspondía a una distribución de MLVs tal y como sugiere (Chavez et al., 1996) obteniéndose un diámetro heterogéneo entre 400-3500 nm, como se puede ver en la tabla 1.

Esta resistencia a la reducción de tamaño de las vesículas fosfolipídicas para los fosfolípidos que conforman los MLV de la membrana de MRSA, podría ser debida a la alta concentración de L-DPPG en esta mezcla lipídica, hecho apoyado por estudios previos que demostraron que cuando se aumenta la concentración de este lípido, se produce una disminución de la permeabilidad, volviéndose la membrana más rígida (Haest et al., 1972).

Por esta razón, se variaron los porcentajes de fosfolípidos para poder obtener LUVs estables y poder ser utilizados concretamente en la técnica de leakage planificada, que requería para su estudio vesículas lipídicas unilamelares grandes, las cuales son las más adecuadas para estudiar procesos de permeabilidad, debido a que la distribución entre la capa de lípido externa e interna es aproximadamente 1:1.

Dichos porcentajes utilizados, correspondieron a los porcentajes fosfolipídicos de la membrana sintética de *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA), que tiene en su composición un 30% menos de este fosfolípido (Prossing et al., 2010) y que con la adición de tampón fosfato, como se puede ver en la tabla 1, se forman correctamente los LUVs con un diámetro de las vesículas que oscila entre < 400 -70 nm.

En cuanto a la membrana modelo de Gram-negativos, se puede ver que la formación de LUVs fue correcta con el mismo tampón que se utilizó para formar unos MLVs estables.

<i>Mezcla lipídica y tampón</i>	<i>Polidispersidad LUVs</i>	<i>Diámetro (nm)</i>
<p>MRSA L-DPPG:DPPG:CL (53:43,5:3,5) Tampón fosfato ,130 mM NaCl (Patricia Bernal et al., 2010; Prossing et al., 2010)</p>	0,383	1588,15 ± 135.59
<p>MSSA L-DPPG/ DPPG/ CL (38:57:5) Tampón fosfato (Prossnigg et al., 2010)</p>	0,339	255,05 ± 15.25
<p>E.coli PE:PG:CA: otros lípidos minoritarios (57,5: 15,1: 9,8: 17,6) 10mM HEPES, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA (Laporta et al., 2007).</p>	0,066	171,92 ± 9.65

Tabla 1. Tamaño de partícula con el tampón correspondiente para cada una de las mezclas sintéticas utilizadas y los lípidos que componen dicha mezcla.

IVd.2. Efecto de los principales compuestos de *C. salviifolius* sobre el comportamiento termotrópico en membranas modelo bacterianas.

Se estudió el efecto de los polifenoles mayoritarios de *C. salviifolius* (ácido elágico, punicalagina, miricetina, quercetina-3-glucósido y quercetina) en el comportamiento termotrópico de membranas bacterianas modelo mediante la incorporación de cantidades crecientes de estos compuestos en vesículas compuestas por los lípidos principales de la membrana bacteriana de MRSA, o bien por lípidos de la membrana de *E. coli*. Ambas membranas contienen fosfolípidos cargados negativamente a pH fisiológico.

La mezcla de fosfolípidos de la membrana de *S. aureus* presentó una transición ancha asimétrica con una temperatura de transición aproximadamente a 45 °C (figura 2). La adición de cantidades crecientes de ácido elágico a las membranas modelo de MRSA no produjo cambios notables en el perfil calorimétrico de la mezcla fosfolipídica, aunque sí se observó un leve desplazamiento de la temperatura media de la transición (T_m) hacia temperaturas más bajas a concentraciones por

encima del 20% molar. En el caso de la punicalagina, se observó un comportamiento bastante más complejo.

A una proporción de 10% molar de punicalagina se observó la aparición de un nuevo pico a 42 °C, por debajo de la transición principal de la mezcla, lo que indicaría una posible separación de fases o una segregación de una fase lipídica influenciada por la interacción de la punicalagina. Este comportamiento desapareció a concentraciones mayores de punicalagina, a las que el perfil calorimétrico fue de nuevo parecido al de la mezcla lipídica en ausencia del compuesto polifenólico, pero sí apareció una pequeña transición aproximadamente a 52 °C que podría indicar la aparición de una nueva fase lipídica.

La incorporación de cantidades crecientes del flavonol miricetina (flavonol trihidroxilado en su anillo B) no produjo cambios en la T_m de la mezcla fosfolipídica pero, a partir de 10 mol%, indujo una drástica disminución de la entalpía de la transición, hecho que sugeriría que este flavonol se interpone entre las cadenas acílicas de los ácidos grasos de los fosfolípidos induciendo una disminución de la intensidad de las interacciones de Van der Waals dentro de la membrana.

La adición de cantidades crecientes de quercetina (flavonol dihidroxilado en su anillo B) en las membranas modelo de MRSA produjo una drástica disminución de la T_m hasta aproximadamente 42 °C a concentraciones iguales o mayores de 10%, disminuyendo también significativamente la entalpía de la transición a concentraciones iguales o mayores de 20% molar. Cuando se utilizó la quercetina en su forma glucosilada en la posición 3 del anillo central (quercetina-3-glucósido), se observó una leve disminución de la T_m a una concentración de 5% molar y una disminución de la entalpía de transición a concentraciones por encima del 10%.

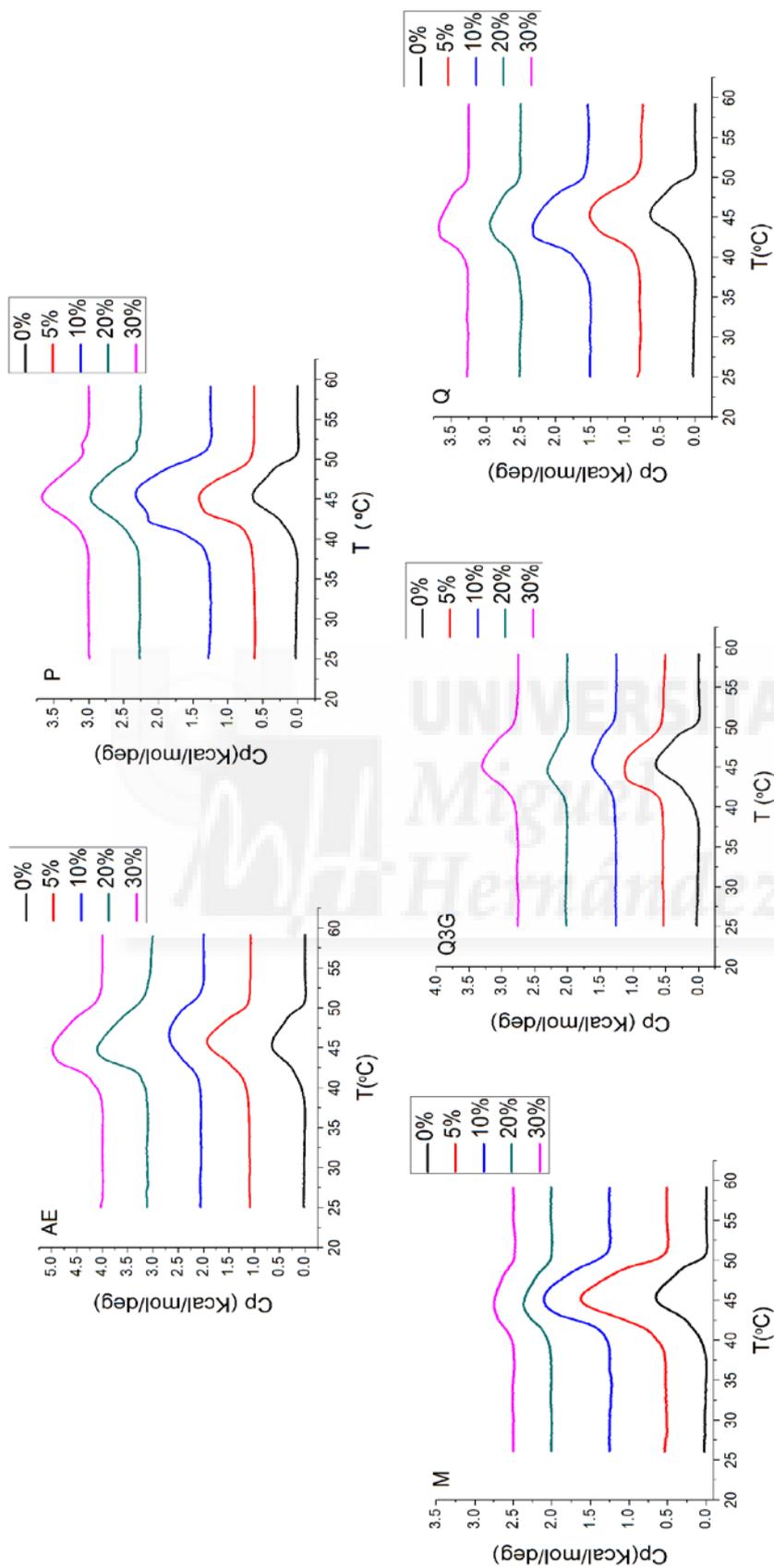


Figura 2. Termogramas de DSC para mezclas formadas por los principales lípidos de la membrana bacteriana modelo de MRSA, conteniendo cantidades crecientes de los diferentes compuestos polifenólicos utilizados. El porcentaje molar utilizado de cada compuesto respecto al total de lípidos se indica a la derecha de las curvas. Los termogramas se normalizaron respecto a la concentración total de fosfolípido. (Q) Quercetina; (AE) Ácido elálgico; (M) Miricetina; (P) Punicalagina; (Q3G) Quercetina-3-glucósido.

Alternativamente, se estudió el efecto de los mismos compuestos en una membrana modelo formada por lípidos extraídos de la membrana de *E. coli* (57,5 PE: 15,1 PG: 9,8 CA: 17,6 otros lípidos). En la presente memoria, sólo se presenta el efecto de la incorporación de un 20% molar de cada uno de los polifenoles, pues el resto de concentraciones no mostraron diferencias significativas con respecto a los perfiles calorimétricos mostrados en la figura 3.

El termograma de la mezcla de lípidos de *E. coli* mostró una transición relativamente cooperativa con una T_m de aproximadamente 8 °C. La adición de cantidades crecientes de punicalagina o de quercetina no produjo cambios significativos ni en la temperatura ni en la entalpía de la transición.

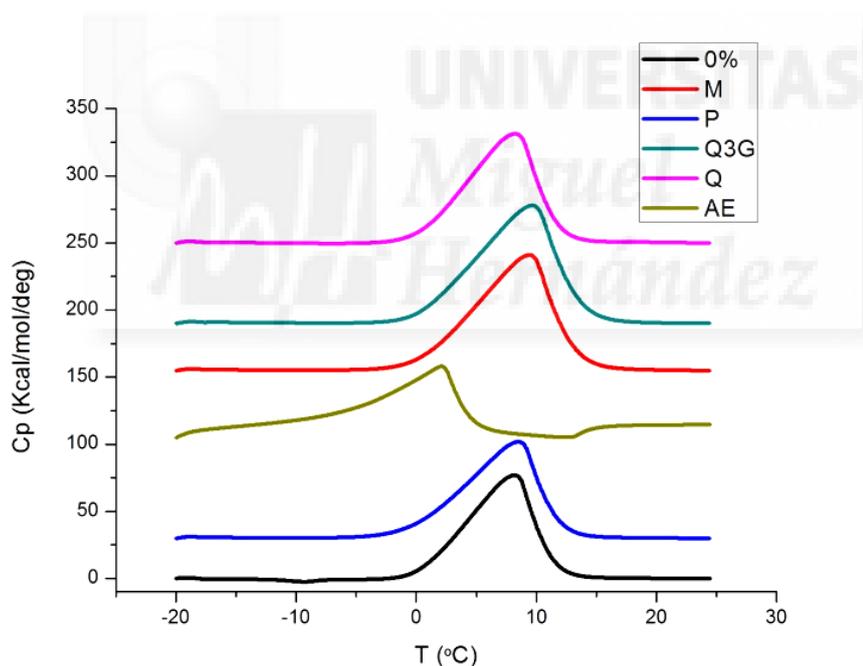


Figura 3. Termogramas de DSC para mezclas formadas por fosfolípidos de la membrana de *E. coli*. Los compuestos fueron añadidos a un 20% molar respecto al total de fosfolípido. (Q) Quercetina; (AE) Ácido elágico; (M) Miricetina; (P) Punicalagina; (Q3G) Quercetina-3-glucósido.

En cambio, la adición de 20% molar de los flavonoles miricetina o quercetina-3-glucósido produjo un leve aumento de la temperatura de transición hasta casi 10 °C, indicando un leve aumento de la estabilidad de la membrana fosfolipídica. Por el contrario, la incorporación de 20 mol% de ácido elágico produjo un drástico descenso de la T_m hasta aproximadamente 1,3 °C, hecho que revela una fuerte desestabilización de la membrana por parte de este compuesto.

En la tabla 2 se muestran los parámetros termodinámicos correspondientes a las transiciones de fase tanto de la mezcla lipídica de *S. aureus* como de la mezcla lipídica de *E. coli*.

Mezcla lipídica MRSA	Onset (°C)	End (°C)	Área (mJ)	ΔH (J/g)	T _m (°C)
0%	41.53	50.42	62.42	31.21	45.42
AE 20%	41.64	51.72	110.81	55.00	44.82
P 20%	40.65	50.70	75.51	37.75	44.37
M 20%	40.59	49.93	34.81	17.41	44.43
Q3G 20%	41.30	49.56	22.22	11.11	44.58
Q 20%	40.27	49.45	41.92	20.96	44.03
Extracto lipídico <i>E. coli</i>	Onset (°C)	End (°C)	Área (mJ)	ΔH (J/g)	T _m (°C)
0%	0.29	11.09	15455.28	7727.64	8.24
AE20%	-2.29	2.13	1057.72	528.86	1.31
P 20%	-0.49	11.19	15531.77	7767.385	8.48
M 20%	0.37	12.44	17933.92	8966.96	9.43
Q3G 20%	0.44	12.84	18237.57	9118.78	9.66
Q 20%	0.23	11.16	16503.33	8251.66	8.25

Tabla 2. Parámetros termodinámicos del área del pico en DSC tras la adición del 20% molar de los compuestos estudiados en ambas membranas sintéticas. (Q) Quercetina; (AE) Ácido elágico; (M) Miricetina; (P) Punicalagina; (Q3G) Quercetina-3-glucósido. Onset: indica la temperatura del inicio de transición; End: indica la temperatura del final de la transición; T_m: temperatura media del cambio de fase; ΔH: entalpía de transición (cantidad de energía absorbida para el cambio de fase).

IVd.3. Afinidad de los diferentes compuestos polifenólicos por la membrana

Los resultados obtenidos en el apartado anterior ponen de manifiesto que los compuestos polifenólicos estudiados tienen cierta capacidad para perturbar el orden lipídico y las interacciones entre los fosfolípidos dentro de las membranas.

Esta capacidad puede estar relacionada con su hidrofobicidad y, por lo tanto, con su capacidad para insertarse en las membranas lipídicas, o alternativamente, con su capacidad para interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos y, de este modo, indirectamente perturbar las interacciones entre las cadenas acílicas dentro de las membranas.

Para determinar la relación entre la hidrofobicidad de los polifenoles y su capacidad para incorporarse a las membranas modelo, se determinó por una parte, su coeficiente de partición octanol/agua y, por otra, su coeficiente de partición en los modelos de membrana de MRSA y de *E. coli* utilizados en el presente capítulo, tal y como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos.

En general, parece observarse una correlación entre hidrofobicidad y partición en membranas en la mayoría de los casos. En el caso de las membranas de MRSA los resultados obtenidos muestran que, a mayor Log Po/a, mayor es la incorporación de los polifenoles en las vesículas fosfolipídicas, a excepción del caso de la miricetina, la cual, a pesar de presentar un alto coeficiente de partición octanol/agua, muestra una baja afinidad por las membranas modelo de MRSA. Este hecho puede ser debido a que, a pesar de su buena hidrofobicidad en disolución, este compuesto presente dificultades para incorporarse a ciertas membranas debido a la presencia de tres grupos –OH en su anillo B (Halder J et al., 1998; Bombardelli, 1991; Ratty AK et al., 1988).

En este modelo, punicalagina y ácido elágico mostraron bajos niveles de incorporación mientras que las dos quercetinas mostraron valores mayores de incorporación a las vesículas siendo la quercetina aglicona la que presentó mayor coeficiente de partición.

	$P_{o/a}$	K_p
AE	1.0355 ± 0.2052	0.557847 ± 0.00015
P	1.1442 ± 0.1031	0.473758 ± 0.00006
M	7.6892 ± 2.9387	0.1226 ± 0.0015
Q	4.4478 ± 0.4983	38.2674 ± 0.3239
Q3G	2.3389 ± 0.2437	4.2282 ± 0.01436

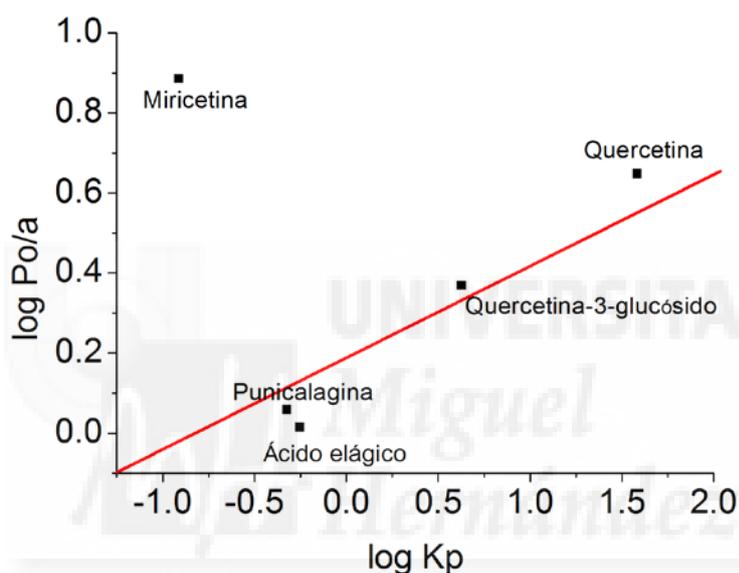


Figura 4. Relación de la afinidad de los compuestos por la membrana sintética del MRSA, con su hidrofobicidad. $P_{o/a}$ coeficiente octanol agua que determina la hidrofobicidad de los compuestos y K_p determina afinidad a la membrana.

Para el caso del modelo de membranas de *E. coli*, también se observó una buena correlación entre $\log P_{o/a}$ y K_p , excepto para el caso del ácido elágico, el cual, a pesar de poseer un $\log P_{o/a}$ bajo, mostró una afinidad importante por las membranas de *E. coli*. En este sistema, los flavonoles miricetina y quercetina presentaron una fuerte afinidad por las vesículas, mientras que la quercetina-3-glucósido y la punicalagina mostraron valores más bajos.

	$P_{o/a}$	K_p
AE	1.0355 ± 0.2052	1.0100051 ± 0.00434588
P	1.1442 ± 0.1031	0.05753464 ± 0.0004915
M	7.6892 ± 2.9387	64.2350674 ± 0.3930235
Q	4.4478 ± 0.4983	$45.9656786 \pm 0.64156724$
Q3G	2.3389 ± 0.2437	$0.66310094 \pm 0.00438359$

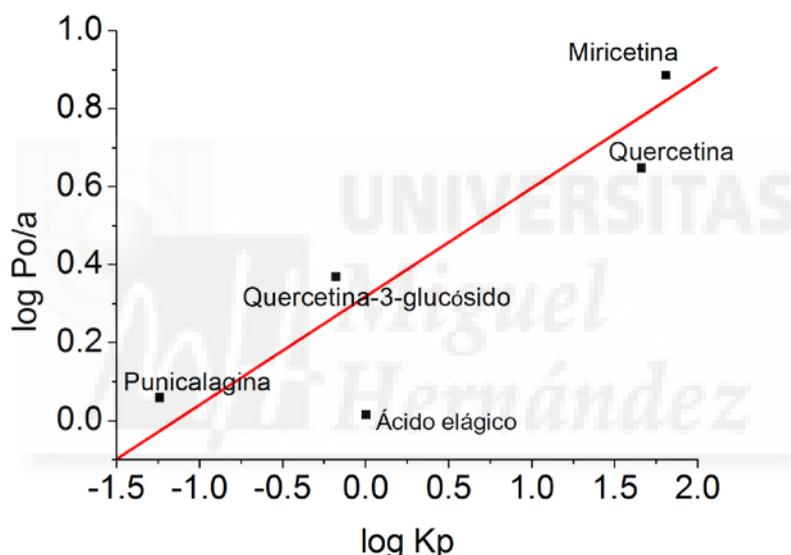


Figura 5. Relación de la afinidad de los compuestos por el extracto lipídico de la *E.coli*, con su hidrofobicidad. $P_{o/a}$ coeficiente octanol agua que determina la hidrofobicidad de los compuestos y K_p determina afinidad a la membrana. El porcentaje de la tabla muestra el máximo de compuesto en molar que las vesículas fosfolipídicas son capaces de retener.

IVd.4. Permeabilización de vesículas formadas por lípidos de MSSA y de *E.coli* mediante compuestos polifenólicos

Con el fin de detectar la capacidad de los diferentes polifenoles seleccionados en apartados anteriores para promover perturbaciones en la integridad de las vesículas formadas por los dos modelos de membranas bacterianas (MSSA y *E. coli*), se utilizó un ensayo de liberación de

contenidos (leakage) en vesículas fosfolípídicas cargadas con la sonda fluorescente carboxifluoresceína.

Para ello, se adicionaron cantidades crecientes de los compuestos polifenólicos a vesículas unilamelares grandes (LUVs) cargadas con carboxifluoresceína y se determinó la liberación de la sonda mediante el aumento de la fluorescencia.

Para este ensayo, se utilizó el modelo de membrana MSSA porque sus LUVs eran más estables, como se discutió anteriormente en el apartado de medición de tamaño de partícula de las muestras.

Los resultados muestran que, utilizando vesículas modelo de MSSA, el ácido eláxico y su polímero, la punicalagina, produjeron el nivel más alto de liberación de carboxifluoresceína a un porcentaje molar de 40% (12-20% de leakage) (Figura 6). Los flavonoles quercetina y su forma glicosilada produjeron un nivel menor de liberación, aproximadamente 7%, mientras que la miricetina apenas afectó a las membranas de MSSA incluso a una concentración del 40%.

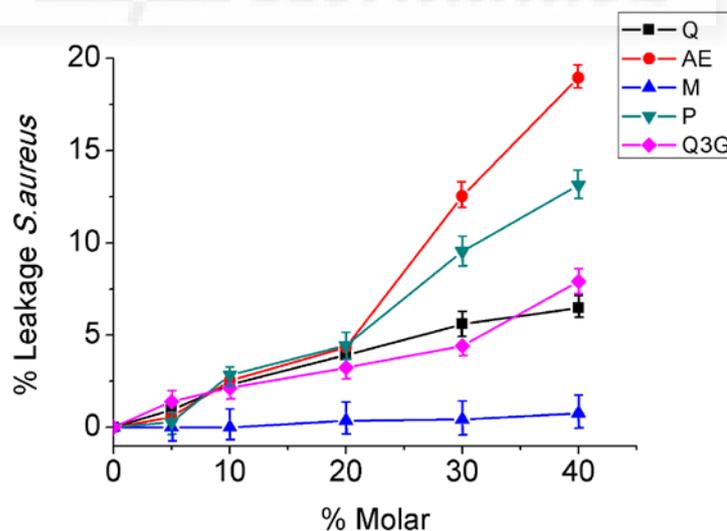


Figura 6. Leakage en membranas modelo de MSSA en presencia de cantidades crecientes de compuestos polifenólicos. (Q) Quercetina; (AE) Ácido eláxico; (M) Miricetina; (P) Punicalagina; (Q3G) Quercetina-3-glucósido.

En el caso de las vesículas formadas por lípidos de *E. coli* (figura 7), al ácido elágico también produjo el nivel más alto de liberación de contenidos (55% a un porcentaje molar de 40%), mientras que el resto de compuestos (flavonoles y punicalaginas) presentaron valores similares de liberación, 25-35%, cuando fueron utilizados a un porcentaje molar de un 40%. Estas diferencias se deben probablemente a las diferencias en la composición de las membranas.

Mientras que las membranas modelo de MSSA están formadas fundamentalmente por DPPG, un fosfolípido cargado positivamente y con una cabeza polar de gran tamaño, las membranas de *E. coli* están formadas mayoritariamente por fosfatidiletanolamina, un fosfolípido zwitteriónico.

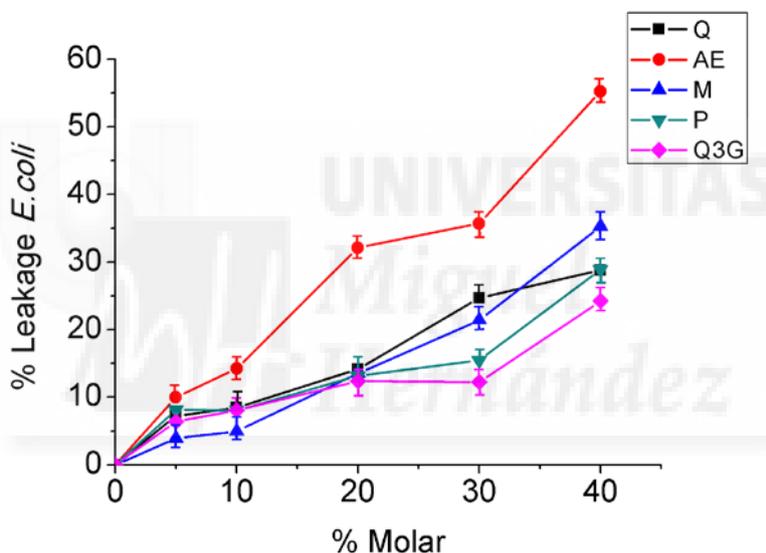


Figura 7. Leakage en membranas modelo de *E. coli* en presencia de cantidades crecientes de compuestos polifenólicos. (Q) Quercetina; (AE) Ácido elágico; (M) Miricetina; (P) Punicalagina; (Q3G) Quercetina-3-glucósido.





V. Discusión

V.1. Factores que influyen en el contenido polifenólico de los extractos de plantas *Cistáceas*

En la presente memoria se ha podido determinar cómo el tipo de extracción y el procedimiento de secado afectan drásticamente a la actividad biológica y a la composición de los extractos de plantas del género *Cistus*. Sin embargo, también se ha podido constatar, cómo el mayor contenido en polifenoles en los extractos no siempre se correlaciona con la mayor capacidad antibacteriana. De forma general, los extractos de *Cistáceas* obtenidos por extracción hidroalcohólica seguida de secado por atomización han proporcionado mayores rendimientos de extracción (10-12,1%, w/w), mayor contenido fenólico, y mayor poder inhibitorio del crecimiento de *E. coli*. Por el contrario, los que mayor poder inhibitorio presentaron frente a *S. aureus* fueron los de extracción acuosa seguida de secado por pulverización, especialmente los extractos obtenidos a partir de *C. salviifolius*, *C. clusii* y *C. albidus*, lo que indica el carácter polar de los compuestos más activos contra esta bacteria. Para estos extractos obtenidos mediante extracción acuosa y secado por atomización, se consiguieron los rendimientos más altos de todas las especies de *Cistus* probadas (6,2 a 8,5%, w/w) en comparación con la liofilización (2,99 a 4,30%, w/w). Esto podría deberse a pérdidas durante el procedimiento de concentración de la muestra antes del proceso de liofilización, lo que se evita cuando se utiliza el proceso de secado por atomización (SDY).

Además, puede observarse que los extractos liofilizados presentan un menor contenido fenólico y en flavonoides y, por tanto, una menor capacidad antimicrobiana frente a *S. aureus*, en comparación con los extractos acuosos secados por SDY. Este efecto, fue especialmente notable para los extractos de *C. clusii* y *C. ladanifer*. Por tanto, este resultado podría revelar que ciertos compuestos polares que contribuyen a la inhibición de *S. aureus*, se degradan durante la preparación del extracto.

La explicación más razonable de este comportamiento puede ser la degradación de ciertos compuestos bioactivos durante la etapa de concentración a 50-60 °C o la eliminación de compuestos volátiles, tales como algunos terpenos antimicrobianos, que contribuyen a la capacidad antimicrobiana (Gertsch, 2011; Greche et al., 2009). Por otra parte, el quimiotipo de las especies de *Cistus* también pareció influir en el comportamiento antimicrobiano, dado que los extractos derivados de *C. salviifolius* fueron los más activos contra *S. aureus*, independientemente del procedimiento de extracción / secado utilizado.

Otro resultado constatable, en concordancia con resultados de otros autores, fue la marcada influencia de la época de recolección de la planta en la composición del extracto final (Chaves et al., 1997, 2001; Sosa et al., 2005). Nuestros resultados revelan una elevada carga polifenólica si la planta se recoge durante la época de mayor exposición solar, es decir en verano, tal y como se ha podido observar en el extracto S4 obtenido de una planta recolectada en agosto-septiembre, el cual tiene una concentración polifenólica superior al extracto acuoso obtenido de la planta recolectada en noviembre (S2a). Este resultado puede ser debido a que la planta incrementa la producción de ciertos polifenoles como mecanismo de defensa frente a la radiación UV.

Por último, el análisis semicuantitativo de la composición de los extractos más activos en el presente trabajo, denota que la capacidad inhibitoria de *S. aureus* parece estar relacionada con derivados de elagitaninos y otros compuestos solubles en agua, mientras que la capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli* estaría más relacionada con la presencia tanto de elagitaninos como de flavonoles.

V.2. La sinergia entre los elagitaninos y flavonoles puede explicar la fuerte capacidad antimicrobiana del extracto de *C. salviifolius* frente a *S. aureus*

En el capítulo segundo de la presente tesis doctoral, se presenta por primera vez la interacción sinérgica entre el ácido elágico, flavonoles y entre elagitaninos y flavonoles, lo que podría explicar la fuerte capacidad antimicrobiana del extracto de *C. salviifolius* y la de otros extractos

botánicos que contienen estos compuestos a la misma o parecida concentración. Se ha descrito con anterioridad que algunas mezclas botánicas pueden proporcionar mezclas de compuestos bioactivos con capacidad de ejercer efectos terapéuticos sinérgicos (Gertsch 2011; Wagner 2011).

Los resultados obtenidos sugieren que ciertas combinaciones de los compuestos polifenólicos estudiados pueden presentar actividad sinérgica en relación a la capacidad inhibitoria del crecimiento de *S. aureus*. Por ejemplo, las combinaciones entre los dos flavonoles, Q3G + M y entre un elagitanino y su forma monomérica, el ácido elágico (AE + P), exhibieron un comportamiento sinérgico claro. Por el contrario, las combinaciones entre diferentes familias de compuestos proporcionaron resultados diversos según la combinación probada. En el caso de la mezcla M + AE, el resultado fue indiferente para todas las proporciones probadas. La mezcla Q3G + P mostró indiferencia a ciertas proporciones, mientras que reveló baja interacción sinérgica a otras proporciones.

Para las otras dos combinaciones cruzadas entre diferentes familias, M + P y AE + Q3G, a pesar de que se observó un comportamiento sinérgico significativo a partir del gráfico isobolol, no todas las proporciones exhibieron valores FICI sinérgicos, ya que algunas proporciones fueron aditivas.

Diversos autores han propuesto posibles mecanismos de acción farmacológica a partir del estudio del comportamiento *in vitro* de mezclas de compuestos de estudios de sinergia (Wagner, 2011) (figura 1), que han de ser posteriormente corroborados a nivel clínico en comparación con fármacos estándar a dosis equivalentes y para la misma indicación.

A continuación, se discutirá el comportamiento sinérgico de las diferentes mezclas estudiadas y su posible mecanismo farmacológico.

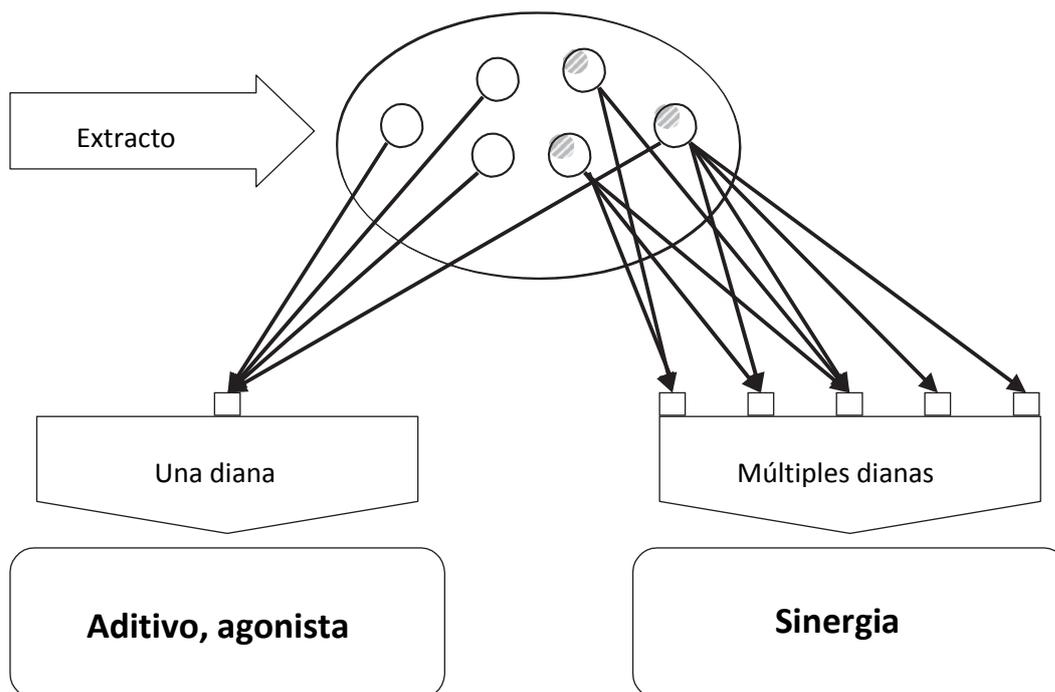


Figura 1. Descripción gráfica simplificada e idealizada de los efectos mono- y multi-dianas generados por un extracto a un objetivo celular diferente.

Para la mezcla AE + Q3G, el mejor comportamiento sinérgico se observó a la proporción 1:7 (w/w), es decir, a la mayor proporción de Q3G. Este resultado, revela que se requiere un correcto equilibrio de AE para obtener sinergia con Q3G y para disminuir fuertemente los valores de CIM₅₀. Este hecho, podría explicarse por la capacidad del AE para alcanzar varias dianas y cooperar tanto de una forma agonista como de una manera sinérgica y que se maximiza a altas concentraciones de Q3G (Wagner 2011). Es decir, si se aumenta la cantidad de AE en la mezcla, la eficacia no mejora, lo más probable porque todos los receptores de AE, ya estén ocupados.

Se puede suponer un efecto similar para las combinaciones Q3G + M, Q3G + P y M + P, a las proporciones 1: 3 o 1: 7 (w/w). Para estas combinaciones, se observa un efecto máximo que se alcanza al añadir más cantidad del segundo componente.

En cuanto al comportamiento sinérgico entre punicalagina y ácido elálgico (P + AE), al obtenerse un efecto sinérgico tan fuerte en todas las proporciones probadas, se postula que el mecanismo de acción para esta mezcla podría basarse en la interacción con múltiples dianas moleculares.

La combinación de estos compuestos podría afectar a diversos procesos celulares vitales en la bacteria, tanto para la síntesis como para el transporte de metabolitos y biomoléculas como para las labores de reconocimiento celular y adaptación de la bacteria. Tal es el caso de algunos extractos de plantas que al contener taninos, presentan propiedades bacteriostáticas mediante la inhibición de la formación de biopelículas a través del daño en la membrana bacteriana (Trentin et al. 2013).

Por otro lado, es interesante destacar que la miricetina se comportó de forma sinérgica con la punicalagina, sin embargo, no se observó sinergia cuando se combinó la miricetina con el monómero de la punicalagina, el ácido elálgico. Desde un punto de vista mecanicista, este hecho podría ser debido a que la punicalagina tiene la capacidad de alcanzar una diana molecular vital en la membrana bacteriana debido a su tamaño más grande, mientras que el monómero no sería capaz de intraccionar con la misma diana.

En relación a los flavonoles estudiados, si comparamos las combinaciones Q3G + P y M + P, se puede concluir que la M contribuye más que la Q3G al comportamiento sinérgico cuando se mezclan con P en idéntica concentración, ya que se obtiene un valor inferior FICI. Dadas las diferencias estructurales entre estos dos flavonoles, la mayor capacidad antimicrobiana de la miricetina podría deberse a la presencia del grupo trihidroxifenilo en el anillo B o a la ausencia de la glucosa, la cual podría suponer un impedimento estérico para la interacción con su diana molecular.

La cuantificación de los compuestos activos del extracto de *C. salviifolius* realizada en la presente memoria (tabla 1 capítulo segundo), nos permite hacer una estimación de las proporciones

aproximadas a las que se encontrarían en el extracto S2a, los compuestos estudiados de forma individual en los estudios de sinergia con un valor FICI de relevancia.

Estas proporciones son las siguientes:

Q3G + MY 1: 1,2; EA + PU 1: 3; MY + PU 1: 3; EA + Q3G 1: 1,6.
--

Si se comparan estas proporciones con las estudiadas en los estudios de sinergia del capítulo segundo de la presente memoria (tabla 3 capítulo segundo), podemos llegar a la conclusión de que las proporciones entre derivados de flavonoles, ácido elágico y punicalagina, miricetina y punicalagina y entre ácido elágico y quercetina en el extracto, son coincidentes. De ese modo, se puede explicar la intensa actividad antimicrobiana del extracto de *C. salviifolius*.

Por otra parte, los valores FICI correspondientes con la mayor capacidad sinérgica del presente estudio, se sitúan en un rango similar a los valores encontrados previamente para combinaciones sinérgicas entre ciertos antibióticos y aceites esenciales de plantas (Rosato et al 2007; Joray et al 2011) o para elagitaninos (Hussin y El-Sayed 2011), lo que refuerza la importancia de los resultados obtenidos. Además, de acuerdo con nuestros resultados, podría postularse que la capacidad antibacteriana encontrada en los extractos de granada, podría ser debida a la acción sinérgica entre elagitaninos, antocianinas (pelargonidina-3-galactosa y cianidina-3-glucosa) y flavonoles (quercetina y miricetina) (Howell y D'Souza 2013). No obstante, hasta la fecha no se ha realizado un estudio detallado de actividad sinérgica entre estos compuestos polifenólicos de forma aislada, estudio que sería necesario para corroborar esta hipótesis.

El presente estudio supone un primer paso en la búsqueda del posible mecanismo de acción de la potente actividad antimicrobiana del extracto de *C. salviifolius* y postula que ésta puede deberse a una acción sinérgica entre ciertas proporciones de elagitaninos y flavonoles.

Futuras investigaciones en este sentido y que ya están en curso, se están dirigiendo hacia el estudio de la capacidad antimicrobiana de este extracto y de sus compuestos principales, pero esta vez estudiando su bioactividad frente a cepas clínicas hospitalarias patogénicas como es el caso de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA).

V.3. Los extractos ricos en flavonoides, como el de *Hibiscus sabdarifa* y de *C. salviifolius*, aumentan el tiempo de generación en organismos patógenos modelo mostrando una actividad de amplio espectro

En el capítulo tercero de la presente memoria se ha podido demostrar cómo los extractos de *C. salviifolius* (S2), *H. sabdariffa* purificado (HSP) y *C. ladanifer* (L2P) han proporcionado los mejores resultados en la disminución del crecimiento y en el aumento del tiempo de generación tanto frente a bacterias Gram-positivas como frente a Gram-negativas. El extracto de S2 ha presentado los mejores resultados frente a *S. aureus* seguido del extracto de HSP, mientras que el extracto de S2 ha mostrado la mayor capacidad frente a *E. coli* seguido del de L2P.

Si se analiza la composición de estos extractos, se puede observar que el extracto de S2, posee aproximadamente un 10-12% (% en peso seco del total de polifenoles) de elagitaninos y ácido elágico y una cantidad similar de flavonoides, fundamentalmente flavonoles (quercetina y miricetina). El extracto de L2P, posee mayoritariamente ácidos fenólicos y flavonoles (derivados de quercetina y kaempferol) y una cantidad menor de punicalagina. Por último, el extracto de HSP contiene ácidos orgánicos y aproximadamente un 18% de antocianinas, un 7% de ácidos orgánicos (mayoritariamente ácido clorogénico) y un 3% de flavonoles (quercetina, miricetina y kaempferol) (Fernández-Arroyo et al., 2011; Herranz-López et al., 2012).

En un intento de correlacionar las actividades obtenidas con la composición de los extractos, podría postularse que la mayor capacidad en la inhibición de *S. aureus* estaría asociada con la presencia de elagitaninos, ácido elágico y flavonoles, probablemente glicosilados, de ahí la menor capacidad del HSP frente a S2. Por otro lado, la inhibición de *E. coli* se correspondería

más con la presencia de flavonoles, los cuales son ciertamente abundantes en S2, pero lo son menos tanto en L2P como en HSP, aunque también existiría cierta contribución a esta actividad por parte de algunos flavonoles.

En concordancia con nuestros resultados, diversos estudios han mostrado la capacidad antimicrobiana del ácido elágico (kiyama, H et al., 2001; Leal, I. C. R et al., 2011; Lu, H. F et al., 2005; Rúa J et al., 2010; Seeram, N. P et al., 2005), la punicalagina (Taguri, T et al., 2004; Seeram, N. P et al., 2005) y otros derivados de elagitaninos.

Además, tal y como hemos podido comprobar, la mayor actividad del extracto de S2 parece deberse a las posibles interacciones sinérgicas entre los diferentes flavonoles y elagitaninos del extracto (Tomás-Menor et al., 2013; Tomás-Menor et al., 2015). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en los capítulos primero y segundo.

En relación a la actividad inhibitoria del crecimiento de *C. albicans*, un hongo levaduriforme, se ha encontrado un mayor número de extractos de composición diferente con capacidad inhibitoria, lo que demuestra que la inhibición de este hongo está producida por un espectro mayor de compuestos como es el caso de las antocianinas y los ácidos fenólicos (HS, HSP y HA), los fenilpropanoides (LC32), los norlignanós (HR) y los flavonoles glicosilados (HSP y HA), compuestos, todos ellos, con una gran solubilidad en agua.

Todos estos extractos, han demostrado capacidad en la disminución de la población microbiana durante la fase de crecimiento exponencial, además de ser capaces de doblar o incluso triplicar dependiendo de la cepa, el tiempo de duplicación microbiana, consiguiendo en algunos casos cinéticas similares a los controles con antibióticos (kanamicina) o fungicidas (Delvolid®).

En la bibliografía se pueden encontrar diversos estudios sobre la capacidad antimicrobiana de extractos vegetales ricos en flavonoides como *Hypericum sp.* (Dall'Agnol R et al., 2003), *Capsella sp.* (El-Abyad MS et al., 1990), *Chromolaena sp.* (El-Abyad MS et al., 1990) y, finalmente el

propóleo, que ha sido estudiado por su concentración en flavonoides y su actividad contra bacterias y hongos (Bosio K et al., 2000; Hegazi AG et al., 2000; Pepeljnjak S et al., 1982; Grange JM et al., 1990). Por otro lado, si nos centramos en estudios que corroboren la actividad de los principales flavonoles presentes en los extractos más activos estudiados, se pueden encontrar numerosas evidencias sobre su capacidad antimicrobiana: quercetina (Waage SK et al., 1985; el-Gammal AA et al., 1986; Hirai, I et al., 2010; Pawlikowska-Pawlega, B et al., 2007), kaempferol (Cacig, S et al., 2006; Lu, Y. H et al., 2002; Şohretoğlu, D et al., 2011) y miricetina (Hosni, K et al., 2013; Oliveira, I et al., 2007).

Por otro lado, existen publicaciones previas que demuestran la actividad antimicrobiana del ácido clorogénico (Fiamegos, Y. C et al., 2011; Hosni, K et al., 2013) y de diversas antocianidinas (Leitão, D. P. S et al., 2005; Issam Alshami et al., 2014), lo que corrobora el efecto observado en la presente memoria para los extractos de HS, HSP y HA.

Los resultados obtenidos sobre la capacidad de estos extractos para disminuir la población microbiana y su tiempo de duplicación podrían sentar las bases para el diseño de potenciales conservantes o antisépticos para el sector de la higiene o de la cosmética. A este respecto, en el ANEXO I, se presenta un estudio preliminar realizado con el objetivo de conocer la capacidad conservante de varios extractos de plantas *Cistáceas* en una emulsión hidratante con fase externa acuosa. Para la realización de esta prueba, se utilizó un test de desafío microbiológico (Challenge test) aprobado por la *Farmacopea Europea*, mediante el cuál se determinó la estabilidad y calidad microbiológica del producto prototipo a evaluar. Los resultados fueron muy satisfactorios para estos extractos.

Dado que los extractos de plantas del género *Cistus* o bien los principales compuestos que han demostrado actividad antimicrobiana sinérgica (Tomás-Menor et al., 2015) son también potentes antioxidantes en comparación con otros extractos (Laporta et al., 2007; Funes et al., 2009), podrían llegar a actuar no sólo como conservantes, sino como principios bioactivos en

diversas formulaciones farmacéuticas y cosméticas como protectores de daño tisular, con una capacidad probablemente mayor a la observada para el hidroxitirosol o el resveratrol (Fernández-Mar, M. I., R. Mateos., et al. 2012).

V. 4. Los elagitaninos y el ácido elágico producen un mayor efecto desestabilizador sobre las membranas bacterianas que los flavonoles: interacción con diferentes dianas moleculares.

En la presente memoria se utilizaron varios ensayos complementarios, usando membranas modelo, con el objetivo de explorar la posibilidad de que algunos de los compuestos mayoritarios del extracto de *C. salviifolius* tuviesen la capacidad de perturbar membranas sintéticas formadas por los lípidos mayoritarios de *S. aureus* y de *E. coli* respectivamente, hecho que podría contribuir a su capacidad antimicrobiana. Los ensayos realizados en membranas sintéticas de MRSA demuestran que los flavonoles, sobre todo la miricetina, promovieron una disminución de la entalpía de la transición de fase de la mezcla de fosfolípidos lo que indica un debilitamiento de las fuerzas de Van der Waals de la empaquetada fosfolipídica, bien por inserción parcial en la membrana o a través de su interacción con las cabezas polares del fosfolípido mayoritario L-DPPG. En cambio, el AE indujo una leve disminución de la T_m , que muestra una desestabilización de la membrana, y la P promovió la aparición de separación de fases.

Los ensayos realizados con membranas sintéticas de *E. coli* demuestran un fuerte efecto sobre estas membranas por parte del AE, el cual parece desestabilizar fuertemente la bicapa fosfolipídica. Este compuesto polifenólico posee una estructura planar y varios grupos hidroxilo y carbonilo en su estructura, por lo que se podría insertar en la bicapa fosfolipídica interaccionando con las cabezas polares de los fosfolípidos a través de sus grupos más polares.

El resto de compuestos estudiados apenas modificó el perfil calorimétrico de la mezcla de lípidos de *E. coli*. El análisis de la hidrofobicidad de los compuestos a través de su coeficiente de partición octanol/agua ($\log P_o/a$), ha demostrado una buena correlación entre este parámetro y

la partición de estos compuestos tanto en membranas de *S. aureus* como de *E. coli*, aunque se observan algunas discrepancias. En el caso de las membranas de *S. aureus*, los compuestos más hidrofóbicos fueron los que más afinidad tuvieron por las vesículas, Q y Q3G, mientras que P y AE fueron los más hidrofílicos y los que menos se incorporaron. La miricetina, a pesar de ser relativamente hidrofóbica, presentó una baja incorporación en las membranas. No obstante, este compuesto produjo un efecto similar a los demás flavonoles. A pesar de los resultados obtenidos en DSC y de ser relativamente hidrofílicos, AE y P fueron los compuestos que mayor poder tuvieron para desestabilizar y perturbar las membranas de *S. aureus* en los ensayos de liberación de contenidos, seguidos de los flavonoles Q y Q3G.

En las membranas de *E. coli*, los flavonoles M y Q fueron los compuestos que mostraron una mayor incorporación. El AE también presentó un grado de incorporación notable, a pesar de ser bastante hidrofílico, hecho que justificaría el fuerte efecto desestabilizador observado por DSC, que concuerda con su notable efecto perturbador de la integridad de la membrana observado en los ensayos de liberación de contenidos. Se postula que este efecto podría tener lugar a través de la interacción por puente de H entre los grupos –OH o CO del AE y las cabezas polares de PE y PG. Q3G presentó una partición similar a AE pero sus efectos en la membrana fueron similares a los observados para M y Q.

Los efectos aquí observados en membranas de *E. coli* por el AE son mucho más intensos que los descritos con anterioridad para otros compuestos naturales con capacidad antimicrobiana como el hipoxósido o el rooperol (Laporta et al., 2007).

En general, los resultados obtenidos demuestran que los compuestos polifenólicos más hidrofóbicos, como es el caso de los flavonoles, no son precisamente los que provocan una mayor desestabilización de las membranas modelo estudiadas.

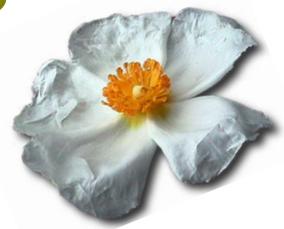
En cambio, el ácido elágico y sus polímeros, como la punicalagina, poseen un efecto desestabilizador mucho mayor, tanto en *S. aureus* como en *E. coli*, que podría contribuir a su mayor capacidad antimicrobiana, así como a la actividad del extracto completo, a pesar de ser relativamente hidrofílicos. Estos resultados están en concordancia con los observados en anteriores estudios (Tomás-Menor et al., 2013; Tomás-Menor et al., 2015; Taguri et al., 2006) y los efectos son similares a los observados por otros compuestos como el agente antibacteriano y fungicida triclosan, el cual también es capaz de disminuir la transición de fase lipídica, generar separaciones de fase y perturbar la integridad de la membrana en membranas modelo (Villalaín et al., 2001).

En el presente estudio se ha observado que los flavonoles (Q, Q3G y M), aunque son bastante más hidrofóbicos que los elagitaninos y podrían tener la capacidad de insertarse en las membranas bacterianas, poseen un menor efecto desestabilizador de las mismas. Cabe pensar que estos compuestos podrían ejercer su acción antimicrobiana de una forma complementaria a los elagitaninos. Dados los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la fuerte capacidad antibacteriana descrita en los capítulos segundo y tercero de resultados de la presente memoria, se postula que algunos flavonoles pudiesen ejercer su efecto antibacteriano a través de la modulación del metabolismo bacteriano, como es el caso de la inhibición de la síntesis de proteínas de membrana o de proteínas responsables de la síntesis de lípidos de membrana, como se ha observado para algunas catequinas (Ashley et al., 2014; Peter W. Taylor et al., 2005). De este modo, el efecto de los flavonoles y de los elagitaninos sería complementario y explicaría la actividad sinérgica observada en su actividad antibacteriana contra *S. aureus*.





VI. Conclusiones



1. Los extractos acuosos de *C. salviifolius* exhiben efectos bacteriostáticos y bactericidas potentes frente a *S. aureus* y significativos frente a *E. coli* en comparación con las otras especies estudiadas (*C. clusii*, *C. albidus* y *C. ladanifer*). Esta capacidad se incrementa al enriquecer el extracto en su contenido polifenólico mediante cromatografía de afinidad.
2. El proceso extractivo más adecuado para conseguir la mayor concentración de polifenoles bioactivos de los extractos de *Cistus* obtenidos es la extracción acuosa seguida de secado por pulverización (SDY).
3. El análisis semicuantitativo de la composición de los extractos de *C. salviifolius* indica que la capacidad inhibitoria de *S. aureus* parece estar relacionada con derivados de elagitaninos y otros compuestos solubles en agua, mientras que la capacidad para inhibir el crecimiento de *E. coli*, está más relacionada con la presencia tanto de elagitaninos como de flavonoles.
4. La actividad antimicrobiana, la capacidad antioxidante y el contenido polifenólico del extracto acuoso de *C. salviifolius* depende de la estacionalidad, presentando valores más altos en épocas estivales de recolección, probablemente debido a la mayor síntesis de compuestos polifenólicos en la planta como respuesta a la exposición UV.

5. Se han identificado por primera vez hasta 48 compuestos en el extracto acuoso de *C. salviifolius* utilizando cromatografía líquida de rápida resolución acoplada a espectrometría de masas con ionización por electrospray y analizador por tiempo de vuelo (RRLC-ESI-TOF-MS). Este extracto posee un porcentaje similar de ácido elágico y sus polímeros (los elagitaninos) que de flavonoides (10-12%).
6. El presente estudio supone la primera contribución sobre el comportamiento sinérgico en la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de diversas mezclas binarias formadas por derivados de flavonoles, ácido elágico y punicalaginas, siendo las más potentes aquellas formadas por AE + P y Q3G + M, aunque algunas combinaciones cruzadas entre flavonoles y elagitaninos también presentaron sinergia. Dado que los valores de CIM₅₀ encontrados para algunas mezclas están cercanos a la potencia de fármacos (0.5-1 µg/mL), estos estudios podrían sentar las bases para el diseño de nuevos antibióticos o productos sanitarios frente a cepas clínicas hospitalarias patogénicas de *S. aureus* como MRSA.
7. Los extractos de *C. salviifolius* (S2), *H. sabdariffa* purificado (HSP) y *C. ladanifer* (L2P) han proporcionado los mejores resultados en la disminución del crecimiento y aumento del tiempo de generación en experimentos de cinética microbiana frente a bacterias Gram-positivas y frente a Gram-negativas. El análisis de la composición de estos extractos, confirma que la mayor capacidad en la inhibición de *S. aureus* estaría asociada con la presencia de elagitaninos, ácido elágico y flavonoles, probablemente glicosilados, y la inhibición de *E. coli* se correspondería más con la presencia de flavonoles. En cambio, la capacidad inhibitoria de crecimiento del hongo levaduriforme *C. albicans* parece deberse a un grupo más heterogéneo de compuestos.

8. Los estudios realizados en modelos de membranas de *S. aureus* y de *E. coli* indican que los flavonoles (Q, Q3G y M), aunque son bastante más hidrofóbicos que los elagitaninos y por ello, deberían tener la capacidad de insertarse en las membranas bacterianas, poseen un menor efecto desestabilizador de las mismas que los elagitaninos. Se postula por tanto, que los flavonoles podrían ejercer su acción antimicrobiana a través de la modulación del metabolismo bacteriano, como es el caso la inhibición de la síntesis de proteínas de membrana o la modulación de proteínas responsables de la síntesis de lípidos de membrana, tal y como se ha observado para algunas catequinas. Este efecto, sería complementario al efecto desestabilizador de la membrana ejercido por los elagitaninos pudiéndose justificar un efecto sinérgico por la combinación de ambos tipos de compuestos.





BIBLIOGRAFÍA



- Ahmad, I. and F. Aqil (2007). "In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESBL-producing multidrug-resistant enteric bacteria." *Microbiological Research* 162(3): 264-275.
- Aiyegoro, O. A., A. J. Afolayan, et al. (2009). "Synergistic interaction of *Helichrysum pedunculatum* leaf extracts with antibiotics against wound infection associated bacteria." *Biological Research* 42(3): 327-338.
- Aiyegoro, O. A., A. J. Afolayan, et al. (2010). "Interactions of antibiotics and extracts of *helichrysum pedunculatum* against bacteria implicated in wound infections." *Folia Microbiologica* 55(2): 176-180.
- Aiyegoro, O. A. and A. I. Okoh (2009). "Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: Implications in antimicrobial chemotherapy." *Journal of Medicinal Plant Research* 3(13): 1147-1152.
- Ajali, U. and F. B. C. Okoye (2009). "Antimicrobial and anti-inflammatory activities of *Olax viridis* root bark extracts and fractions." *International Journal of Applied Research in Natural Products* 2(1): 27-32.
- Akiyama, H., K. Fujii, et al. (2001). "Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48(4): 487-491.
- Aladesanmi AJ, S. A., Leary JD. (1986). "Preliminary biological and phytochemical investigation of two Nigerian medicinal plants." *Int J Crude Drug Res* 24: 147-53.
- Alberts, B. J., A., J. Lewis, et al. (2002). "Molecular Biology of the Cell." Nueva York (USA): Garland Science Pub.
- Alkhamaiseh, S. I., M. Taher, et al. (2012). "The phytochemical content and antimicrobial activities of Malaysian *Calophyllum canum* (stem bark)." *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 25(3): 555-563.
- Al-Saleh FS, G. E.-D. A., Abbas JA, Saeed NA. (1997). "Phytochemical and biological studies of medicinal plants in Bahrain: family *Chenopodiaceae*. Part 2." *Int J Pharmacogn* 35: 38-42.
- Alves, D. S., L. Perez-Fons, et al. (2004). "Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin." *Biochem Pharmacol* 68(3): 549-61.
- Amaro-Luis, J. M., M. Adrián, et al. (1997). "Isolation, identification and antimicrobial activity of ombuoside from *Stevia triflora*." *Annales Pharmaceutiques Francaises* 55(6): 262-268.
- Appelbaum (2006). "The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Clin Microbiol Infect.* 12 (1): 16-23.
- Arima H, A. H., Danno G. (2002). "Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*." *Biosci Biotechnol Biochemical* 66: 1009-14.
- Arti Arora, T. M. B., Muraleedharan G. Nair, and Gale M. Strasburg (2000). "Modulation of Liposomal Membrane Fluidity by Flavonoids and Isoflavonoids." *Arch Biochem Biophys* 373(1): 102-109.
- Aruoma, O. I., B. Sun, et al. (2006). "Low molecular proanthocyanidin dietary biofactor Oligonol: Its modulation of oxidative stress, bioefficacy, neuroprotection, food application and chemoprevention potentials." *BioFactors* 27(1-4): 245-265.
- Barrajón-Catalán, E., S. Fernández-Arroyo, et al. (2010). "Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells." *Food Chem Toxicol* 48(8-9): 2273-82.
- Barrajón-Catalán E, F.-A. S., Roldán C, Guillén E, Saura D, Segura-Carretero A, Micol V (2011). "A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship." *Phytochem Anal* 22(4): 303-12.

- Barrajón-Catalán, A. Morales-Soto, et al. "Phytochemicals in essential oil and extracts derived from Rockroses (*Cistus*) plants: Characterization and uses. Essential Oils in Food Production, Preservation, Flavour and Safety." Elsevier 2015.
- Bassolé, I. H. N. and H. R. Juliani (2012). "Essential oils in combination and their antimicrobial properties." *Molecules* 17: 3989–4006.
- Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonès, G., Rodríguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Camps, J., Joven, J (2009). "The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans." *Phytomedicine* 17: 186–191.
- Benzie, I. F. F. and J. J. Strain (1996). "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay." *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-76.
- Berenbaum, M. C. (1989). "What is synergy?" *Pharmacological Reviews* 41(2): 93-141.
- Bergethon, P. R. (1998). "The Physical Basis of Biochemistry. The Foundations of Molecular Biophysics." Nueva York (USA).
- Bisignano, C., A. Filocamo, et al. (2013). "In vitro antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols." *FEMS Microbiology Letters* 341(1): 62-67.
- Bode M and P. U. (2013). "Evidence based traditional medicine: for whom and to what end?" *eJ Ind Med* 2013 6: 1-20.
- Boligon, A. A., T. F. Kubiça, et al. (2013). "Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts." *Acta Physiologiae Plantarum* 35(7): 2229-2239.
- Bombardelli E and S. M (1991). "Phospholipid-polyphenol complexes: a new concept in skin care ingredients." *Cosmet Toilet* 106: 69-76.
- Bosio K, A. C., D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. (2000). "In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes* ." *Lett Appl Microbiol* 31: 174–7.
- Braga, L. C., A. A. M. Leite, et al. (2005). "Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*." *Canadian Journal of Microbiology* 51(7): 541-547.
- Braga, L. K. A., A. K. C. de Macedo, et al. (2011). "Potentiation of in vitro antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L." *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5(19): 2145-2149.
- Bruker Daltonics. (May 2005). *microTOFcontrol 1.1. Operator Manual*.
- Cacig, S., F. Radu, et al. (2006). "Analysis of flavonoids in *Hydrangea paniculata* and *Ziziphus jujuba* extracts using flash chromatography and HPLC." *Analiza flavonoidelor din Hydrangea paniculata și Ziziphus jujuba prin flash cromatografie și cromatografie de lichide de înaltă performanță (HPLC)* 57(12): 1197-1201.
- Camargo, M. S., C. Bonacorsi, et al. (2011). "Quercetin reduces *Staphylococcus aureus* interaction with neutrophils." *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 3(3): 85-88.
- Cassandra L. Quave, Miriam Estévez-Carmona, et al. (2011). "Ellagic Acid Derivatives from *Rubus ulmifolius* Inhibit *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Improve Response to Antibiotics." *PLoS ONE* 7(e28737).

- Caturla, N., et al. (2003). "The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes." *Free Radical Biology and Medicine* 34(6): 648-662.
- Caturla, N., L. Perez-Fons, et al. (2005). "Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes." *Chem Phys Lipids* 137(1-2): 2-17.
- Caturla, N., E. Vera-Samper, et al. (2003). "The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes." *Free Radical Biology and Medicine* 34(6): 648-662.
- Cerdá, B., Llorach, R., Cerón, J.J., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A. (2003). "Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice." *European Journal of Nutrition* 42(1): 18-28.
- Chakraborty, M. and A. Mitra (2008). "The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera mesocarp*." *Food Chemistry* 107(3): 994-999.
- Chapman, D., N.F. Owens, and D.A. Walker (1966). "Physical studies of phospholipids. II. Monolayer studies of some synthetic 2,3-diacyl-DL-phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines containing trans double bonds." *Biochim Biophys Acta* 120(1): 148-55.
- Chapman, D., R.M. Williams, and B.D. Ladbroke (1976). "Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacyl-phosphatidylcholines (lecithins)." *Chemistry and Physics of Lipids* 1(5): 445-475.
- Chaves, N. (1994). Variación cualitativa y cuantitativa de los flavonoides del exudado de *Cistus ladanifer* L. como respuesta a diferentes factores ecológicos. Facultad de Ciencias. Badajoz, España, Universidad de Extremadura. Tesis doctoral.
- Chaves, N., Sosa, T., Escudero, J.C (2001). "Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils." *J. Chem. Ecol.* 27 (3): 623–631.
- Chavez, M. A. (1996). "Liposomas." Universidad de la Habana, Curso de postgrado.
- Cheng PC, W. G. (1996). "Honey bee propolis: prospects in medicine." *Bee World* 77: 8-15.
- Cheynier. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 81. 223-229.
- Clifford, M. N., Scalbert, A. (2000). "Review: ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 118-1125.
- Côté, J., S. Caillet, et al. (2011). "Effect of juice processing on cranberry antibacterial properties." *Food Research International* 44(9): 2922-2929.
- Cottiglia F, L. G., Garau D, et al. (2001). "Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L." *Phytomedicine* 8: 302-5.
- Cowan, M. M. (1999). "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.
- Crisostomo, M. I., H. Westh, et al. (2001). "The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones." *Proc Natl Acad Sci* 98(17): 9865-70.
- Cui, H., A. A. Gabriel, et al. (2010). "Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*." *Food Control* 21(7): 1030-1036.

- Cunha, F. A. B., E. F. F. Matias, et al. (2011). "In vitro antibacterial, phototoxic, and synergistic activity of ethanol extracts from *costus cf. arabicus* L." *Journal of Medicinal Food* 14(9): 964-968.
- Cushnie TP and L. AJ. (2006). "Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*." *Phytomedicine*. 13(3): 187-91.
- Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb (2005). "Antimicrobial activity of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* 26(5): 343-356.
- Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb (2006). "Assessment of the antibacterial activity of galangin against 4-quinolone resistant strains of *Staphylococcus aureus*." *Phytomedicine* 13(3): 187-191.
- Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb (2011). "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* 38(2): 99-107.
- Daglia, M. (2012). "Polyphenols as antimicrobial agents." *Current Opinion in Biotechnology* 23(2): 174-181.
- Dall'Agnol R, F. A., Bernardi AP. (2003). "Antimicrobial activity of some *Hypericum* species." *Phytomedicine* 10: 511-6.
- Danner, S., G. Pabst, et al. (2008). "Structure and thermotropic behavior of the *Staphylococcus aureus* lipid lysyl-dipalmitoylphosphatidylglycerol." *Biophys J* 94(6): 2150-9.
- Dastidar SG, M. A., Kumar KA, et al. (2004). "Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. ." *Int J Antimicrob Agents* 23: 99-102.
- Date, A. A., M. S. Nagarsenker, et al. (2011). "Lecithin-based novel cationic nanocarriers (Leciplex) II: Improving therapeutic efficacy of quercetin on oral administration." *Molecular Pharmaceutics* 8(3): 716-726.
- David, J. & M. Gordon (2012). "Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." *J Nat Prod* 75(3): 311-335.
- De Andrade, B. B., M. R. Moreira, et al. (2011). "Evaluation of ent-kaurenoic acid derivatives for their anticariogenic activity." *Natural Product Communications* 6(6): 777-780.
- Demetzos, C., D. Angelopoulou, et al. (2002). "A comparative study of the essential oils of *Cistus salviifolius* in several populations of Crete (Greece)." *Biochemical Systematics and Ecology* 30(7): 651-665.
- Deshwal, N., A. K. Sharma, et al. (2011). "Review on hepatoprotective plants." *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 7(1): 15-26.
- Dib, M. E. A., H. Allali, et al. (2013). "Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L." *Journal of Saudi Chemical Society* 17(4): 381-385.
- Dongmo, P. M. J., L. T. Ngoune, et al. (2009). "Inhibitory effect of essential oils of some Cameroonian *Zanthoxylum* (Rutaceae) against *Fusarium Solani*." *European Journal of Scientific Research* 34(1): 34-45.
- Dorta, D. J., A. A. Pigoso, et al. (2005). "The interaction of flavonoids with mitochondria: Effects on energetic processes." *Chemico-Biological Interactions* 152(2-3): 67-78.
- DuMont, A. L. and V. J. Torres (2014). "Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: it's not just about lipids." *Trends Microbiol* 22(1): 21-7.
- El-Abyad MS, M. N., Zaki DA, Shaaban MT. (1990). "Preliminary screening of some Egyptian weeds for antimicrobial activity." *Microbios* 62: 47-57.

el-Gammal AA, M. R. (1986). "Antimicrobial activities of some flavonoid compounds." *Zentralbl Mikrobiol* 141(7): 561-5.

Eloff, J. N. (1998). "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria." *Planta Medica* 64(8): 711-713.

Erlejman, A. G., S. V. Verstraeten, et al. (2004). "The interaction of flavonoids with membranes: Potential determinant of flavonoid antioxidant effects." *Free Radical Research* 38(12): 1311-1320.

Eroğlu Özkan, E., N. Özsoy, et al. (2013). "Chemical composition and biological activities of *Hypericum pamphylicum*." *Industrial Crops and Products* 50: 182-189.

EUCAST (2000). "European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents".

Eumkeb, G., S. Siriwong, et al. (2012). "Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*." *Journal of Applied Microbiology* 112(1): 55-64.

ECDC (2012) European centre for disease prevention and control. "Antimicrobial resistance surveillance in Europe."

ECDC (2009) European centre for disease prevention and control. "The bacterial challenge: time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents."

ECDC (2002) European centre for disease prevention and control. "Staphylococcus aureus resistant to vancomycin" United States, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 51(26): 565-7.

Fang, J. Y., T. L. Hwang, et al. (2006). "Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes." *Current Nanoscience* 2(1): 55-70.

Fang, J. Y., W. R. Lee, et al. (2006). "Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas." *Journal of Dermatological Science* 42(2): 101-109.

Fernández-Mar, M. I., R. Mateos, et al. (2012). "Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review." *Food chemistry* 130: 797-813.

Fernández-Arroyo S, B.-C. E., Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2010). "High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract." *Phytochem Anal* 21(4): 307-13.

Ferrandis P, H. J., Martínez-Sánchez JJ (1999). "Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks." *Plant Ecol* 144(1): 103-114.

Fiamegos, Y. C., P. L. Kastiris, et al. (2011). "Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria." *PLoS ONE* 6(4).

Fuchino, H., S. Konishi, et al. (1996). "Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. II. Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica*." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 44(5): 1033-1038.

Fukai, T., A. Marumo, et al. (2002). "Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Fitoterapia* 73(6): 536-539.

- Fukui H, G. K., Tabata M. (1988). "Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. ." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 36: 4174–6.
- Funes, L., O. Laporta, et al. (2009). "Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes." *Chem Phys Lipids* 163(2): 190-9.
- García-Villalba, R., A. Carrasco-Pancorbo, et al. (2010). "Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolutive LC-ESI-TOF MS method." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51(2): 416-429.
- Gathirwa, J. W., G. M. Rukunga, et al. (2008). "The in vitro anti-plasmodial and in vivo anti-malarial efficacy of combinations of some medicinal plants used traditionally for treatment of malaria by the Meru community in Kenya." *Journal of Ethnopharmacology* 115(2): 223-231.
- Gatsing, D., C. F. N. Nkeugouapi, et al. (2010). "Antibacterial activity, bioavailability and acute toxicity evaluation of the lear extract of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae)." *International Journal of Pharmacology* 6(3): 173-182.
- Gerardo Stübing, J. B. P. (1998). *Plantas silvestres de la comunidad valenciana*, Ediciones jaguar.
- Gertsch, J. (2011). "Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: Forth and back to intelligent mixtures." *Planta Medica* 77(11): 1086-1098.
- Gilbert, B. and L. Ferreira Alves (2003). "Synergy in plant medicines." *Current Medicinal Chemistry* 10(1): 13-20.
- Gökbulut, A., O. Özhan, et al. (2013). "Antioxidant and antimicrobial activities, and phenolic compounds of selected inula species from Turkey." *Natural Product Communications* 8(4): 475-478.
- Gomes, J. F. P. S., S. Rocha, et al. (2010). "Lipid/particle assemblies based on maltodextrin-gum arabic core as bio-carriers." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 76(2): 449-455.
- Goniotaki, M., S. Hatziantoniou, et al. (2004). "Encapsulation of naturally occurring flavonoids into liposomes: Physicochemical properties and biological activity against human cancer cell lines." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56(10): 1217-1224.
- Grange JM, D. R. (1990). "Antibacterial properties of propolis (bee glue). ." *J R Soc Med* 83: 159–60.
- Greche, H., N. Mrabet, et al. (2009). "The volatiles of the leaf oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and labdanum extracts of moroccan origin and their antimicrobial activities." *Journal of Essential Oil Research* 21(2): 166-173.
- Griep, M. A., S. Blood, et al. (2007). "Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 15(22): 7203-7208.
- Guenne, S., A. Hilou, et al. (2012). "Anti-bacterial activity and phytochemical composition of extracts of three medicinal Asteraceae species from Burkina Faso." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(SUPPL 2): 37-44.
- Guinea M, E. G., Wagner H (1990). "Screening of *Cistus clusii* extract for cyclooxygenase and angiotensin converting enzyme inhibitory activity." *Planta Medica* 56: 664.
- Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, et al. (2008). "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients." *International Journal of Food Microbiology* 124(1): 91-97.
- Gutierrez, J., C. Barry-Ryan, et al. (2009). "Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components." *Food Microbiology* 26(2): 142-150.

- Güvenç, A., S. Yildiz, et al. (2005). "Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species." *Pharmaceutical Biology* 43(2): 178-183.
- Haest CW, de Gier J, et al. (1972). "Changes in permeability of *Staphylococcus aureus* and derived liposomes with varying lipid composition." *Biochim Biophys Acta* 255(3): 720-33.
- Haidari, M., M. Ali, et al. (2009). "Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir." *Phytomedicine* 16(12): 1127-1136.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Mykkänen, H.M., Heinonen, I.M., Törrönen, A.R. (2000). "Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage." *European Food Research and Technology* 212: 75-80.
- Halder J and B. AN. (1998). "Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells." *Biochem Biophys Res Commun.* 244(3): 903-7.
- Hamilton-Miller JMT, S. S. (2000). "Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Antimicrob Chemother* 46: 852-3.
- Harnly, J. M., S. Bhagwat, et al. (2007). "Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389(1): 47-61.
- Hashimoto T, Kumazawa S, et al. (1999). "Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems." *Biosci Biotechnol Biochem* 63(12): 2252-5.
- Hendrich, A. B. (2006). "Flavonoid-membrane interactions: Possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds." *Acta Pharmacologica Sinica* 27(1): 27-40.
- Herranz-López, M., S. Fernández-Arroyo, et al. (2012). "Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications." *Phytomedicine* 9(3-4): 253-61.
- Herrmann, F. and M. Wink (2011). "Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes." *Phytomedicine* 18(13): 1191-1196.
- Hirai, I., M. Okuno, et al. (2010). "Characterisation of anti-*Staphylococcus aureus* activity of quercetin." *International Journal of Food Science and Technology* 45(6): 1250-1254.
- Hiramatsu K, Hanaki H, et al. (1997). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility." *J Antimicrob Chemother.* 40(1): 135-6.
- Hoffman, L. R., E. Deziel, et al. (2006). "Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*." *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19890-19895.
- Hosni, K., I. Hassen, et al. (2013). "Secondary metabolites from *Chrysanthemum coronarium* (Garland) flowerheads: Chemical composition and biological activities." *Industrial Crops and Products* 44: 263-271.
- Huang, C. H. (1969). "Studies on Phosphatidylcholine Vesicles. Formation and Physical Characteristics." *Biochemistry* 8(1): 344-52.
- Huang, C. H., & Li, S. (1999). "Calorimetric and molecular mechanics studies of the thermotropic phase behavior of membrane phospholipids." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 1422(3): 273-307.
- Huang, Y. B., M. J. Tsai, et al. (2011). "Elastic liposomes as carriers for oral delivery and the brain distribution of (+)-catechin." *Journal of Drug Targeting* 19(8): 709-718.
- Hucho, F. (1986). "Neurochemistry: Fundamentals and Concepts." Weinheim, Germany: VCH.

- Hussin, W. A. a. W. M. (2011). "El-Sayed, Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against gram positive and gram negative bacteria." *Journal of Biological Sciences* 11(7): 433-441.
- Ilse Valderrama Heller (2008). "Aspectos generales de parasitología clínica." UMAR Escuela de Medicina.
- Ikigai H, Nakae T, et al. (1993). "Bactericidal catechins damage the lipid bilayer." *Biochim Biophys Acta*. 1147(1): 132-6.
- Jaki, B. U., S. G. Franzblau, et al. (2008). "Purity-activity relationships of natural products: The case of anti-TB active ursolic acid." *Journal of Natural Products* 71(10): 1742-1748.
- James C. Anderson, Helen Grounds, et al. (2014). "Improved synthesis of structural analogues of (-)-epicatechin gallate for modulation of staphylococcal β -lactam resistance." *Tetrahedron* 70(21): 3485–3490.
- Joray, M. B., M. L. González, et al. (2011). "Antibacterial activity of the plant-derived compounds 23-methyl-6- O -desmethyauricepyrone and (Z, Z)-5-(trideca-4,7-dienyl)resorcinol and their synergy with antibiotics against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(21): 11534-11542.
- Joray, M. B., S. M. Palacios, et al. (2013). "Understanding the interactions between metabolites isolated from *Achyrocline satureioides* in relation to its antibacterial activity." *Phytomedicine* 20(3-4): 258-261.
- Jung, E., Y. Kim, et al. (2013). "Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(15): 3769-3776.
- Kajiya K, Kumazawa S, et al. (2001). "Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers." *Biosci Biotechnol Biochem* 65(12): 2638-43.
- Kajiya K, Kumazawa S, et al. (2002). "Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers." *Biosci Biotechnol Biochem*. 66(11): 2330-5.
- Kajiya, K., S. Kumazawa, et al. (2008). "Solid-state NMR analysis of the orientation and dynamics of epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, incorporated into lipid bilayers." *Magnetic Resonance in Chemistry* 46(2): 174-177.
- Kamatou, G. P. P., et al. (2006). "In vitro evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*." *South African Journal of Botany* 72(4): 634-636.
- Kamihira, M., H. Nakazawa, et al. (2008). "Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz-crystal microbalance analysis." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(5): 1372-1375.
- Karakoca, K., M. A. Ozusaglam, et al. (2013). "Antioxidative, antimicrobial and cytotoxic properties of *Isatis floribunda* Boiss. ex Bornm. extracts." *EXCLI Journal* 12: 150-167.
- Karimi E Fau - Jaafar, H. Z. E., S. Jaafar Hz Fau - Ahmad, et al. (2011). "Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth." (1420-3049 (Electronic)).
- Keough, K. M. W., & Davis, P. J. (1979). "Gel to liquid-crystalline phase transitions in water dispersions of saturated mixed-acid phosphatidylcholines." *Biochemistry* 18(8): 1453-9.
- Khan, M. S. A. and I. Ahmad (2011). "Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(3): 1083-1094.

- Khateeb, J., A. Gantman, et al. (2010). "Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: A role for PPAR- α pathway." *Atherosclerosis* 208(1): 119-125.
- Kim DH, B. E., Han MJ. (1999). "Anti-*Helicobacter pylori* activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. ." *Biol Pharm Bull* 22: 422-44.
- Kintzios, S. E. (2006). "Terrestrial plant-derived anticancer agents and plant species used in anticancer research." *Critical Reviews in Plant Sciences* 25(2): 79-113.
- Kishore, N., B. B. Mishra, et al. (2009). "Alkaloids as potential anti-tubercular agents." *Fitoterapia* 80(3): 149-163.
- Koo, S. I. and S. K. Noh (2007). "Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect." *Journal of Nutritional Biochemistry* 18(3): 179-183.
- Kulkarni, A. P., S. M. Aradhya, et al. (2004). "Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant - Punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit." *Food Chemistry* 87(4): 551-557.
- Kulkarni, A. P., H. S. Mahal, et al. (2007). "In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic action of punicalagin." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(4): 1491-1500.
- Lakshmi, T., A. Roy, et al. (2011). ""Acacia catechu willd -a gift from ayurveda to mankind" -a review." *Pharma Research* 5(2): 273-293.
- Lam, K. L. H., H. Wang, et al. (2012). "Mechanism of structural transformations induced by antimicrobial peptides in lipid membranes." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1818(2): 194-204.
- Landi-Librandi, A. P., C. A. De Oliveira, et al. (2011). "In vitro evaluation of the antioxidant activity of liposomal flavonols by the HRP-H₂O₂-luminol system." *Journal of Microencapsulation* 28(4): 258-267.
- Laporta, O., L. Funes, et al. (2007). "Role of membranes on the antibacterial and anti-inflammatory activities of the bioactive compounds from *Hypoxis rooperi* corm extract." *Arch Biochem Biophys* 467(1): 119-31.
- Laporta, O., L. Pérez-Fons, et al. (2007). "Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato)." *Food Chemistry* 101(4): 1425-1437.
- Lázaro, E., J. A. Castillo, et al. (2007). "Interaction of antioxidant biobased epicatechin conjugates with biomembrane models." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(8): 2901-2905.
- Leal, I. C. R., I. I. Júnior, et al. (2011). "Pentaclethra macroloba tannins fractions active against methicillin-resistant staphylococcal and Gram-negative strains showing selective toxicity." *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(6): 991-999.
- Leitão, D. P. S., A. C. M. Polizello, et al. (2005). "Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice." *Journal of Medicinal Food* 8(1): 36-40.
- Li, Z., S. S. Percival, et al. (2011). "Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects." *Molecular Nutrition and Food Research* 55(7): 1096-1103.
- Lin, C. C., Y. F. Hsu, et al. (2001). "Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins of *Terminalia catappa* L." *Anticancer Research* 21(1 A): 237-244.
- Lindsay, D. G., & Astley, S. B. (2002). "European research on the functional effects of dietary antioxidants " *EUROFEDA. Molecular Aspects of Medicine* 23(1-3): 1-38.

- Lisa A. Collins and S. G. Franzblau. (1997). "Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for High-Throughput Screening of Compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*." *American Society for Microbiology* 41(5): 1004–1009.
- Liu, M.-J., J.-X. Li, et al. (2003). "The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study." *Life Sciences* 73(7): 883-892.
- Lu, H. F., M. F. Tsou, et al. (2005). "Ellagic acid inhibits growth and arylamine N-acetyltransferase activity and gene expression in *Staphylococcus aureus*." *In Vivo* 19(1): 195-200.
- Lu, Y. H., Z. Zhang, et al. (2002). "A new antifungal flavonol glycoside from *Hypericum perforatum*." *Acta Botanica Sinica* 44(6): 743-745.
- Ma, C. M., T. Abe, et al. (2011). "Synthesis, anti-fungal and 1,3- β -d-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives." *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 18(19): 7009-7014.
- Machado, T. D. B., I. C. R. Leal, et al. (2002). "Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 13(5): 606-610.
- Madrigal-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C.G., Dreher, M., Reed, J.D. (2009). "Pomegranate (*Punica granatum* L.) supplements: authenticity, antioxidant and polyphenol composition. ." *Journal of functional foods* 1: 324-329.
- Mahboubi, M. and M. M. Feizabadi (2008). "Antifungal activity of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent and its synergy with amphotricin B." *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 2(1): 26-28.
- Mahboubi, M. and F. Ghazian Bidgoli (2011). "Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin." *Phytomedicine* 17(7): 548-550.
- Mahmoud MJ, J. A., Hussain AM, Al-Omari M, Al-Naib A. (1989). "In vitro antimicrobial activity of *Salsola rosmarinus* and *Adiantum capillus-veneris*." *Int J Crude Drug Res* 27: 14-6.
- Mandel, S. A., Y. Avramovich-Tirosh, et al. (2005). "Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection: Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway." *NeuroSignals* 14(1-2): 46-60.
- Martin Smith, R. (1999). "Understanding Mass Spectra. A basic approach." Ed. K. L. Busch. *Jonh Wiley & Sons, Inc*: 1-4.
- Martma, K., S. Z. Fernaeus, et al. (2011). "New capillary coatings in open tubular CEC as models for biological membranes." *Electrophoresis* 31(9): 1586-1589.
- Mathez-Stietel S, Vandenbroek I, et al. (2012). "Can Andean medicine coexist with biomedical healthcare? A comparison of two rural communities in Peru and Bolivia." *J Ethnobiol Ethnomed* 8: 26.
- Matias, E. F. F., K. K. A. Santos, et al. (2010). "Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenacea* DC." *Latin American Journal of Pharmacy* 29(6): 1049-1052.
- Matias, E. F. F., K. K. A. Santos, et al. (2011). "Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A." *Chemotherapy* 57(4): 305-309.
- Mayer LD, Hope MJ, et al. (1986). "Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure." *Biochim Biophys Acta.* 858(1): 161-8.
- McGavin, M. H., D. Krajewska-Pietrasik, et al. (1993). "Identification of a *Staphylococcus aureus* extracellular matrix-binding protein with broad specificity." *Infect Immun* 61: 2479-2485.

- Melaiye, A., R. S. Simons, et al. (2004). "Formation of water-soluble pincer silver(I)-carbene complexes: a novel antimicrobial agent." *J Med Chem* 47: 973-977.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2002). "Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 577-99.
- Miceli, N., A. Trovato, et al. (2011). "Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill berries from Turkey." *Food and Chemical Toxicology* 49(10): 2600-2608.
- Micol V, Mateo CR, et al. (2001). "Effects of (+)-totarol, a diterpenoid antibacterial agent, on phospholipid model membranes." *Biochim Biophys Acta* 1511(2): 281-90.
- Miller, N., C. Rice-Evans, et al. (1993). "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clinical Sciences* 84: 407-412.
- Mishra, B. B., R. R. Kale, et al. (2009). "Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis." *Fitoterapia* 80(2): 81-90.
- Mishra, B. B., R. K. Singh, et al. (2009). "Fighting against leishmaniasis: Search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents." *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 9(1): 107-123.
- Mishra, N., A. Oraon, et al. (2010). "Anticonvulsant activity of *Benkara malabarica* (Linn.) root extract: In vitro and in vivo investigation." *Journal of Ethnopharmacology* 128(2): 533-536.
- Mori A, Nishino C, et al. (1987). "Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*." *Phytochemistry* 26: 2231-4.
- M Quiñones, M Miguel, et al. (2012). "Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular." *Nutr Hosp.* 27 (1): 76-78.
- Muilenburg, V. L., P. L. Phelan, et al. (2011). "Inter- and Intra-Specific Variation in Stem Phloem Phenolics of Paper Birch (*Betula papyrifera*) and European White Birch (*Betula pendula*)." *Journal of Chemical Ecology* 37(11): 1193-1202.
- Murray, P. R., K. S. Rosenthal, et al. (2009). *Microbiología médica*. Elsevier. Barcelona, España.
- Naczki, M., & Shahidi, F. (2006). "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41(5): 1523-1542.
- Navarro, M. C., M. A. Noguera, et al. (2008). "Anisakis simplex s.l.: Larvicidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo." *Experimental Parasitology* 120(4): 295-299.
- Nayak, B. S., S. S. Raju, et al. (2008). "Investigation of wound healing activity of *Lantana camara* L. in Sprague dawley rats using a burn wound model." *International Journal of Applied Research in Natural Products* 1(1): 15-19.
- Ncube, B., J. F. Finnie, et al. (2012). "In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs." *Journal of Ethnopharmacology* 139(1): 81-89.
- Ng TB, L. J., Wang ZT, Cai JN, Xu GJ. (1996). "Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. ." *Gen Pharmacol* 27: 1237-1240.
- Niessen, W. M. A. (2003). "Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening." *Journal of Chromatography A* 1000(1-2): 413-436.

Nicola, F. G., J. Nieves, et al. (2012). "Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*." *Revista Argentina de Microbiología* 44: 290-302.

Nostro, A., A. Filocamo, et al. (2012). "Antimicrobial activity and phenolic content of natural site and micropropagated *Limonium avei* (De Not.) Brullo & Erben plant extracts." *Natural Product Research* 26(22): 2132-2136.

Obiang-Obounou, B. W., O. H. Kang, et al. (2011). "In vitro potentiation of ampicillin, oxacillin, norfloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin by sanguinarine against methicillin-resistant staphylococcus aureus." *Foodborne Pathogens and Disease* 8(8): 869-874.

Ohemeng KA, Schwender CF, et al. (1993). "DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1)." *Bioorg Med Chem Lett* 3: 225-230.

Oliveira, I., A. Sousa, et al. (2007). "Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds." *Food Chemistry* 105(3): 1018-1025.

Oskoueian E Fau - Abdullah, N., S. Abdullah N Fau - Ahmad, et al. (2011). "Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract." (1422-0067 (Electronic)).

Osman, A., A. El Agha, et al. (2012). "Chlorogenic Acid Oxidation by a Crude Peroxidase Preparation: Biocatalytic Characteristics and Oxidation Products." *Food and Bioprocess Technology* 5(1): 243-251.

Oteiza, P. I., A. G. Erlejman, et al. (2005). "Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface?" *Clinical and Developmental Immunology* 12(1): 19-25.

Ou, B., M. Hampsch-Woodill, et al. (2001). "Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(10): 4619-4626.

Özçelik, B., M. Kartal, et al. (2011). "Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids." *Pharmaceutical Biology* 49(4): 396-402.

Park YK, I. M. (1998). "Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations." *Biosci Biotechnol Biochemical* 62: 2230-2232.

Parmar, V. S., A. Vardhan, et al. (1991). "Absolute configuration of epi-rhododendrin and (-)-rhododendrol [= (-)-betuligenol] and x-ray crystal and molecular structure of rhododendrin [= betuloside], a hepatoprotective constituent of *Taxus baccata*." *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1(11): 2687-2690.

Patra, S. K., F. Rizzi, et al. (2008). "Molecular targets of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Specificity and interaction with membrane lipid rafts." *Journal of Physiology and Pharmacology* 59(SUPPL. 9): 217-235.

Pawlikowska-Pawlega, B., W. Ignacy Gruszecki, et al. (2007). "Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768(9): 2195-2204.

Pepeljnjak S, J. I., Maysinger D. (1982). "Growth inhibition of *Bacillus subtilis* and composition of various propolis extracts." *Pharmazie* 37: 864-865.

Pepeljnjak S, K. I. (2004). "Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiol Lett* 240: 111-116.

- Porat, Y., A. Abramowitz, et al. (2006). "Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism." *Chemical Biology and Drug Design* 67(1): 27-37.
- Pourmorad, F., S. J. Hosseinimehr, et al. (2006). "Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants." *African Journal of Biotechnology* 5(11): 1142-1145.
- Pretorius, J. C., S. Magama, et al. (2003). "Purification and identification of antibacterial compounds from *Euclea crispa* subsp. *crispa* (Ebenaceae) leaves." *South African Journal of Botany* 69(4): 579-586.
- Prior, R. L. (2005). "Standardized methods for the determination of Antioxidant Capacity and phenolic in food and dietary supplements." *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
- Prossnigg F, Hickel A, et al. (2010). "Packing behaviour of two predominant anionic phospholipids of bacterial cytoplasmic membranes." *Biophys Chem.* 150(1-3): 129-135.
- Qa'dan, F., F. Petereit, et al. (2003). "Prodelphinidin trimers and characterization of a proanthocyanidin oligomer from *Cistus albidus*." *Pharmazie* 58: 416-419.
- Qazi, S. N., E. Counil, et al. (2001). "agr expression precedes escape of internalized *Staphylococcus aureus* from the host endosome." *Infect Immun* 69: 7074-7082.
- Quarenghi MV, T. M., Baigori MD, Abdala LR. (2000). "Antimicrobial activity of flowers from *Anthemis cotula* ." *Fitoterapia* 71: 710-712.
- Quave, C. L., M. Estévez-Carmona, et al. (2012). "Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics." *PLoS ONE* 7(1).
- Quer, P. F. (2005). *Plantas Medicinales, Ediciones península*.
- Radjabian, T., H. Fallah Hussein, et al. (2008). "Effect of pomegranate fruit juice and seed oil on serum lipid levels and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits." *Journal of Medicinal Plants* 7(25): 93-104+117.
- Ramalho, P. S., V. A. P. De Freitas, et al. (1999). "Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves." *Flav. Frag. J.* 14: 300-302.
- Ramaswamy AS, J. S., Sirsi M, Rao KH. (1972). "Antibacterial action of some naturally occurring citrus bioflavonoids." *Indian J Exp Biol* 10: 72-73.
- Rasoanaivo, P., C. W. Wright, et al. "Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: Synergy and positive interactions." *Malaria Journal* 10(SUPPL. 1).
- Ratty AK, Sunamoto J, et al. (1988). "Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1." *Biochem Pharmacol* 37(6): 989-995.
- Rauha JP, R. S., Heinonen M, et al. (2000). "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds." *Int J Food Microbiol* 56: 3-12.
- Reddy, M. K., S. K. Gupta, et al. (2007). "Antioxidant, antimalarial and antimicrobial activities of tannin-rich fractions, ellagitannins and phenolic acids from *Punica granatum* L." *Planta Medica* 73(5): 461-467.
- Ríos, J. L. a. M. C. R. (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." *Journal of Ethnopharmacology* 100(1-2): 80-84.
- Rosales Zabal JM and M. B. JC. (2001). "Formulación magistral en atención primaria." *Medicina de Familia* 2: 53-58.

- Rúa, J., L. Fernández-Álvarez, et al. (2010). "Screening of phenolic antioxidants for their inhibitory activity against foodborne staphylococcus aureus strains." *Foodborne Pathogens and Disease* 7(6): 695-705.
- Russell, A. D. (2003). "Challenge testing: principles and practice." *International Journal of Cosmetic Science* 25: 147-153.
- Rubinson K.A., Rubinson J.F. (2000). *Espectrometría de masas*. In Pearson Education, ed. *Análisis Instrumental*, pp. 522-577.
- Russo, E. B. (2011). "Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects." *British Journal of Pharmacology* 163(7): 1344-1364.
- Saija A, Scalese M, et al. (1995). "Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes." *Free Radic Biol Med* 19(4): 481-486.
- Sakagami Y, M. M., Kajimura K, et al. (1998). "Anti-MRSA activity of sophoraflavanone G and synergism with other antibacterial agents." *Lett Appl Microbiol* 27: 98-100.
- Sakar MK, E. R., Tamer AU. (1992). "Isolation and antimicrobial activity of flavonoids from *Prunus spinosa* L. flowers." *Hacettepe Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi* 12: 59-63.
- Sánchez-Gallego, J. I., A. López-Revuelta, et al. (2010). "Membrane cholesterol contents modify the protective effects of quercetin and rutin on integrity and cellular viability in oxidized erythrocytes." *Free Radical Biology and Medicine* 48(10): 1444-1454.
- Santagati, N. A., L. Salerno, et al. (2008). "Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection." *J. Chromatogr. Sci* 46: 150-156.
- Saracini, E., M. Tattini, et al. (2005). "Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves." *Chromatographia* 62: 245-249.
- Sato M, T. H., Takase I, Kureshiro H, Tanigaki S, Inuma M. (1995). "Antibacterial activity of flavanone isolated from *Sophora exigua* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and its combination with antibiotics." *Phytother Res* 9: 509-512.
- Sato Y, S. S., Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. (2000). "Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J Ethnopharmacol* 72: 483-488.
- Scheidt, H. A., A. Pampel, et al. (2004). "Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1663(1-2): 97-107.
- Schelz, Z., J. Molnar, et al. (2006). "Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils." *Fitoterapia* 77(4): 279-285.
- Schwartz, E., R. Tzulker, et al. (2009). "Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(19): 9197-9209.
- Seeram, N. P., L. S. Adams, et al. (2005). "In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice." *Journal of Nutritional Biochemistry* 16(6): 360-367.

- Sestili, P., C. Martinelli, et al. (2007). "Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems." *Pharmacological Research* 56(1): 18-26.
- Shabtay, A., H. Eitam, et al. (2008). "Nutritive and antioxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial byproduct as a novel beef cattle feed." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(21): 10063-10070.
- Shang, X., X. He, et al. (2010). "The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review." *Journal of Ethnopharmacology* 128(2): 279-313.
- Shen, Y., Y. Kojima, et al. (1999). "Four glucosides of p-hydroxyphenyl derivatives from birch leaves." *Journal of Wood Science* 45(4): 332-336.
- Shene, C., A. K. Reyes, et al. (2009). "Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts." *European Food Research and Technology* 228(3): 467-475.
- Shetty, K., & McCue, P. (2003). "Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: Integration of systems biology and biotechnological approaches." *Food Biotechnology* 17(2): 67-97.
- Shew, R. L., & Deamer, D. W. (1985). "A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 816(1): 1-8.
- Shiner, M., B. Fuhrman, et al. (2007). "Macrophage paraoxonase 2 (PON2) expression is up-regulated by pomegranate juice phenolic anti-oxidants via PPAR γ and AP-1 pathway activation." *Atherosclerosis* 195(2): 313-321.
- Shiota S, S. M., Mizushima T, et al. (1999). "Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*)." *Biol Pharm Bull* 22: 1388-1390.
- Shoulders, C. C. and G. S. Shelness (2005). "Current biology of MTP: Implications for selective inhibition." *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5(3): 283-300.
- Sieniawska, E., T. Baj, et al. (2013). "Phenolic acids content, antioxidant and antimicrobial activity of *Ligusticum mutellina* L." *Natural Product Research* 27(12): 1108-1110.
- Simó C and Cifuentes A (2005). "Electroforesis capilar: Detección mediante espectrometría de masas " Ed. Univ. Granada: 409-438.
- Singh RK, N. G. (1999). "Antimicrobial activity of *Elaeocarpus sphaericus*." *Phytother Res* 13: 448-450.
- Singleton, V. L. and J. L. Rossi (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents." *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.
- Sinha, R., M. K. Gadhwal, et al. (2012). "Interaction of quercetin with DPPC model membrane: Molecular dynamic simulation, DSC and multinuclear NMR studies." *Journal of the Indian Chemical Society* 88(8): 1203-1210.
- Skoog, D. A., F.J. Holler, et al. (2001). "Principios de análisis instrumental." 5ª edición.
- Skoric, M., S. Todorovic, et al. (2012). "Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines." *Ind. Crops Prod* 38: 153-159.
- Şohretolu, D., M. K. Sakar, et al. (2011). "Polyphenolic compounds from *Geranium purpureum* Vill. growing in Turkey." *Turkish Journal of Chemistry* 35(5): 809-814.

- Sosa, T., J. C. Alías, et al. (2005). "Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudate." *Biochemical Systematics and Ecology* 33(4): 353-364.
- Sottero, B., P. Gamba, et al. (2009). "Cholesterol oxidation products and disease: An emerging topic of interest in medicinal chemistry." *Current Medicinal Chemistry* 16(6): 685-705.
- Sousa, L. A. D., H. B. Pires Júnior, et al. (2011). "Potential synergistic effect of *Melia azedarach* fruit extract and *Beauveria bassiana* in the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in cattle infestations." *Veterinary Parasitology* 175(3-4): 320-324.
- Spencer, J. P. E. (2007). "The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways." *Genes and Nutrition* 2(3): 257-273.
- Stapleton, PD, S. Shah, et al. (2006). "Potentiation of catechin gallate-mediated sensitization of *Staphylococcus aureus* to oxacillin by nongalloylated catechins." *Antimicrob Agents Chemother* 50(2): 752-755.
- Stapleton PD, S. S., Hamilton-Miller JMT, et al. (2004). "Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acyl-catechins." *Int J Antimicrob Agents* 24: 374-380.
- Stapleton PD, S. S., Anderson JC, Hara Y, Hamilton-Miller JMT, Taylor PW. (2004). "Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates." *Int J Antimicrob Agents* 23: 462-467.
- Starp, C., B. Alteheld, et al. (2006). "Characteristics of (+)-catechin and (-)-epicatechin transport across pig intestinal brush border membranes." *Annals of Nutrition and Metabolism* 50(1): 59-65.
- Stermitz, F. R., L. N. Scriven, et al. (2002). "Two flavonols from *Artemisa annua* which potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*." *Planta Medica* 68(12): 1140-1141.
- Stübing G, P. J. (1998). *Plantas Medicinales de la Comunidad Valenciana*. Valencia, Consellería de Medio Ambiente.
- Sudharameshwari, K. and J. Radhika (2007). "Antibacterial screening of *Aegle marmelos*, *Lawsonia inermis* and *Albizzia libbeck*." *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 4(2): 199-204.
- Suliman, S., S. F. Van Vuuren, et al. (2010). "Validating the in vitro antimicrobial activity of *Artemisia afra* in polyherbal combinations to treat respiratory infections." *South African Journal of Botany* 76(4): 655-661.
- Sun, Y., W. C. Hung, et al. (2009). "Interaction of tea catechin (-)-epigallocatechin gallate with lipid bilayers." *Biophysical Journal* 96(3): 1026-1035.
- Suntres, Z. E. (2011). "Liposomal antioxidants for protection against oxidant-induced damage." *Journal of Toxicology* DOI: 10.1155/2011/152474.
- Sun-Waterhouse, D. (2011). "The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: A review." *International Journal of Food Science and Technology* 46(5): 899-920.
- Szoka Jr, F., & Papahadjopoulos, D. (1980). "Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)." *Annual review of biophysics and bioengineering* 9: 467-508.
- Taguri T, Tanaka T, et al. (2006). "Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure." *Biol Pharm Bull* 29(11): 2226-2235.

- Taguri, T., T. Tanaka, et al. (2004). "Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27(12): 1965-1969.
- Taguri, T., T. Tanaka, et al. (2006). "Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29(11): 2226-2235.
- Tamba, Y., S. Ohba, et al. (2007). "Single GUV method reveals interaction of tea catechin (2)-epigallocatechin gallate with lipid membranes." *Biophysical Journal* 92(9): 3178-3194.
- Tanaka MM, Kendal JR, et al. (2009). "From traditional medicine to witchcraft: why medical treatments are not always efficacious." *PLoS One* 4(e5192).
- Tarahovsky, Y. S., E. N. Muzafarov, et al. (2008). "Rafts making and rafts braking: How plant flavonoids may control membrane heterogeneity." *Molecular and Cellular Biochemistry* 314(1-2): 65-71.
- Tarle D, D. I. (1990). "Antimicrobial activity of the plant *Cirsium oleraceum* (L.) Scop." *Acta Pharm Jugosl* 40: 569-571.
- Telbisz, A, M. Müller, et al. (2007). "Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1768(11): 2698-2713.
- Timmer A, Günther J, et al. (2008). "Pelargonium sidoides extract for acute respiratory tract infections." *Cochrane Database Syst Rev* 2008(CD006323).
- Tomás-Menor, L., E. Barrajón-Catalán, et al. (2015). "The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics?" *Phytother. Res* DOI: 10.1002/ptr.5296.
- Tomas-Menor, L., A. Morales-Soto, et al. (2013). "Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species." *Food Chem Toxicol* 55: 313-322.
- Torrenegra RD, R. A., Pedrozo JP, Fuentes OC. (1989). "Flavonoids from *Gnaphalium gracile* H.B.K." *Int J Crude Drug Res* 27: 22-24.
- Tsai, M., R. L. Ohniwa, et al. (2011). "Staphylococcus aureus requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity." *BMC Microbiol* 11: 13.
- Tsuchiya, H. (1999). "Effects of green tea catechins on membrane fluidity." *Pharmacology* 59(1): 34-44.
- Tsuchiya, H. (2001). "Stereospecificity in membrane effects of catechins." *Chemico-Biological Interactions* 134(1): 41-54.
- Tsuchiya, H. (2010). "Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity." *Food Chemistry* 120(4): 1089-1096.
- Tsuchiya H, Nagayama M, et al. (2002). "Membrane-rigidifying effects of anti-cancer dietary factors." *Biofactors* 16(3-4): 45-56.
- Tsuchiya, H., T. Tanaka, et al. (2008). "Antiproliferative effects associated with membrane lipid interaction of green tea catechins." *Journal of Health Science* 54(5): 576-580.
- Tzulker, R., I. Glazer, et al. (2007). "Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(23): 9559-9570.

- Uekusa, Y., M. Kamihira, et al. (2007). "Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(24): 9986-9992.
- Uekusa, Y., M. Kamihira-Ishijima, et al. (2011). "Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1808(6): 1654-1660.
- Van Puyvelde L, D. K. N., Costa J, et al. (1989). "Isolation of flavonoids and a chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichrysetin." *J Nat Prod* 52: 629–633.
- Van Vuuren, S. and A. Viljoen (2011). "Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products." *Planta Medica* 77(11): 1168-1182.
- Van Vuuren, S. F. and A. M. Viljoen (2008). "In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing." *Journal of Ethnopharmacology* 119(3): 700-704.
- Van Zyl, R. L., S. T. Seatlholo, et al. (2010). "Pharmacological interactions of essential oil constituents on the viability of micro-organisms." *Natural Product Communications* 5(9): 1381-1386.
- Vance, D. E. and J. V. (1996). "Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes." Amsterdam (Holanda).
- Vanitha JD and P. CN. (2004). "Evaluation of microplate Alamar blue assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium avium* complex isolates." *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49(3): 179-182.
- Vegara, S., L. Funes, et al. (2011). "Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth." *Food Chemistry* 128(4): 872-877.
- Velazquez, C., M. Navarro, et al. (2007). "Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis." *Journal of Applied Microbiology* 103(5): 1747-1756.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretzschmar, G., & Panopoulos, N. (2007). "Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health." *Biotechnology Journal* 2(10): 1214-1234.
- Vijaya K, A. S. (1996). "Therapeutic efficacy of medicinal plants against experimentally induced shigellosis in guinea pigs." *Indian J Pharm Sci* 58: 191–193.
- Villalain, J., C. R. Mateo, et al. (2001). "Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan." *Arch Biochem Biophys* 390(1): 128-136.
- Vital, P. G. and W. L. Rivera (2009). "Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. extracts." *Journal of Medicinal Plants Research* 3(7): 511-518.
- Viuda-Martos, M., J. Fernández-López, et al. (2010). "Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(6): 635-654.
- Waage SK, H. P. (1985). "Quercetin 3-O-galactosyl-(1-6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity." *Phytochemistry* 24: 243–245.
- Wagner, H. and G. Ulrich-Merzenich (2009). "REVIEW (PART I) Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals." *Phytomedicine* 16: 97-110.

- Wagner, H. (2011). "Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals." *Fitoterapia* 82(1): 34-37.
- Weidner, A., P. Neumann, et al. (2009). "New insights into the membrane-binding and activation mechanism of pyruvate oxidase from *Escherichia coli*." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 61(1-2): 88-92.
- Wesolowska, O., A. B. Hendrich, et al. (2009). "Perturbation of the lipid phase of a membrane is not involved in the modulation of MRP1 transport activity by flavonoids." *Cellular and Molecular Biology Letters* 14(2): 199-221
- White GF, Racher KI, et al. (2000). "Physical properties of liposomes and proteoliposomes prepared from *Escherichia coli* polar lipids." *Biochimica et Biophysica Acta* 1468: 175-186.
- WHO (2002). "World Health Organization. Traditional medicine strategy 2002-2005." Geneva, Switzerland: WHO/EDM/TRM/2002.2001.
- Williams, R. J., J. P. E. Spencer, et al. (2004). "Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules?" *Free Radical Biology and Medicine* 36(7): 838-849.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). "Polyphenols in chocolate: Is there a contribution to human health?." *Food Research International* 33(6): 449-459.
- Wong, M. Y. and G. N. C. Chiu (2011). "Simultaneous liposomal delivery of quercetin and vincristine for enhanced estrogen-receptor-negative breast cancer treatment." *Anti-Cancer Drugs* 21(4): 401-410.
- Yu, X., S. Chu, et al. (2011). "Probing the interaction of polyphenols with lipid bilayers by solid-state nmr spectroscopy." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(12): 6783-6789.
- Yuan, Z. P., L. J. Chen, et al. (2006). "Liposomal quercetin efficiently suppresses growth of solid tumors in murine models." *Clinical Cancer Research* 12(10): 3193-3199.
- Zhang, L., F. Fan, et al. (2000). "Regulated gene expression in *Staphylococcus aureus* for identifying conditional lethal phenotypes and antibiotic mode of action." *Gene* 255: 297-305.
- Zhao WH, H. Z., Okubo S, Hara Y, Shimamura T. (2001). "Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1737-1742.
- Zhong, Y. and F. Shahidi (2011). "Lipophilised epigallocatechin gallate (EGCG) derivatives and their antioxidant potential in food and biological systems." *Food Chemistry* 131(1): 22-30.



ANEXOS



ANEXO I

RESULTADOS PRELIMINARES

En este anexo se presentan resultados preliminares de varios extractos que debido a la protección de datos de la patente P201301181, se muestran codificados.

Estudio de la capacidad antimicrobiana en cepas patógenas de origen hospitalario

A través de una reciente colaboración con el Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz, Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital General de Alicante, se han podido realizar estudios preliminares cualitativos de capacidad antimicrobiana para varios extractos seleccionados. De ese modo, se ha determinado de un modo general y mediante el método de dilución en agar (método que se puede consultar en el apartado de introducción), si los extractos cribados podrían ser utilizados en clínica.

En este cribado, se utilizaron un total de 52 cepas hospitalarias patogénicas de *Staphylococcus aureus*, de las cuales 29 eran resistentes a meticilina (MRSA). Para cada uno de los extractos, se establecieron concentraciones críticas que permitían disminuir el desarrollo de cada una de las cepas a estudio. La concentración crítica separa a los microorganismos a ensayo, en 3 categorías:

-Sensible: un microorganismo se considera "sensible" cuando se puede esperar que una infección causada por el mismo, responda al tratamiento con dicho extracto a la dosis recomendada.

-Intermedia: el microorganismo será de sensibilidad intermedia si el extracto funciona sólo para las cepas microbianas con sensibilidad a antibióticos.

-Resistente: este término indica que no es probable que la infección causada por el microorganismo responda al extracto en cuestión a ninguna dosis.

En este cribado de extractos, los extractos que proporcionaron una mayor actividad fueron los extractos con código E20145369 y E15420435, siendo el extracto E15420435 el que presentó una actividad categorizada como sensible para las 52 cepas de *S. aureus* enfrentadas a una concentración de 300 µg/mL e intermedia a 200 µg/mL.

Concentración de la mezcla	Extracto E20145369	Concentración de la mezcla	Extracto E15420435
1000 µg/mL	Sensible	300 µg/mL	Sensible
500 µg/mL	Intermedia	200 µg/mL	Intermedia
100 µg/mL	Resistente	50 µg/mL	Resistente

Tabla 1. Mejores resultados cualitativos obtenidos de los extractos de mayor actividad, frente a 52 cepas patógenas de origen hospitalario, de las cuales 29 eran MRSA.

Debido a los resultados de sensibilidad que mostró el extracto E15420435, se decidió continuar con el estudio de actividad de este extracto realizando un primer ensayo de actividad sinérgica con antibióticos y seleccionándose para este primer estudio el antibiótico cloxacilina, utilizado en terapia de *S. aureus* para infecciones de la piel y tejidos blandos. Para este ensayo de sinergia fueron seleccionadas las mismas cepas que en el cribado anterior.

Con los resultados de este ensayo se pudo comprobar como a una concentración de extracto de 200 µg/mL se redujo el CIM₅₀ de cloxacilina de 128 µg/mL hasta 8 µg/mL siendo todas las cepas sensibles. Este valor de cloxacilina disminuyó alcanzando valores de 1 µg/mL y 0,06 µg/mL al ir aumentando la concentración del extracto a 300 y 400 µg/mL respectivamente (tabla 2).

Concentración Cloxacilina ($\mu\text{g/mL}$)	CLOXACILINA	CLOXACILINA / EXTRACTO 400 $\mu\text{g/mL}$	CLOXACILINA / EXTRACTO 300 $\mu\text{g/mL}$	CLOXACILINA / EXTRACTO 200 $\mu\text{g/mL}$	CLOXACILINA / EXTRACTO 50 $\mu\text{g/mL}$
128	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S
64	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S
32	60%S 40%R	100 % S	100 % S	100 % S	100 % S
16	60%S 40%R	100 % S	100 % S	100 % S	20% R 40% I 40% S
8	30%S 70% R	100 % S	100 % S	100 % S	40% R 20% I 40% S
4	30%S 70% R	100 % S	100 % S	60% R 20% I 20% S	60% R 20% I 20% S
2	30% I 70% R	100 % S	100 % S	75% R 25% I	75% R 25% I
1	30% I 70% R	100 % S	100 % S	70% R 30% I	80% R 20% I
0.5	100% R	100 % S	25% R 75% S	86% R 14% I	86% R 14% I
0.25	100% R	100 % S	25% R 75% S	100% R	100% R
0.125	100% R	100 % S	25% R 75% S	100% R	100% R
0.06	100% R	100 % S	75% R 25% S	100% R	100% R

Tabla 2. Resultados de sinergia sobre la mezcla de cloxacilina y extracto E15420435 en 29 cepas hospitalarias de MRSA. Los resultados se expresan en % total de microorganismos enfrentados al tratamiento que fueron (S) sensibles, (I) intermedias o bien (R) resistentes.

Tras este estudio sinérgico, se decidió realizar una mejora en la extracción de los compuestos polifenólicos bioactivos del extracto E15420435 mediante extracciones con distintos disolventes de diferente polaridad (acetato de etilo, acetona o una mezcla agua/etilo) a partir de nuevo material recolectado. Además, se realizó la purificación del extracto E15420435, para comprobar si se podía mejorar todavía más su perfil polifenólico y con él su bioactividad. Con estas diferentes extracciones sólido-líquido y el fraccionamiento a través de cromatografía de afinidad en columna de Amberlite del extracto E15420435 (método descrito en el apartado de Material y Métodos), se obtuvieron diferentes fracciones polifenólicas de la planta.

En estas pruebas de purificación se pudo comprobar como dependiendo del tipo de disolvente de extracción utilizado, se obtenía una concentración polifenólica distinta debido a la afinidad promovida por el disolvente con los compuestos polifenólicos de la planta.

Con el acetato de etilo se obtuvo como familia mayoritaria los elagitaninos, para la acetona los flavonoles y para la mezcla agua y acetato de etilo, se obtuvo una mezcla de extracción similar entre flavonoles y elagitaninos. Entre estas purificaciones el fraccionado en columna del extracto E15420435 es el que mayor contenido en elagitaninos extrajo.

Esta diversidad encontrada mediante la debida identificación y cuantificación de cada una de las muestras, permitirá seguir profundizando y mejorando tanto en la actividad como mecanismo de acción del extracto E15420435, así como correlacionar los posibles compuestos bioactivos del nuevo extracto mejorado. Actualmente, se esperan los resultados de bioactividad de estas primeras fracciones. En este caso, el estudio se ha ampliado en un total de 100 cepas (50 de MSSA y 50 de MRSA) y además, se pretende testar la sinergia de estos extractos con diferentes tipos de antibióticos.

Aún así, los resultados actuales, ya indican un potencial uso de este extracto y sus activos como “dispositivo médico” lo que, junto con los resultados obtenidos en el capítulo segundo sobre sinergia, ha sido objeto de una solicitud de patente española.

Challenge testing

Se seleccionaron varios extractos para probar su posible actividad como conservantes en ensayos de inoculación controlada (“challenge test”) en un prototipo cosmético. El prototipo cosmético consistió en una emulsión de fase externa acuosa, la cual proporcionaba un efecto hidratante y emoliente en la piel (Rosales Zabal JM., et al 2001).

Para realizar esta prueba, se procedió a la inoculación de los microorganismos en la crema prototipo y posterior incubación a temperatura ambiente en unas condiciones de tiempo, temperatura y humedad controladas. El conservante de la preparación fue adecuado si se producía un descenso significativo en el número de microorganismos con el tiempo (Russell AD., et al 2003).

Tras el test realizado, la evaluación de los resultados se realizó en función de los criterios de la farmacopea Europea y que se fundamenta en la reducción logarítmica del número de microorganismos viables, en relación con los valores iniciales del inóculo sembrado.

Tan sólo para los “extractos A y B” que se muestran en la figura 1, incluidos en la formulación a una concentración de 1% (w/w), se consiguió una reducción del inóculo dentro de los 28 días de duración de la prueba de conservación. Por lo que, ambos extractos consiguieron tener un criterio de reducción de carga microbiológica y capacidad conservante aceptable, ya que se observó una reducción de todos los microorganismos recomendados por la farmacopea europea para este test desde un inóculo inicial de 10^6 UFC/ mL a menos de 10 UFC/ mL. Además, se obtuvo el criterio A de potencialidad conservante para el “extracto A” debido a la reducción del microorganismo *Candida albicans* a partir del séptimo día de incubación, y el criterio B de potencialidad conservante para el “extracto B” porque se produce dicha reducción a partir de los 14 días de incubación.

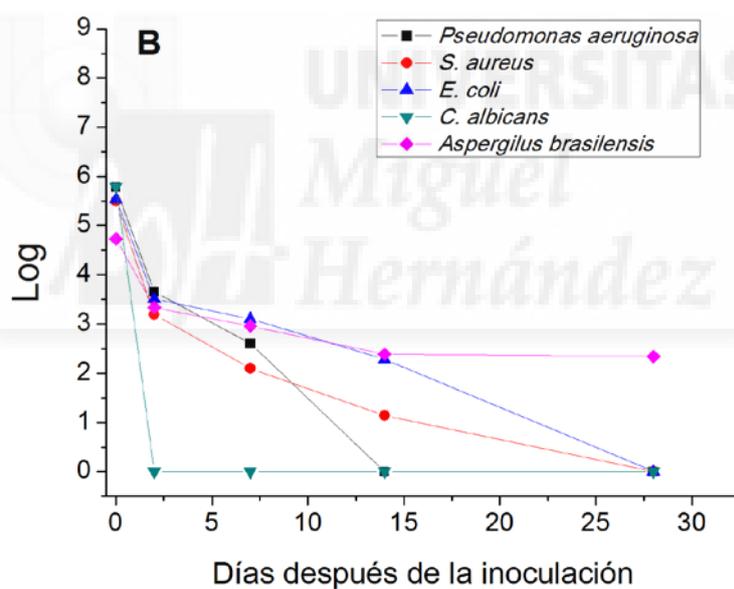
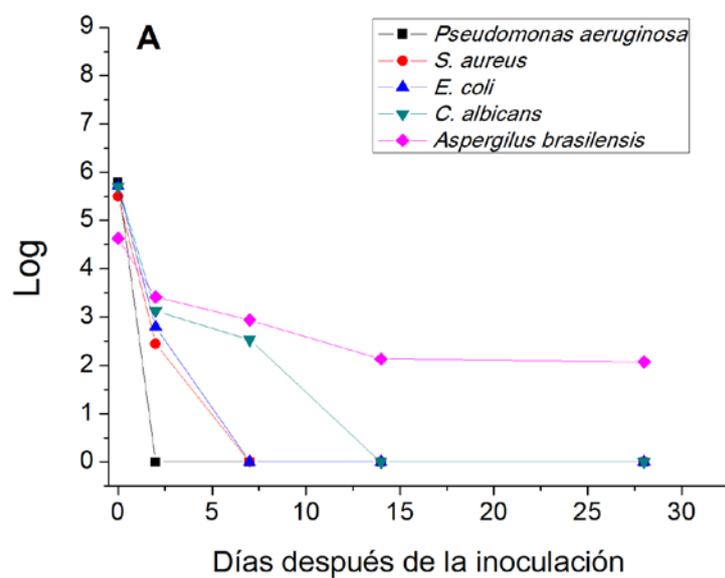


Figura 1. Resultados obtenidos tras la realización del Challenge test para el extracto A y extracto B, en los que se puede observar el tiempo y la reducción logarítmica de diferentes cepas microbianas, que les da a ambos extractos un poder conservante. Los resultados están expresados en log ufc/g.

Actualmente, se está decidiendo ampliar el estudio en otros prototipos de formulaciones magistrales.

ANEXO II

**ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE LA
PRESENTE TESIS DOCTORAL**



Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species

Laura Tomás-Menor^a, Aránzazu Morales-Soto^{b,c}, Enrique Barrajón-Catalán^{a,d}, Cristina Roldán-Segura^{c,e}, Antonio Segura-Carretero^{b,c}, Vicente Micol^{a,*}

^a Skin Research Platform (SRP), Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), Universidad Miguel Hernández, Avenida de la Universidad s/n, E-03202 Elche, Alicante, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada 18071, Spain

^c Functional Food Research and Development Centre (CIDAF), Health Science Technological Park, Avda. Del Conocimiento s/n, Granada 18100, Spain

^d R&D Department of Endemic Biotech, QUÍMICAS DEL VINALOPÓ, S.L. Monóvar, C/Collado de Novelda no. 3, 03640 Monóvar, Alicante, Spain

^e Signal Theory, Networkings and Communications Department, ETSSI, University of Granada, Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2012

Accepted 7 January 2013

Available online 16 January 2013

Keywords:

Antibacterial
Cistus

Polyphenols

Flavonols

RRLC–ESI–TOF–MS

ABSTRACT

Cistaceae is a large family of shrubs commonly distributed in the Mediterranean ecosystem. The aim of this study was to explore the potential antimicrobial properties against *Escherichia coli* and/or *Staphylococcus aureus* of different extracts obtained from four *Cistaceae* species that are especially abundant in Spanish semi-arid regions. MIC₅₀ values of the extracts of *C. salviifolius* exhibited potent bacteriostatic effects against *S. aureus* compared with the other *Cistus* species tested. Spray-drying had less impact on the antimicrobial activities and polyphenolic contents than did evaporation followed by freeze-drying. When *C. salviifolius* extract was concentrated and the polar fraction was removed, its bacteriostatic and bactericidal activities against both strains were significantly enhanced. Seasonal influences on the composition have also been found. Up to 48 compounds were found in the aqueous extract of *C. salviifolius* using RRLC–ESI–TOF–MS. The analysis of the composition of the extracts revealed that the inhibitory activity against *E. coli* may be related to the presence of galloylated flavanols and specific flavonols, whereas the inhibitory capacity against *S. aureus* may be related primarily to polar compounds and to other flavonols. Potential synergistic effects among polyphenols may deserve further studies. These extracts may serve as an alternative source of antimicrobial ingredients focused on medical devices or cosmetics.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The *Cistaceae* family (also known as rock-rose) is a large family of perennial shrubs that grow mostly in the Mediterranean semi-arid ecosystem. Some of the species of this family are rich in flammable resins, and their overgrowth lead to environmental problems and wildfires (Ferrandis et al., 1999). Therefore, this vegetable waste may serve as a source of potential ingredients for further industrial applications. This family includes the *Cistus* genus, which is divided into three subgenera: *Cistus*, *Leucocistus* and *Halimoides*. Some species are much appreciated in the

perfume industry, and others have been used since ancient times in traditional folk medicine. Among these species, *C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. clusii*, *C. albidus*, and *C. populifolius* are especially abundant in the Iberian Peninsula (Stübing and Peris, 1998).

C. ladanifer, or “sticky” or “common” rockrose” belongs to the *Leucocistus* subgenus. It produces a sticky resin, the labdanum, which has been used as a sedative, hemostatic and anti-infective agent. *C. salviifolius* also belongs to the *Leucocistus* subgenus. It has traditionally been utilized as an astringent and cicatrizing agent in some countries of the Mediterranean area in addition to being used as a tea substitute (Quer, 2005; Stübing and Peris, 1998). *C. clusii* that belongs to the *Halimoides* subgenus, has been used in folk medicine for different purposes (Guinea et al., 1990). *C. albidus*, or white rockrose, is a shrub belonging to the *Cistus* subgenus and it has traditionally been utilized for a variety of illnesses (Quer, 2005; Stübing and Peris, 1998).

Most studies of *Cistus* species have focused on the essential oil compositions of these shrubs, but a few studies have attempted to elucidate the complex polyphenolic profile of this family. The following polyphenolic compounds have been identified in various

Abbreviations: FD, freeze drying; FRAP, ferric-reducing ability power; GAE, gallic acid equivalents; MBC, minimum bactericidal capacity; MIC₅₀, minimum inhibitory concentration required to inhibit 50% of bacterial growth; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; RRLC–ESI–TOF–MS/MS, rapid-resolution liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry; SDY, spray drying; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 6658430; fax: +34 96 6658758.

E-mail address: vmicol@umh.es (V. Micol).

Mediterranean *Cistus* species: apigenin and kaempferol derivatives in *C. ladanifer* (Chaves et al., 1997; Ramalho et al., 1999; Saracini et al., 2005), ellagitannins and glycosylated quercetin or myricetin derivatives in *C. salviifolius* (Saracini et al., 2005), oligomeric proanthocyanidins in *C. albidus* (Qa'dan et al., 2003), flavanols in *C. clusii* (Gallucci et al., 2009), diterpenes and flavonoids in *C. creticus* (Skorić et al., 2012) and flavanols, gallic acid and rutin in *C. incanus* and *C. monspeliensis* (Santagati et al., 2008). We have previously reported the comprehensive composition of the aqueous extracts of *C. ladanifer* and *C. populifolius* using a highly resolved technique such as high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry (HPLC–DAD–TOF–IT) (Barrajon-Catalan et al., 2010; Fernández-Arroyo et al., 2010). Moreover, we recently reported the relationship between the polyphenolic chemotype and the taxonomic classification of up to ten species of the *Cistus* subgenus (*Leucocistus*, *Cistus* or *Halimioides*) (Barrajon-Catalan et al., 2011).

The ancient ethnobotanical use of various *Cistus* species reveals that these plants are a good remedy for several microbial disorders and infections (Bassolé and Juliani, 2012; Salin et al., 2011). The antimicrobial activity of the essential oil of *C. salviifolius* (Gertsch, 2011; Güvenç et al., 2005) and that of extracts obtained by the use of organic solvents from *C. creticus* (Güvenç et al., 2005) and *C. ladanifer* (Ferreira et al., 2012) have been reported. Aqueous extracts derived from *C. ladanifer* and *C. populifolius* and containing ellagitannins and flavonoids also possess significant antimicrobial activity (Barrajon-Catalan et al., 2010) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria.

The aim of the present study was to evaluate the antibacterial activities of the hydroalcoholic or aqueous extracts, which were obtained via different drying methods, and derived from four species of the *Cistus* genus that are especially abundant in the Iberian Peninsula. The most active extract was further fractionated. A tentative correlation between the detailed polyphenolic compositions, using RRLC–ESI–TOF–MS, and the antibacterial activity of *C. salviifolius* aqueous extract was achieved for the first time.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection and sample preparation

Specimens of different native *Cistus* plants were obtained from various areas of Spain. The *Cistus ladanifer* L. samples were obtained from a mountain area close to Puertollano in Ciudad Real province, near Andalucía, *Cistus albidus* L., *C. salviifolius* L. and *C. clusii* Dunal samples were collected from a semi-arid area close to Monóvar in the Alicante province. All of the samples were collected between June 2010 and November 2011. The plant material was properly identified and labeled by the authors and qualified personnel. Prior to processing, the samples were washed with water to remove residues of dust and arthropods.

2.2. Extract processing and fractionation

The botanical samples were processed within 24 h after collection and were crushed with a grinder to obtain particles between 3 and 5 mm in size. The samples were then subjected to aqueous or hydroalcoholic maceration for 4 h with gentle stirring at a temperature no higher than 65 °C. The liquid extracts were filtered to remove suspended solids and rotavapored to concentrate the samples (or to eliminate ethanol in the case of hydroalcoholic extraction) to approximately 8°Brix before drying. The extracts were then subjected to different drying procedures, such as lyophilization, freeze drying (FD; Telstar Cryodos 80, Spain) or

spray drying (SDY; Büchi Mini Spray Dryer B-290, Spain) to obtain powdered extracts. The powdered extracts were dissolved in the appropriate buffer for each test and filtered through 0.2 µm filters.

The selected extract was fractionated as previously described (Beltrán-Debón et al., 2010; Herranz-Lopez et al., 2012) using affinity chromatography with an Amberlite FPX66 resin (The Dow Chemical Co.), which shows high affinity for polyphenolic compounds. The selected extract was dissolved in distilled water and centrifuged at 3000 rpm. The supernatant was then loaded onto the Amberlite chromatography column (2 × 25 cm) at a flow rate of 4 mL/min, washed with 30 volumes of distilled water and eluted at a rate of 2 mL/min with 3 volumes of ethanol. The flow-through, washed and eluted fractions were collected separately and freeze-dried for further analysis.

2.3. Phenol and flavonoid quantitation

The total flavonoid content was quantified according to a previously described method (Pourmorad et al., 2006) using quercetin (SIGMA–ALDRICH, Europe) as a standard. The total polyphenolic content was determined using the Folin–Ciocalteu method (Huang et al., 2005) with gallic acid (SIGMA–ALDRICH, Europe) as a standard. The absorbance measurements were performed using a UV–VIS spectrophotometer (Cecil 2041 2000 Series, UK).

2.4. RRLC–ESI–TOF–MS

The mass spectrometry analysis was essentially performed as previously described (Fernández-Arroyo et al., 2010). The analytical separation was achieved using a RRLC (rapid-resolution liquid chromatography) 1200 Series instrument from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) equipped with a G1312B binary pump and a diode array detector (DAD) G1315C. A Zorbax Eclipse Plus (Agilent Technologies) RP-C18 column (4.6 × 15 mm, 1.8 µm particle size) was used. The injection volume was 15 µL, and the flow rate was 0.8 mL/min. The mobile phase consisted of 0.5% acetic acid (A) and acetonitrile (B). The following gradient was used: 0 min, 0% B; 20 min, 20% B; 30 min, 30% B; 40 min, 50% B; 50 min, 75% B; 60 min, 100% B. The compounds were ionized and transferred from the RRLC (instrument separation) to the mass time-of-flight (TOF) spectrometer using an electrospray ionization source (ESI). The temperature was 190 °C, the nebulizer gas pressure was 2 bars, the nebulizer gas flow was 9 L/min, the voltage in the spray chamber was –500 V and the input voltage was +4500 for capillary V. Details for TOF analysis are described in the Supplementary information.

2.5. Antioxidant capacity measurements

The Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), the ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and determination of the inhibition of lipid peroxidation by the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assays were performed as previously described (Barrajon-Catalan et al., 2010) and are briefly described in the Supplementary information.

2.6. Growth inhibition and bactericidal assays on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

E. coli (CECT 515) and *S. aureus* (CECT 59) were used as models for Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. Both strains were obtained from the Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Universitat de Valencia, Spain). MIC₅₀ determination assays were performed in 96-well plates using an adapted microdilution assay based on previously reported methods (Eloff, 1998; Iscan et al., 2002). To obtain the minimum bactericidal concentration (MBC), a modification of a

previously reported bactericidal assay was used (Vegara et al., 2011). A detailed description of all the antibacterial assays is included in Supplementary information.

3. Results and discussion

3.1. Antibacterial activity and polyphenolic quantitation

We have previously postulated that besides terpene fraction, the antimicrobial activity of the extracts derived from some *Cistus* species is also related to their polyphenolic content (Barrajon-Catalan et al., 2010). To further explore this possibility, the antimicrobial capacity of the extracts derived from four different species was studied (*C. ladanifer*, *C. salviifolius*, *C. albidus* and *C. clusii*). Plant selection was based on their abundance, their adaptation to the climate and soil of the semi-arid regions of southeast Spain and easy cultivation procedures. First, the minimum concentration required to inhibit 50% of bacterial growth was determined in *E. coli* and *S. aureus* bacterial models. Subsequently, the total polyphenolic and flavonoid contents of these extracts were determined (Table 1).

The hydroalcoholic and spray-dried (SDY) extract of *C. ladanifer* (L3) exhibited the strongest antibacterial activity and highest polyphenolic content of all of the extractions tested for this plant. Moreover, the spray-dried aqueous extract was more potent against *S. aureus* than against *E. coli*, which agrees with previous reports (Barrajon-Catalan et al., 2010). *C. albidus* and *C. clusii* presented similar profiles, i.e. the highest polyphenolic content correlating with the strongest antibacterial activity against *E. coli* for the hydroalcoholic extract (A3, C3) and the strongest antimicrobial activity against *S. aureus* for the aqueous SDY extract (A2, C2). It is noteworthy that the aqueous-extracted SDY extract (A2) was extremely potent against *S. aureus*, exhibiting a MIC₅₀ value as low as 60.0 µg/mL. The *C. salviifolius* extracts exhibited the strongest activity against *S. aureus* of all the analyzed samples, with very low MIC₅₀ values regardless of the extraction and drying processes used (45–52 µg/mL). In addition, this behavior was independent of the phenolic or flavonoid contents of the extract.

These results undoubtedly show that the extraction and drying procedures dramatically affected the biological activity and composition of the *Cistus* extracts. Among the procedures utilized, hydroalcoholic extraction followed by spray-drying led to the highest inhibition of *E. coli* growth and phenolic content in most cases accompanied by highest extraction yields (10–12.1%, w/w). However, the highest polyphenolic content did not always correlate to strong *S. aureus* inhibition. Aqueous extraction followed by spray-drying resulted in a strong capacity to inhibit *S. aureus* growth, especially in the cases of *C. salviifolius*, *C. clusii* and *C.*

albidus, indicating that most active compounds were extracted and preserved under these polar conditions. For aqueous extracts, SDY resulted in higher yields for all of the *Cistus* species tested (6.2–8.5%, w/w) compared with lyophilization (2.99–4.30%, w/w), which may indicate that losses may be due to sample manipulation during concentration prior to freeze-drying.

An intriguing result was that the freeze-dried aqueous extracts exhibited decreased phenolic and flavonoid contents and decreased antimicrobial activities, especially against *S. aureus*, compared with those of the SDY aqueous extracts. This effect was especially noticeable for the *C. clusii* and *C. ladanifer* extracts. This result reveals that some polar compounds that contribute to the inhibition of *S. aureus*, as representative of Gram-positive bacteria, are degraded during the extract preparation. The most plausible explanations appear to be the degradation of some bioactive compounds during the concentration step at 50–60 °C, or the elimination of volatile compounds, such as antimicrobial terpenes that contribute to the antimicrobial capacity (Gertsch, 2011; Greche et al., 2009). However, the chemotype of the *Cistus* species was another variable to consider because the extracts derived from *C. salviifolius* were the most active against *S. aureus* regardless of the extraction/drying procedure used.

3.2. Analysis of the composition of *Cistus* extracts using RRLC–ESI–TOF–MS

To determine which compounds were responsible for the observed antibacterial activity, a preliminary identification and quantitation (Fig. 1 and Table 2) of the polyphenolic composition of the different extracts was performed using RRLC–ESI–TOF–MS. The aqueous (L1 and L2) and hydroalcoholic (L3) extracts of *C. ladanifer* (Fig. 1A) showed important differences. Betuloside (peak 15) was abundant in the L1 and L3 extracts but was not found in the L2 extract. The L3 extract also contained high amounts of labdanolic acid (peak 13), a volatile terpene derivative previously described in *C. ladanifer* (Hanahan and Weinberg, 2000). The L3 extract was also especially rich in flavonoid derivatives such as apigenin methylether (peak 6) and kaempferol dimethylether (peak 10), which were not present in the aqueous extracts. L3 extract also contained higher amounts of kaempferol diglycoside (peak 24). Quinic acid, uralenneoside, gentisoyl glucoside, 3,4'-dihydroxypropiofenone-3-β-D-glucoside (peaks 4, 7, 11 and 14, respectively) and several ellagitannins, such as punicalin, punicalagin and punicalagin gallate (peaks 28, 29 and 30), were also present in all of the extracts, as we previously reported (Barrajon-Catalan et al., 2011, 2010; Fernández-Arroyo et al., 2010).

Table 1

MIC₅₀ values, phenolic and flavonoid content for different Cistaceae extracts obtained under various extraction and drying techniques.

Species	Extraction/drying	Extract	<i>E. coli</i> ^a MIC ₅₀	<i>S. aureus</i> ^a MIC ₅₀	Folin–Ciocalteu ^b	Flavonoids ^c
<i>C. ladanifer</i>	H ₂ O/FD	L1	612 ± 94	569 ± 112	9.94 ± 0.41	0.59 ± 0.01
	H ₂ O/SDY	L2	248 ± 47	151 ± 19	10.20 ± 0.06	0.99 ± 0.02
	Hydroalcoholic/SDY	L3	113 ± 23	144 ± 16	13.28 ± 0.50	0.88 ± 0.02
<i>C. albidus</i>	H ₂ O/FD	A1	336 ± 106	273 ± 142	10.96 ± 0.14	0.57 ± 0.02
	H ₂ O/SDY	A2	504 ± 129	60 ± 8	19.72 ± 0.74	0.67 ± 0.04
	Hydroalcoholic/SDY	A3	233 ± 45	292 ± 24	21.79 ± 0.65	1.06 ± 0.04
<i>C. clusii</i>	H ₂ O/FD	C1	1064 ± 350	392 ± 56	3.42 ± 0.18	NF
	H ₂ O/SDY	C2	501 ± 173	91 ± 23	15.47 ± 0.45	0.50 ± 0.02
	Hydroalcoholic/SDY	C3	116 ± 34	304 ± 35	23.06 ± 0.41	0.73 ± 0.05
<i>C. salviifolius</i>	H ₂ O/FD	S1	221 ± 40	52 ± 18	13.28 ± 0.30	1.36 ± 0.06
	H ₂ O/SDY	S2	289 ± 96	50 ± 2	24.38 ± 0.95	1.05 ± 0.06
	Hydroalcoholic/SDY	S3	245 ± 91	45 ± 11	27.33 ± 0.20	1.57 ± 0.04

^a Minimum inhibitory concentration required to inhibit 50% of bacterial growth (µg/mL).

^b g Gallic acid equivalents/100 g dry weight.

^c mg Quercetin equivalents/100 mg dry weight. NF: not found.

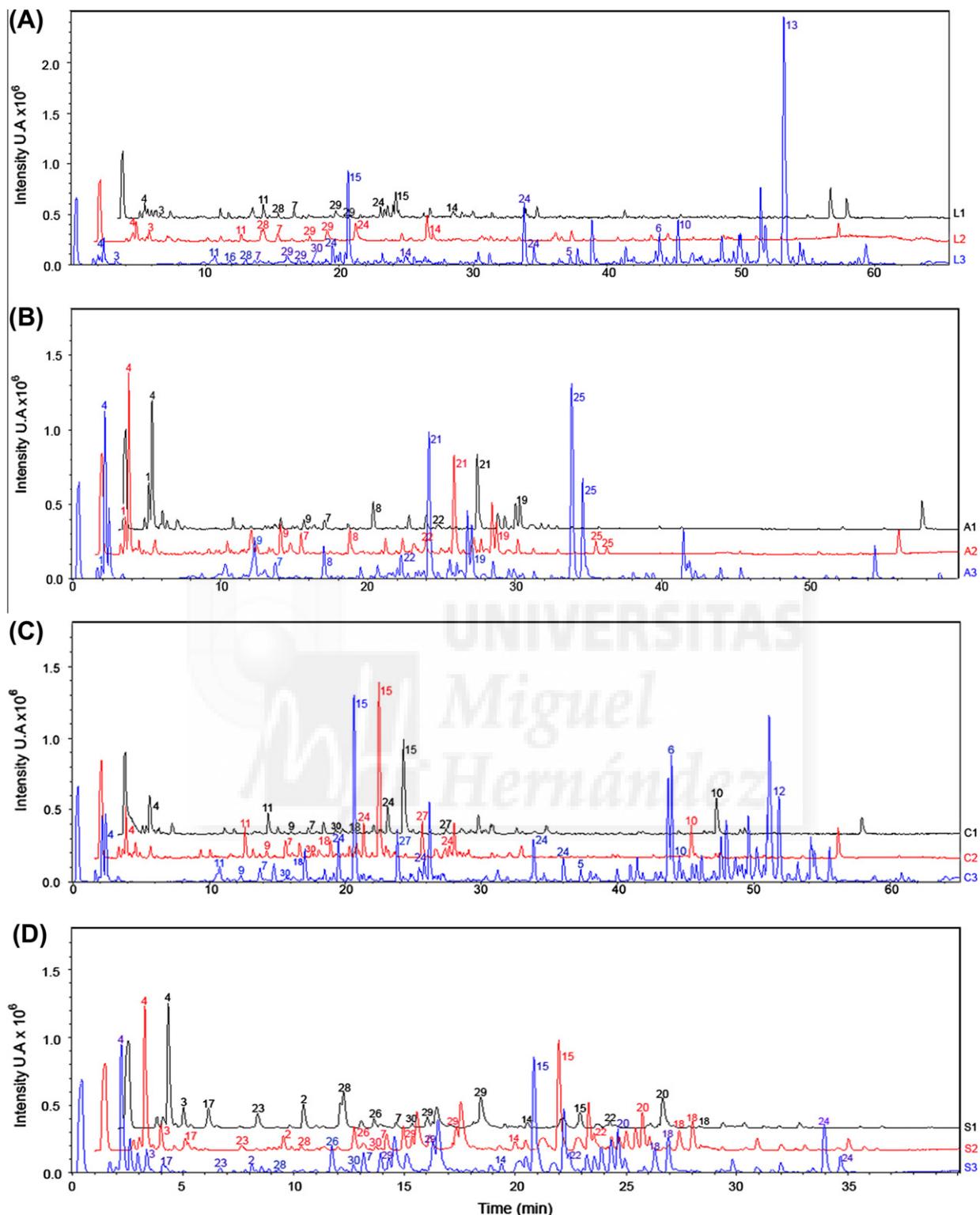


Fig. 1. RRLC-ESI-TOF-MS base peak chromatograms of extracts deriving from different *Cistus* species: *C. ladanifer* (A); *C. albidus* (B); *C. clusii* (C); *C. salviifolius* (D). Capital letter indicates the plant source (L for *C. ladanifer*, A for *C. albidus*, C for *C. clusii* and S for *C. salviifolius*); number indicates the type of extraction according Table 1 (1 and black trace for aqueous extraction and freeze-drying; 2 and red trace for aqueous extraction and spray drying; 3 and blue trace for hydroalcoholic extraction and spray drying).

Quinic acid (peak 4), quercetin-3-O-rutinoside (peak 19) and quercetin glucoside (peak 21) were abundant in all *C. albidus* extracts (Fig. 1B). Another simple acid, arabonicic acid (peak 1), and uralenneoside (peak 7) were found in all *C. albidus* extracts. (Epi)-catechin (peak 8) and (Epi)-gallocatechin (peak 9), were especially abundant in the A3 extract. Quercetin derivatives were

much more abundant in the A3 extract (quercetin glucoside, peak 21) compared to aqueous extracts, and were accompanied by other flavonols, i.e., kaempferol rutinoside (peak 25) and myricetin hexoside (peak 22).

The *C. clusii* extracts (Fig. 1C) contained betuloside (peak 15), kaempferol dimethylether (peak 10) and quinic acid (peak 4) as

Table 2

Relevant analytical data and semiquantitative estimation of the major compounds identified in the different *Cistaceae* extracts by RRLC–ESI–TOF–MS. Presence of compounds: -, non-detected; +++, area > 4000000; ++, 4000000 > area > 1000000; + 1000000 > area. Peak numbers correspond to those of Fig. 1. Abbreviations for extracts as in Fig. 1 (L for *C. ladanifer*, A for *C. albidus*, C for *C. clusii* and S for *C. salviifolius*). Number indicates the type of extraction (1 for aqueous extraction and freeze-drying; 2 for aqueous extraction and spray drying; 3 for hydroalcoholic extraction and spray drying).

ESI(-)TOF Exp. Acc. Mass [M-H]-	Assigned compound	Peak No	Extract												
			L1	L2	L3	A1	A2	A3	C1	C2	C3	S1	S2	S3	
165.0479	Arabonic acid	1	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	-	-	
169.0150	Gallic acid	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	
173.0458	Shikimic acid	3	++	+	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	
191.0559	Quinic acid	4	+	+	+	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	
269.0448	Apigenin	5	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
283.0609	Apigenin metilether	6	-	-	++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	
285.0617	Uralennoiside	7	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	
289.0718	(-) (Epi)catechin	8	-	-	-	++	++	+++	-	-	-	-	-	-	
305.0652	Epigallocatechin	9	-	-	-	+	++	++	+	+	+	-	-	-	
313.0781	Kaempferol dimetilether	10	-	-	++	-	-	-	++	++	+	-	-	-	
315.0696	Gentisoyl glucoside	11	++	+	++	-	-	-	++	++	++	-	-	-	
321.2352	10- α -Labdan-14-oic acid methyl ester	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	
323.2000	Labdanolic acid	13	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
327.1071	3,4'-Dihydroxypropiofenona-3- β -D-glucoside	14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
327.1522	Betuloside	15	++	-	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+	+	+	
331.0677	Glucogallin	16	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
337.0750	Ascorbic acid glycoside	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	+	
433.0770	Quercetin glycoside	18	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+	+++	+++	
447.0824	Quercetin 3-O-rutinoside	19	-	-	-	++	++	++	-	-	-	-	-	-	
449.0719	Myricetin 3-arabinoside	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	
463.0873	Quercetin glucoside	21	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	
479.0831	Myricetin hexoside	22	-	-	-	+	++	++	-	-	-	+	+++	+++	
481.0632	Hexahydroxydiphenyl-D-glucoside	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
593.1202	Kaempferol diglycoside	24	+	+	++	-	-	-	+	++	+++	-	-	+++	
593.1483	Kaempferol 3-rutinoside	25	-	-	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	
609.1214	Gallocatechin-(4 α -8)-Gallocatechin	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	++	
623.1612	Isorhamnetin-O-rutinoside	27	-	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	
781.0531	Punicalin	28	+	++	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+	
1083.0565	Punicalagin	29	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	
1251.0691	Punicalagin gallate	30	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	

major compounds. Uralennoiside, (epi)-gallocatechin, and gentisoyl glucoside (peaks 7, 9 and 11, respectively) were also identified with similar abundances in the three *C. clusii* extracts. Isorhamnetin-O-rutinoside (peak 27) was present in the three extracts, but a greater abundance was observed in C2 and C3. A striking difference in the hydroalcoholic extract (C3) compared with the aqueous extracts was the presence of apigenin aglycone (peak 6) and 10- α -labdan-14-oic acid methyl ester (peak 12).

Quinic acid (peak 4) was the major compound observed in the *C. salviifolius* extracts (Fig. 1D). Gallic acid (peak 2), shikimic acid (peak 3), an ascorbic acid derivative (peak 17) and betuloside (peak 15) were also present in the three *C. salviifolius* extracts. Ellagitannins, such as punicalin, punicalagin, and punicalagin gallate (peaks 28, 29 and 30), and a gallocatechin dimer (peak 26) were also present in all of the extracts. Flavonols were also present in all extracts,

e.g., myricetin glucosides (peaks 20 and 22) and quercetin glucoside (peak 18), which was not found in S1. However, kaempferol diglycoside (peak 24) was present only in S3.

Although the semiquantitative analysis of the composition of the extracts using RRLC–ESI–TOF–MS did not reveal large differences between the four *Cistus* extracts, some observations can be stated regarding the compositions and antimicrobial activities of the extracts. Cyclohexane carboxylic acids, gallic acid and some flavonol derivatives, such as glycosylated quercetin and myricetin derivatives (relatively polar compounds), were especially abundant in the *C. albidus*, *C. clusii* and *C. salviifolius* extracts, which are the extracts exhibiting the strongest antimicrobial activity against *S. aureus*. In contrast, labdanolic acid, betuloside, apigenin and kaempferol derivatives, and galloylated flavanols (gallocatechin and epigallocatechin) were more abundant in those extracts

Table 3
MIC₅₀ and MBC values, phenolic and flavonoid content for different *C. salviifolius* extracts obtained by aqueous extraction or column fractionation and spray drying.

Extraction/drying	Extract	<i>E. coli</i> ^a MIC ₅₀	<i>S. aureus</i> ^a MIC ₅₀	<i>E. coli</i> ^b MBC	<i>S. aureus</i> ^b MBC	Folin–Ciocalteu ^c	Flavonoids ^d
H ₂ O/SDY ¹	S2	289 ± 96	50 ± 2	500	125	24.38 ± 0.95	1.05 ± 0.06
Fractionated H ₂ O/SDY ¹	S2a	14 ± 2	11 ± 1	62	31	36.80 ± 0.15	2.10 ± 0.18
FT H ₂ O/SDY ¹	S2b	195 ± 24	77 ± 89	500	250	14.84 ± 0.84	Non-detected
H ₂ O/SDY ²	S4	106 ± 16	87 ± 13	125	125	45.13 ± 0.32	2.07 ± 0.01

^a Minimum inhibitory concentration required to inhibit 50% of bacterial growth (μg/mL).

^b Minimum bactericidal capacity (μg/mL).

^c Gallic acid equivalents/100 g dry weight.

^d mg Quercetin equivalents/100 mg dry weight.

¹ Plant material collected in November.

² Plant material collected in August–September.

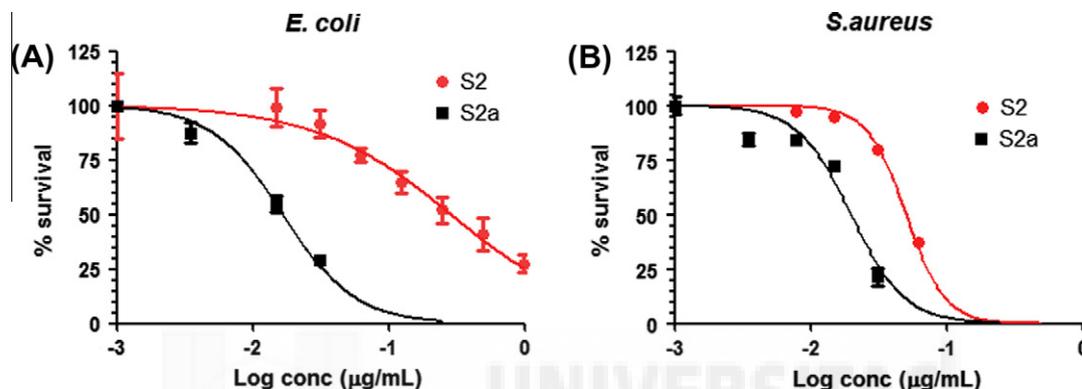


Fig. 2. Survival plots of *E. coli* (A) and *S. aureus* (B) in the presence of increasing concentrations of S2 or S2a *C. salviifolius* aqueous extracts. S2, aqueous extract, spray dried; S2a, polyphenolic fraction derived from S2.

Table 4

Values for various antioxidant measurements obtained for different *C. salviifolius* aqueous extracts of Table 3. Values are expressed as mean ± SD, (n = 8).

Extraction/drying	Extract	TEAC (TE) ^a	FRAP ^b	ORAC (TE) ^c	TBARS ^d (IC ₅₀)
H ₂ O/SDY ¹	S2	247.64 ± 8.48	318.75 ± 10.30	3545.28 ± 49.67	0.011 ± 0.003
Fractionated H ₂ O/SDY ¹	S2a	357.99 ± 6.15	652.99 ± 10.83	5259.64 ± 35.07	0.004 ± 0.001
H ₂ O/SDY ²	S4	365.85 ± 5.28	435.77 ± 5.87	5459.00 ± 66.53	0.007 ± 0.003

^a Trolox equivalents (mmol TE/100 g dw).

^b mmol Fe²⁺/100 g dw.

^c Trolox equivalents (μmol TE/g dw).

^d IC₅₀ value for the inhibition of lipid peroxidation: mg/mL.

¹ Plant material collected in November.

² Plant material collected in August–September.

that exhibited the strongest activity against *E. coli* such as *C. ladaniifera* and *C. clusii* and their hydroalcoholic extracts. The role of ellagitannins on the antimicrobial capacity of the extracts was unclear because these compounds were present in both the *E. coli* and the *S. aureus* inhibitory extracts. Nonetheless, synergic effects among the different compounds of the *Cistus* extracts cannot be discarded. Future dereplication studies may help to identify the compounds responsible for such activities.

3.3. Study of the antibacterial and antioxidant activities of the polyphenolic fraction of *Cistus salviifolius* extracts

Due to its strong inhibitory activity against *S. aureus*, the *C. salviifolius* aqueous extract (S2) was further fractionated and characterized. In an effort to use a cost-efficient and environmentally friendly extraction procedure, water extraction was selected. SDY procedure was selected because is more suitable for industrial scaling-up than FD, and this method resulted in higher polyphenolic content. The aqueous SDY extract of *C. salviifolius* was fractionated using an affinity chromatography column containing Amberlite re-

sin. The first consequence of this fractionation was a substantial increase in the polyphenolic and flavonoid contents compared with those of the former aqueous extract (Table 3). The retained and ethanol eluted polyphenolic fraction (S2a) and the flow-through fraction (S2b) were re-evaluated for antibacterial activity (Table 3). The S2a fraction presented strong antimicrobial activity against both bacterial strains, especially against *E. coli*. The S2b flow-through fraction exhibited stronger activity against *E. coli* than did the S2 fraction, and still maintained a significant *S. aureus* inhibitory activity. The dose-response curves for S2 and the purified fraction S2a (Fig. 2) also showed an increase of the cooperativity in the case of *E. coli*, indicating a more selective mechanism of action.

Cistus plants have shown a substantially different phytochemical composition depending on seasonality (Chaves et al., 1997, 2001; Sosa et al., 2005). Therefore, another extract (S4) was obtained through same procedure using *C. salviifolius* raw materials derived from the same plantation of S2, which was collected in November, i.e., August–September. The S4 extract exhibited almost twice

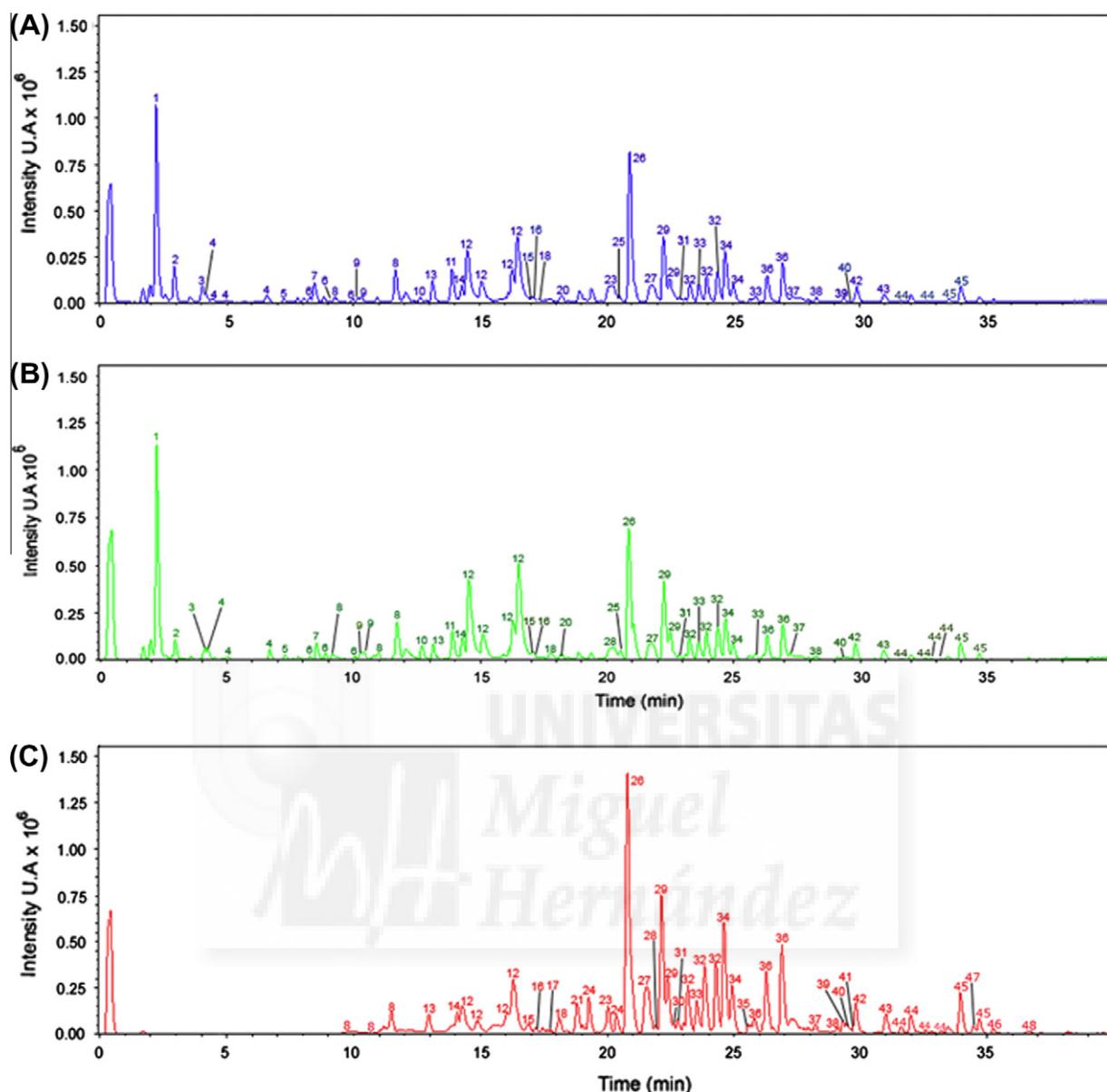


Fig. 3. RRLC-ESI-TOF-MS base peak chromatograms of *C. salviifolius* extracts. S2 (A), S4 (B), S2a (C). Relevant MS data for all peaks are shown in Table 5. S2, aqueous extract, spray dried; S4, aqueous extract from raw material collected in August–September, spray dried; S2a, polyphenolic fraction derived from S2.

polyphenol and flavonoid content compared to S2 (Table 3), which was probably due to an increased synthesis of polyphenols by plants during the summer as a protective response to UV radiation. S4 also showed stronger antibacterial capacity against *E. coli* than that of S2, an almost comparable to that of the purified extract S2a. The S2a extract also exhibited 20-fold and 4.5-fold enhancements in its capacity to inhibit *E. coli* and *S. aureus*, respectively, compared to S2. Therefore, the *E. coli* inhibitory compounds were extremely concentrated in S2a and S4 extracts, which is most likely related to the presence of some flavonols (glycosylated quercetin-coumaroyl and kaempferol derivatives) and flavanols (epigallocatechin gallate and procyanidin dimers). In contrast, the presence of *S. aureus* inhibitory compounds did not appear to completely correlate with the highest polyphenolic or flavonoid content. The most polar compounds (cyclohexane carboxylic acids, hexahydroxydiphenyl glucose, gallotannins, punicalin and epigallocatechin) were eliminated or reduced after purification and were recovered in the S2b flow-through fraction. This fraction still retained significant inhibitory activity, especially against *S. aureus*;

therefore, some of these polar compounds may have significant contribution to such activity, which is in agreement with the aforementioned results.

The bactericidal activities of the S2, S2a, S2b and S4 aqueous extracts were also analyzed in order to test if *C. salviifolius* extracts were able to kill the bacteria. The MBC value of S2a decreased for both strains compared with that of the S2 extract (Table 3). S2a exhibited the strongest bactericidal activity and was more potent against *S. aureus* (31.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) than against *E. coli* (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), in agreement with the MIC_{50} values, indicating an enrichment of antibacterial compounds in this fraction. The antibacterial activities of several extracts containing flavonols (Daglia, 2012; Karimi et al., 2011; Lin et al., 2005), ellagitannins (Al-Zoreky, 2009; Barrajon-Catalan et al., 2010; Machado et al., 2002) and phenolic and cyclohexane carboxylic acids (Chakraborty and Mitra, 2008) have been previously reported. Nevertheless, the single candidate compounds of these antimicrobial activities remain to be elucidated.

The MIC_{50} values obtained for the *C. salviifolius* aqueous extracts in this study were lower than those reported for the *C. salviifolius*

Table 5
Relevant spectral data and peak area of compounds identified in *C. salviifolius* extracts by RRLC-ESI-TOF-MS. Peak numbers correspond to those shown in Fig. 3. S2, aqueous extract, spray dried; S4, aqueous extract from raw material collected in August–September, spray dried; S2a, polyphenolic fraction derived from S2.

RT (min)	Identified compound	Peak no.	Extract		
			S2	S2a	S4
2.26	Quinic acid	1	8825814		9453396
2.98	Shikimic acid	2	1510173		804404
4.08	Ascorbic acid glycoside	3	738455		544406
4.21	Hexahydroxydiphenyl-D-glucose I (isomer)	4	420910		566283
4.49	Hexahydroxydiphenyl-D-glucose II (isomer)	4	53670		106070
5.00	Hexahydroxydiphenyl-D-glucose III (isomer)	4	150028		208650
6.72	Hexahydroxydiphenyl-D-glucose IV (isomer)	4	385317		465430
7.29	Arbutin	5	129424		234484
8.09	Glucogallin I (isomer)	6	167638		25008
8.50	Gallic acid	7	952231		751483
9.12	(-)-(Epi)gallocatechin-(Epi)gallocatechin dimer I (isomer)	8	75151	322421	220759
10.82	(-)-(EPI)gallocatechin-(Epi)gallocatechin dimer II (isomer)	8		457609	209865
11.74	(-)-(Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin dimer III (isomer)	8	1672211	1187673	1942534
8.09	Glucogallin II (isomer)	6	231642		307276
8.87	Glucogallin III (isomer)	6	145472		195056
10.23	Punicalin I (isomer)	9	151965		257665
10.35	Punicalin II (isomer)	9	283800		390862
12.66	Epigallocatechin	10	180254		742976
13.91	Uralenneoside	11	1686905		1465160
14.52	Punicalagin	12	3861955	2119931	5728138
15.08	Punicalagin gallate	13	1549911	1018042	1731421
14.11	Prodelphinidin B2, 3'-O-gallate	14	840094	1378171	993475
16.49	Punicalagin (isomer)	12	4769833	4532601	6861677
17.05	Cornusiiin B	15	250560	652657	381170
17.32	(-)-(Epi)catechin	16	22876	229041	17170
17.67	Vanillic acid β -glucoside	17		92776	
18.24	Naringenin dihexoside	18	347846	921102	227723
18.41	Unknown	19		176435	
18.48	3,4'-Dihydroxypropiofenone-3- β -D-glucoside	20	89840		68284
18.94	Unknown	21		1552019	
19.15	Vomifoliol β -D-glucopyranoside	22	104823	282567	52075
20.04	1-O- β -D-(6'-O-Galloyl)glucopyranosyl-3-methoxy-5-hydroxybenzene	23		1691557	
19.29	Unknown	24		1881012	
20.50	(-)-Epigallocatechin gallate	25	311407	979819	396667
20.92	Betuloside	26	8408892	15977041	8068000
21.80	Daidzin 6''-O-acetate	27	1853812	4369759	1717758
21.92	Unknown	28		359065	
22.25	Myricetin hexoside I (isomer)	29	3357129	7235765	3960995
22.49	Myricetin hexoside II (isomer)	29	1539125	3005835	1613762
23.29	Unknown	30		378083	
22.86	Quercetin diglycoside	31	273922	701364	193556
23.11	Myricetin 3-arabinside I (isomer)	32	158751	371934	155763
23.63	Ellagic acid-7-xyloside	33	978612	1852009	880306
23.94	Myricetin 3-arabinside II (isomer)	32	1358646	3595339	1331687
24.37	Myricetin 3-arabinside III (isomer)	32	1607473	3845340	1715921
24.68	Quercetin glucoside I (isomer)	34	2785871	6184886	2128048
24.99	Quercetin glucoside II (isomer)	34	1047897	2854565	862214
25.63	Secoisolariciresinol β -D-glucoside	35	144060	377298	268276
25.87	Quercetin glycoside I (isomer)	36	367069	1056520	278714
26.33	Quercetin glycoside II (isomer)	36	1379491	3574817	1356858
26.93	Quercetin glycoside III (isomer)	36	1941852	4954426	1705299
27.31	Lyoniresinol 3 α -O-L-rhamnoside	37	137675		145246
28.26	Unknown	38	169923	369769	138390
28.76	Isosibiricin	39	143241	64258	
29.27	Catechin 3-O- α -L-rhamnopyranoside	40	214327	457027	118748
29.42	Myricetin	41		520694	
29.85	Tetrahydroxystilbene glucoside	42	884437	1583853	730208
30.93	Unknown	43	465484	1143508	604583
31.60	Quercetin-coumaroyl hexoside I (isomer)	44	77652	381395	209865
31.99	Quercetin-coumaroyl hexoside II (isomer)	44	325922	1024248	1942534
32.22	Quercetin-coumaroyl hexoside III (isomer)	44		99508	90628
33.95	Kaempferol diglycoside I (isomer)	45	796265	2279245	868884
33.15	Quercetin-coumaroyl hexoside IV (isomer)	44		150884	240455
32.75	Unknown	46		131192	
34.41	Quercetin	47		392322	
34.69	Kaempferol diglycoside II (isomer)	45	249665	829600	286276
36.63	Unknown	48		59742	

essential oils (Gertsch, 2011) or those described for aqueous extracts derived from *Cistus* species of the same subgenus (*Leucocistus*) (Barrajon-Catalan et al., 2010). The MIC₅₀ values of the *C.*

salviifolius aqueous extract (50.0 μ g/mL) and its purified polyphenolic fraction (11.0 μ g/mL) revealed an improved bacteriostatic activity against *S. aureus* compared with that of the

broad-spectrum antibiotic neomycin (100.0 µg/mL for both strains) (Barrajon-Catalan et al., 2010; Laporta et al., 2007).

Additionally, the antioxidant capacities of those extracts showing high polyphenolic content, such as S2, S2a and S4, were determined via a panel of antioxidant measurements (Table 4). As expected, S2a exhibited the strongest antioxidant capacity in almost all of the assays, consistently with its highest polyphenolic content. Nevertheless, S4 extract, which was obtained through direct extraction, showed potent ferric reducing and lipid peroxidation inhibition capacity and also higher TEAC and ORAC values than those determined for S2a, which had been obtained through further chromatographic purification. These values were approximately 4–10 times higher than those previously reported for other *Cistus* extracts (Barrajon-Catalan et al., 2010). The TBARS values of *C. salviifolius* extracts were also higher than those exhibited by strong antioxidant herbal extracts (Laporta et al., 2007) or comparable to those reported for pure compounds such as verbascoside or quercetin (Funes et al., 2009).

3.4. Study of the composition of the polyphenolic fraction of *Cistus salviifolius* extracts using RRLC–ESI–TOF–MS

To identify the compounds that are responsible for the antimicrobial activity of the *C. salviifolius* extracts, a detailed study of the composition of these extracts was performed using RRLC–ESI–TOF–MS. The composition of these extracts was extremely complex, as observed in the RRLC mass spectrometry profiles (Fig. 3). Table 5 shows the retention times and peak areas of the compounds identified in the three *C. salviifolius* extracts (S2, S2a and S4). The mass data that are relevant for identification are shown in the Supplementary information (Supplementary Table 1). The molecular formulas of the compounds were determined for a total of 48 peaks, and 39 of these compounds were name-identified using the accurate m/z data obtained via TOF in the different samples of the *C. salviifolius* extracts.

Cyclohexane carboxylic acids (quinic and shikimic acids), flavanols (catechins), betuloside (rhododendrin), ellagitannins (punicalagins) and glycosylated flavonols (myricetin and quercetin glycosides) were the most abundant compounds in all *C. salviifolius* samples. Nevertheless, significant differences between the S2, S2a and S4 profiles were observed. Although 24 compounds were found to be common to the three extracts, up to 36 compounds matched in the S2 and S4 extracts, which was expected because both derived from the same raw material. The purification of the original S2 extract using chromatography resulted in a significant decrease in the number of polar compounds that were observed at retention times ranging from 0 to approximately 15 min (cyclohexane carboxylic acids, phenolic acids, gallotannins and hexahydroxydiphenyl derivatives), but 31 compounds were still observed in S2a (purified extract). Moreover, the amount of hydrophobic compounds in the S2a extract, such as glycosylated flavonols and some flavanols, were significantly increased compared with what was observed for the S2 and S4 extracts.

In conclusion, the *C. salviifolius* aqueous extracts obtained via spray-drying exhibited significant bacteriostatic and bactericidal effects against *S. aureus* compared with the other *Cistus* extracts derived from Spanish specimens. The antimicrobial activities of *C. salviifolius* extracts against Gram-positive and Gram-negative bacteria using *S. aureus* and *E. coli* as models, respectively, increased considerably when these were concentrated and devoid of the polar fraction. It is postulated that the inhibitory activity against *E. coli* is related to the presence of galloylated flavanols and some specific flavonols, whereas the inhibitory activity against *S. aureus* is related to the presence of different flavonols and mostly polar compounds. However, the antimicrobial properties observed for the *C. salviifolius* extract probably deserve further research to

isolate the compounds responsible for such activity. To confirm our preliminary data, the study should be expanded to other bacterial strains to explore the possibilities of using *C. salviifolius* as a source of antimicrobial ingredients in applications such as cosmetic, hygiene or chemical devices.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This investigation was supported by PTQ-08-03-08076 fellowship to E. Barrajón-Catalán, Grants AGL2011-29857-C03-03 and AGL2011-29857-C03-02 from MICINN, and PROMETEO/2012/007 from Generalitat Valenciana to VM. We thank M.T. Garzón and N.A. Gutiérrez for their valuable technical assistance. We also thank Químicas del Vinalopó, S.L., and Endemic Biotech, S.L., for their financial support and for providing us with the raw materials.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.006>.

References

- Al-Zoreky, N.S., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int. J. Food Microbiol.* 134, 244–248.
- Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Roldan, C., Guillen, E., Saura, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem. Anal.* 22, 303–312.
- Barrajon-Catalan, E., Fernandez-Arroyo, S., Saura, D., Guillen, E., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A., Micol, V., 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2273–2282.
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R., 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006.
- Beltrán-Debón, R., Alonso-Villaverde, C., Aragonès, G., Rodríguez-Medina, I., Rull, A., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Camps, J., Joven, J., 2010. The aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calices modulates the production of monocyte chemoattractant protein-1 in humans. *Phytomedicine* 17, 186–191.
- Chakraborty, M., Mitra, A., 2008. The antioxidant and antimicrobial properties of the methanolic extract from *Cocos nucifera* mesocarp. *Food Chem.* 107, 994–999.
- Chaves, N., Escudero, J.C., Gutierrez-Merino, C., 1997. Quantitative variation of flavonoids among individuals of a *Cistus ladanifer* population. *Biochem. Syst. Ecol.* 25, 429–435.
- Chaves, N., Sosa, T., Escudero, J.C., 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *J. Chem. Ecol.* 27, 623–631.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 174–181.
- Eloff, J.N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64, 711–713.
- Fernández-Arroyo, S., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochem. Anal.* 21, 307–313.
- Ferrandis, P., Herranz, J.M., Martínez-Sánchez, J.J., 1999. Effect of fire on hard-coated Cistaceae seed banks and its influence on techniques for quantifying seed banks. *Plant Ecol.* 144, 103–114.
- Ferreira, S., Santos, J., Duarte, A., Duarte, A.P., Queiroz, J.A., Domingues, F.C., 2012. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Nat. Prod. Res.* 26, 1558–1560.
- Funes, L., Fernández-Arroyo, S., Laporta, O., Pons, A., Roche, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Micol, V., 2009. Correlation between plasma antioxidant capacity and verbascoside levels in rats after oral administration of lemon verbena extract. *Food Chem.* 117, 589–598.
- Gallucci, M.N., Oliva, M., Casero, C., Dambolena, J., Luna, A., Zygodlo, J., Demo, M., 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flav. Frag. J.* 24, 348–354.
- Gertsch, J., 2011. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: Forth and back to intelligent mixtures. *Planta Med.* 77, 1086–1098.

- Greche, H., Mrabet, N., Zrira, S., Ismaïli-Alaoui, M., Benjilali, B., Boukir, A., 2009. The volatiles of the leaf oil of *Cistus ladanifer* L. var. *albiflorus* and *labdanum* extracts of moroccan origin and their antimicrobial activities. *J. Essent. Oil Res.* 21, 166–173.
- Guinea, M., Elbl, G., Wagner, H., 1990. Screening of *Cistus clusii* extract for cyclooxygenase and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity. *Planta Med.* 56, 664.
- Güvenç, A., Yildiz, S., Özkan, A.M., Erdurak, C.S., Coşkun, M., Yilmaz, G., Okuyama, T., Okada, Y., 2005. Antimicrobiological studies on Turkish *Cistus* species. *Pharm. Biol.* 43, 178–183.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Herranz-Lopez, M., Fernandez-Arroyo, S., Perez-Sanchez, A., Barrajon-Catalan, E., Beltran-Debon, R., Menendez, J.A., Alonso-Villaverde, C., Segura-Carretero, A., Joven, J., Micol, V., 2012. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. *Phytomedicine* 19, 253–261.
- Huang, D., Boxin, O.U., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856.
- Iscan, G., Kirimer, N., Kurkcuoglu, M., Baser, K.H., Demirci, F., 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3943–3946.
- Karimi, E., Jaafar, H.Z.E., Ahmad, S., 2011. Phytochemical analysis and antimicrobial activities of methanolic extracts of leaf, stem and root from different varieties of *Labisa pumila* Benth. *Molecules* 16, 4438–4450.
- Laporta, O., Pérez-Fons, L., Mallavia, R., Caturla, N., Micol, V., 2007. Isolation, characterization and antioxidant capacity assessment of the bioactive compounds derived from *Hypoxis rooperi* corm extract (African potato). *Food Chem.* 101, 1425–1437.
- Lin, R.D., Chin, Y.P., Lee, M.H., 2005. Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother. Res.* 19, 612–617.
- Machado, T.D.B., Leal, I.C.R., Amaral, A.C.F., Dos Santos, K.R.N., Da Silva, M.G., Kuster, R.M., 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J. Braz. Chem. Soc.* 13, 606–610.
- Pourmorad, F., Hosseini-mehr, S.J., Shahabimajid, N., 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 1142–1145.
- Qa'dan, F., Peterleit, F., Nahrstedt, A., 2003. Prodelphinidin trimers and characterization of a proanthocyanidin oligomer from *Cistus albidus*. *Pharmazie* 58, 416–419.
- Quer, P.F., 2005. *Plantas Medicinales*. Ediciones Península.
- Ramalho, P.S., De Freitas, V.A.P., Macedo, A., Silva, G., Silva, A.M.S., 1999. Volatile components of *Cistus ladanifer* leaves. *Flav. Frag. J.* 14, 300–302.
- Salin, O.P., Pohjala, L.L., Saikku, P., Vuorela, H.J., Leinonen, M., Vuorela, P.M., 2011. Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro. *J. Antibiot.* 64, 747–752.
- Santagati, N.A., Salerno, L., Attaguile, G., Savoca, F., Ronsisvalle, G., 2008. Simultaneous determination of catechins, rutin, and gallic acid in *Cistus* species extracts by HPLC with diode array detection. *J. Chromatogr. Sci.* 46, 150–156.
- Saracini, E., Tattini, M., Traversi, M.L., Vincieri, F.F., Pinelli, P., 2005. Simultaneous LC-DAD and LC-MS determination of ellagitannins, flavonoid glycosides, and acyl-glycosyl flavonoids in *Cistus salvifolius* L. leaves. *Chromatographia* 62, 245–249.
- Skorić, M., Todorović, S., Gligorijević, N., Janković, R., Živković, S., Ristić, M., Radulović, S., 2012. Cytotoxic activity of ethanol extracts of in vitro grown *Cistus creticus* subsp. *creticus* L. on human cancer cell lines. *Ind. Crops Prod.* 38, 153–159.
- Sosa, T., Alías, J.C., Escudero, J.C., Chaves, N., 2005. Interpopulational variation in the flavonoid composition of *Cistus ladanifer* L. exudate. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 353–364.
- Stübing, G., Peris, J.B., 1998. *Plantas medicinales de la Comunidad Valenciana*. Generalitat Valenciana, Conselleria de Medio Ambiente.
- Vegara, S., Funes, L., Martí, N., Saura, D., Micol, V., Valero, M., 2011. Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth. *Food Chem.* 128, 872–877.



The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics?

Laura Tomás-Menor,^{1†} Enrique Barrajón-Catalán,^{1†} Antonio Segura-Carretero,² Nuria Martí,¹ Domingo Saura,¹ Javier A. Menéndez,³ Jorge Joven^{4‡} and Vicente Micol^{1*‡}

¹Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC), Universidad Miguel Hernández, Avenida de la Universidad s/n. E-03202 Elche, Alicante, Spain

²Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Granada, Spain

³Metabolism and Cancer Group, Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology and Biomedical Research Institute, Girona, Spain

⁴Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari Sant Joan, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Plant polyphenols are a potential source of new antimicrobial molecules against bacteria because most newly developed antimicrobial agents do not improve the clinical management of infectious diseases. The potential synergism between the major polyphenolic compounds present in a *Cistus salviifolius* extract, which was characterized by HPLC-ESI-MS/MS, was investigated by the isobole method and the fractional inhibitory concentration index determination. Pairwise combinations of selected flavonoids and ellagitannins present in *C. salviifolius* extract were assayed against the *in vitro* growth of *Staphylococcus aureus*. Some combinations revealed synergic effects, resulting in a reduction of the minimum inhibitory concentration required to inhibit 50% growth (MIC₅₀) up to 20 times lower as compared with the individual compounds. Some of the combinations exhibited MIC₅₀ values close to drug potency level (0.5–1 µg/mL). Punicalagin and myricetin were the major contributors in the combinations. The proportion between the compounds in the synergic mixtures is crucial and may explain the superior antimicrobial activity displayed by this extract when compared with other botanical extracts. The rational optimization of these combinations could lead to the design of potent antimicrobial phytopharmaceuticals, which may improve the performance of current antibiotics, taking advantage of the multi-targeted and synergic molecular interactions of selected polyphenols. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Cistus*; synergy; ellagitannins; punicalagin; flavonols; *Staphylococcus*.

Abbreviations: EA, ellagic acid; MY, myricetin; PU, punicalagin; Q3G, quercetin-3-glucoside; MIC₅₀, minimum inhibitory concentration inhibiting 50% of bacterial growth; FICI, fractional inhibitory concentration index; HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS, high performance liquid chromatography with diode-array detection coupled to electrospray ion-trap MS/MS spectrometry.

INTRODUCTION

Plants are a source of bioactive compounds with antimicrobial activity and have accounted for more than 75% of the newly approved antibacterial compounds in the last three decades (Newman and Cragg 2012). Searching for clinically useful agents is clearly a superior strategy than favoring synthetic chemistry or modifying existing compounds (Taylor 2013). The antimicrobial activity of plant extracts and isolated plant secondary metabolites, such as flavonoids, tannins, alkaloids, terpenes, and naphthoquinones, has been demonstrated for various microorganisms (Ríos and Recio 2005; Vegara *et al.*, 2011; Daglia 2012; Howell and D'Souza 2013; Radulovic *et al.*, 2013; Trentin *et al.*, 2013).

* Correspondence to: Vicente Micol, Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández, Avenida de la Universidad s/n. E-03202 Elche, Alicante, Spain.
E-mail: vmicol@umh.es

[†]These authors have equally contributed to this research and are listed in random order.

[‡]These authors share co-senior authorship.

Monotherapy has been the classical approach addressed for most natural or synthetic antimicrobial compounds. However, there is increasing evidence that combined therapies are more efficient than single-drug based treatments, most likely because of the multicausal etiology of many diseases and/or the existence of several therapeutic targets. It is postulated that plants have evolved molecular promiscuity as a strategy to achieve maximal pharmacological potency (Gertsch 2011), and several authors have highlighted the relevance of synergic effects in phytotherapy research (Gilbert and Ferreira Alves 2003; Gertsch 2011; Wagner 2011; Herranz-Lopez *et al.*, 2012; Khandelwal *et al.*, 2012; Darvesh and Bishayee 2013). Combined therapies may take advantage of the synergistic effects of different drugs (Berenbaum 1989), and multidrug therapy is currently used to treat not only infectious diseases but also noncommunicable diseases (Wagner 2011).

Synergy is especially relevant for antimicrobial therapy (Qin *et al.*, 2012). Natural compounds alone (terpenes, flavonoids, phenolic acids, and flavanols) or in combination with antibiotics have been used either as anti-infective agents or

Received 7 August 2014
Revised 9 December 2014
Accepted 15 December 2014

to reduce microbial resistance (Brehm-Stecher and Johnson 2003; Rosato *et al.*, 2007; Mandalari *et al.*, 2010; Betts *et al.*, 2011; Taylor 2013). The isobole method is most likely the simplest method to verify the synergy between two compounds that provides graphical results. A concave curve, a convex curve, or a straight line in the isobole plot indicates synergy, antagonism, or absence of interaction, respectively (Berenbaum 1989; Wagner 2011). However, the isobole method does not provide a quantitative evaluation of the synergy and the calculation of the fractional inhibitory concentration index (FICI) should be determined as a complementary numerical approach (Odds 2003).

Several studies have reported the antimicrobial activity of extracts derived from Cistaceae against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Bedoya *et al.*, 2009; Barrajon-Catalan *et al.*, 2010; Tomás-Menor *et al.*, 2013). The activity of *Cistus salviifolius* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* was reported to be particularly potent (Tomás-Menor *et al.*, 2013). Ellagitannins and flavonoids, such as MY and quercetin glucosides, are the majoritarian compounds (Barrajon-Catalan *et al.*, 2011; Tomás-Menor *et al.*, 2013). Ellagitannins (Seeram *et al.*, 2005), quercetin and MY (Freeman *et al.*, 2010), quercetin (Daglia 2012), PU, EA (Hussin and El-Sayed 2011) and MY (Lin *et al.*, 2005) are strong candidates to show synergistic interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, antimicrobial synergic behavior among these compounds has not yet been reported. In this study, pairwise combinations of the most representative polyphenols (flavonols and ellagitannins) derived from a polyphenol-enriched *C. salviifolius* aqueous extract were used in antimicrobial assays against *S. aureus* to determine their potential synergism. Our data reveal that this is the case.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. The plant material was identified and labeled by qualified personnel and was deposited in the Universidad Miguel Hernández facilities (CS30082011). *C. salviifolius* L. samples were collected, with the permission of local governmental authorities, from a semi-arid area close to Monóvar in the Alicante province, Spain (38° 26' 25"N; 0° 51' 66"W). Leaves and aerial parts of the plant were extracted as reported (Barrajon-Catalan *et al.*, 2010).

High performance liquid chromatography with diode-array detection tandem mass spectrometry. The mass spectrometry (MS) analysis of the composition of the aqueous extract from *C. salviifolius* was essentially performed as previously described (Barrajon-Catalan *et al.*, 2011). Briefly, the analysis was performed using an Agilent LC 1100 series equipment (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) controlled by the Chemstation software and equipped with a pump, autosampler, column oven, and ultraviolet-visible diode-array detector. The HPLC instrument was coupled to an Esquire 3000+ (Bruker Daltonics, GmbH, Germany) mass spectrometer equipped with an ESI source and an ion-trap mass analyzer and operated by the Esquire control and data analysis software. The analytical separation was achieved using a Poroshell[®] 120 (Agilent Technologies) RP-C18 column (4.6 × 150 mm, 2.7 μm particle size). The injection volume was 15 μL, and the flow rate was 0.5 mL/min. The mobile phase consisted

of 1% formic acid (A) and acetonitrile (B). The following gradient was used: 0 min, 5% B; 30 min, 20% B; 50 min, 100% B; 56 min, 5% B; and 5 min for re-equilibration. The diode-array detection (DAD) was set at 280, 320, and 340 nm. MS parameters were set as follows: electrospray ionization source was operated in negative mode to generate $[M-H]^-$ ions using a desolvation temperature of 300 °C; dry gas (nitrogen) and nebulizer were set at 10 L/min⁻¹ and 60 psi, respectively. Spectra of MS and tandem MS (MS/MS) were acquired over 100–1000 m/z at 10 ms, and the capillary voltage was 4.0 kV.

The compounds were identified using HPLC-DAD-MS/MS analysis, comparing the retention time, ultraviolet spectra, and the MS/MS data of the peaks in the samples with those of the authentic standards or data reported in the literature. Quantitation of the main polyphenolic compounds was performed using ChemStation for LC 3D software (Agilent Technologies Life Sciences and Chemical Analysis, Waldbronn, Germany) and commercially available standards of PU (Phytolab, Europe), EA, catechin, MY, and Q3G (Sigma-Aldrich, Europe).

Antimicrobial activity. *Staphylococcus aureus* (CECT 59) from the Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Universitat de Valencia, Spain) was used for the analysis of the antimicrobial activity. Minimum concentration inhibiting 50% of bacterial growth values for pure compounds and the different polyphenols proportions were obtained from the average of three different determinations in 96-well plates using an adapted microdilution broth susceptibility assay based on previously established methods (Tomás-Menor *et al.*, 2013). This methodology is fully described in the Supplementary information. Neomycin (Sigma-Aldrich, Europe) was included in each assay as the positive control, whereas broth without antimicrobial agents was used as the negative control. Microbial survival was measured colorimetrically using p-Iodonitrotetrazolium violet dye, and the MIC₅₀ values for every pure compound and mixtures of polyphenols were determined by applying a variable slope sigmoidal curve fit to experimental data using GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA) (version 5.0) as previously reported (Tomás-Menor *et al.*, 2013). The tabulated MIC₅₀ values were obtained as the mean plus standard deviation of three independent experiments and expressed as microgram per milliliter, unless otherwise stated.

Synergy studies. The presence of synergic interactions was determined using the graphical isobole method (Berenbaum 1989; Wagner 2011) using MIC₅₀ values for pure compounds and mixtures. When synergy was detected, experimental data were fitted using exponential decay through the GraphPad Prism software (version 5.0). The quantitative analysis of the combinations of the compounds was performed by calculating the FICI value as follows: (MIC_{50,a} of the combination/MIC_{50a} alone) + (MIC_{50,b} of the combination/MIC_{50b} alone), where 'a' and 'b' are the two compounds of the mixture (Rosato *et al.*, 2007). The FICI value was interpreted using the following criteria (EUCAST 2000): (i) a synergistic effect when FICI ≤ 0.5; (ii) an additive effect when 0.5 < FICI ≤ 1; (iii) an indifferent effect when 1 < FICI < 2; and (iv) an antagonism when FICI ≥ 2. Synergy interactions among polyphenols were confirmed using Compusyn Software (ComboSyn, Inc., Paramus,

NJ, USA, 2005) by determining combination index values (combination index, which indicates synergy, see Supplementary information) at different effective dose values (effective dose at a certain % of effect, indicated as subscript) and by obtaining the polygonogram at $F_a=0.5$ (system affected in 50% of the maximum effect) (F'Guyer *et al.*, 2003; Chou 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

Ellagitannins and flavonoids are the major polyphenols of *Cistus salvifolius* that contribute to its antimicrobial properties

We have recently reported the antimicrobial activity of the polyphenolic extract of *C. salvifolius*, especially against *S. aureus*, a Gram-positive bacteria, based on significantly

low MIC and minimum bactericidal concentration values (Barrajon-Catalan *et al.*, 2010; Tomás-Menor *et al.*, 2013). In the latter study, an aqueous extract purified through an amberlite column bearing 37% (w/w) polyphenolic content exhibited an MIC_{50} value of $11 \pm 0.001 \mu\text{g/mL}$. The present study focuses on the systematic evaluation of the antimicrobial activity of the major compounds found in this extract (Tomás-Menor *et al.*, 2013). For this purpose, the main polyphenols contained in this extract were classified in families and quantified by HPLC-DAD-ESI-IT-MS/MS using adequate standards, as mentioned in the Material and Methods section, and the most abundant compounds were selected for further studies (Table 1).

As shown in Table S1 and Fig. 1, two major families of polyphenolic compounds were found in the extract. They were the ellagitannins family, composed of punicalin, PU, PU gallate, and the monomer EA, and the flavonoid family, some of which belonged to the flavanols subfamily (epigallocatechin monomer and

Table 1. Relevant analytical data for major polyphenols identified in *Cistus salvifolius* aqueous extract by HPLC-DAD ESI-IT-MS/MS and their quantification results

RT (min)	[M-H] ⁻	MS/MS	Compound	Peak n°	% of total extract (w/w)*	% of total polyphenols (w/w)**
10.5	609	423, 441	(-)-(Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin dimer (2)	1	0.19	0.51
10.9	1083	781, 601,301	Punicalagin isomer I (1)	2	0.40	1.09
11.3	781	601, 721	Punicalin isomer I (1)	3	0.49	1.33
15.1	761	609, 423	Prodelphinidin B2-3'-O-gallate (2)	4	0.27	1.10
15.4	1251	781, 601,301	Punicalagin isomer II (1)	2	1.70	4.63
15.9	781	601, 721	Punicalin isomer II (1)	3	0.34	0.92
18.5	1251	1207	Punicalagin gallate isomer I (1)	5	1.01	2.75
19.6	1083	781, 601,301	Punicalagin isomer III (1)	2	3.05	8.28
21.5	1251	1207	Punicalagin gallate isomer II (1)	5	2.10	5.71
23.5	1083	781, 601,301	Punicalagin isomer IV (1)	2	1.21	3.29
25.2	327	165,101	3,4'-Dihydroxypropiophenone-3-β-D-glucoside	6	0.76	2.07
29.0	457	259, 329	Epigallocatechin gallate (2)	7	0.93	2.53
31.7	479	315	Myricetin hexoside isomer I (4)	8	1.71	4.66
32.2	479	315	Myricetin hexoside isomer II (4)	8	1.08	2.94
33.2	595	301	Quercetin diglycoside (4)	9	0.80	1.78
33.5	449	317	Myricetin 3-arabinoside isomer I (4)	10	1.06	2.88
35.2	449	317	Myricetin 3-arabinoside isomer II (4)	10	0.82	2.24
35.6	449	317	Myricetin 3-arabinoside isomer III (4)	10	0.99	2.69
36.5	463	301,151	Quercetin glucoside isomer I (4)	11	2.45	10.05
36.9	463	301,151	Quercetin glucoside isomer II (4)	11	1.68	4.56
38.4	433	301	Ellagic acid-7-xiloside isomer I (3)	12	0.80	2.16
38.6	433	301	Ellagic acid-7-xiloside isomer II (3)	12	1.51	4.10
43.1	593	447, 285	Kaempferol diglycoside isomer I (4)	13	0.13	0.36
43.3	593	447, 285	Kaempferol diglycoside isomer II (4)	13	0.38	1.04

Compounds were quantified using available reference compounds as the external standards that were structurally similar to the identified compound and were expressed as equivalents of punicalagin (1), catechin (2), ellagic acid (3), or quercetin-3-glucoside (4). Colors indicate the family in which the compounds are grouped: green for flavanols, blue for flavonols, and pink for ellagitannins.

*Data quantified by HPLC-mass spectrometry and expressed as the percentage of total dry weight of the extract.

**Data expressed as the percentage of compound respect total polyphenols determined by Folin-Ciocalteu assay.

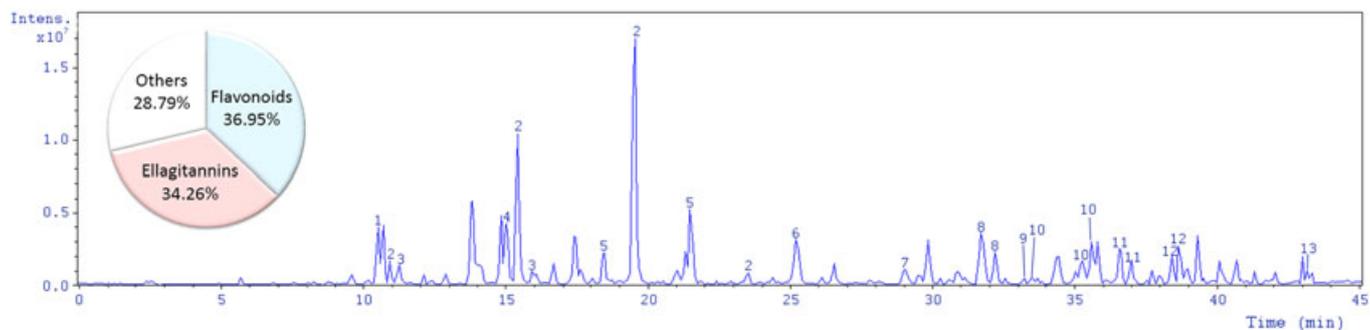


Figure 1. Base peak chromatogram obtained by HPLC-ESI-IT-MS/MS of *Cistus salviifolius* aqueous extract purified by low pressure chromatography using amberlite resin. The numbers of the identified peaks correspond to the numbers shown in Table 1. The insert shows the quantification and distribution of the major polyphenolic compounds present in *C. salviifolius* aqueous extract. This figure is available in color online at wileyonlinelibrary.com/journal/ptr.

dimer) and the rest belonged to the flavonols subfamily (MY, quercetin, and kaempferol glycosides). Altogether, these families represented approximately 70% of the total polyphenols in the extract (Table S1) and were distributed into 34% ellagitannins and 37% total flavonoids (Fig. 1, insert). A more detailed characterization and quantitation of the extract by HPLC-MS is given in Table 1. We selected several individual compounds from the extract based on their highest abundance and looked for available pure standard compounds bearing similar chemical structure, that is, PU, EA, MY, and quercetin glycoside (Fig. S1). Punicalin and PU gallate were discarded because of their structural similarity with PU. Flavanols such as epigallocatechin and polymers were not a goal in this study because their antimicrobial synergic activity has been studied in depth recently (Taylor 2013).

All of these compounds have a recognized antimicrobial activity (Ong and Khoo 1997; Machado *et al.*, 2002; Taguri *et al.*, 2004; Howell and D'Souza 2013) and a significant activity against Gram-positive bacteria, alone or in combination with antibiotics (Hancock *et al.*, 2010; Eumkeb *et al.*, 2011; Joray *et al.*, 2011). However, this is the first time that the potential antimicrobial synergic effects have been studied in depth among these compounds.

Selected polyphenols derived from *Cistus salviifolius* extract show strong synergistic antimicrobial effects against *Staphylococcus aureus*

First, the MIC₅₀ of the individual selected compounds against *S. aureus* was determined as described in the Material and Methods section. Next, several pairwise combinations were chosen for further analysis using the isobole approach. All the possible binary combinations (six) were tested at different weight/weight proportions of the compounds to determine the MIC₅₀ values of the combinations and to build the isobolograms. The results of the MIC₅₀ values for the combinations are shown in Table 2. First, the combinations belonging to the same family of polyphenols were tested, that is, the flavonoids (Q3G+MY) and the ellagitannins (EA+PU). Then, all the possible combinations between the flavonoids and the ellagitannins (Q3G+PU, MY+EA, MY+PU, and EA+Q3G) were also tested (Table 2). MIC₅₀ values were used to represent the isobolograms for all the combinations (Fig. 2).

According to Berenbaum's isobole method, the combinations Q3G+MY, EA+PU, MY+PU, and EA+Q3G (Figs. 2A, 2B, 2E, and 2F) showed a clear concave isobologram towards the zero point, indicating a potential synergistic or potentiated (over-additive) effect. In contrast, the combination MY+EA (Fig. 2D) showed a parallel shift of the values upwards in the plot, indicating no interaction between the compounds. The combination Q3G+PU (Fig. 2C) displayed a concave isobole shape; then, further analysis of the FICI was necessary for confirmation.

The FICI values were determined to confirm and quantify the potential synergistic effects of the combinations. The FICI analysis confirmed potent synergistic effects in the combinations Q3G+MY and EA+PU (Table 2), with FICI values ≤ 0.5 in Q3G+MY (EUCAST 2000; Wagner, 2011), and remarkably low values in the EA+PU combination. For instance, Q3G+MY showed strongly decreased MIC₅₀ values compared with the single compounds, that is, almost a threefold decrease when used at 3:1 or 1:3 proportions and almost a 20-fold decrease when the combination was enriched in MY (1:7). A sharp decrease in MIC₅₀ values was observed in the EA+PU combination, which exhibited very low FICI values at all the proportions tested, indicating strong synergistic effects between these compounds. When the FICI values of the combination Q3G+PU were analyzed, only two of the proportions indicated synergic interaction (Table 2). This result evidenced that synergic interaction showed a strong dependence on the ratio between both compounds. The behavior of the combination MY+EA was considered 'indifferent' because FICI values were >1 to <2 ; thus, no interaction was present between these two compounds, confirming the results of the isobologram (Fig. 2D). Regarding the MY+PU combination, which showed a concave isobole plot, the FICI analysis indicated that the proportions enriched in MY were additive, whereas the PU-enriched combinations were synergistic. Blends enriched in PU but containing small amounts of MY were up to eight times more powerful in the antimicrobial assays than pure PU. The EA+Q3G combination was also qualitatively evaluated as synergic from the isobologram, which was confirmed by the FICI analysis, as three out of four proportions tested led to a FICI ≤ 0.5 . Those proportions enriched in Q3G (1:3 and 1:7) decreased the MIC₅₀ value almost fivefold compared with pure Q3G.

Table 2. MIC₅₀ values (µg/mL), FICI values, and synergy evaluation for the selected pairwise combinations containing pure polyphenols, which were structurally similar to the most abundant compounds in the *Cistus salviifolius* extract

Combination A (Q3G + MY)				Combination B (EA + PU)			
Proportion (w/w)	MIC ₅₀	FICI		Proportion (w/w)	MIC ₅₀	FICI	
1:0	14.37 ± 4.10	–	–	1:0	12.35 ± 4.29	–	–
7:1	7.62 ± 2.40	0.52	Additive	7:1	3.06 ± 0.94	0.095	Synergic
3:1	6.03 ± 4.14	0.41	Synergic	3:1	1.20 ± 0.40	0.045	Synergic
1:3	5.02 ± 2.47	0.32	Synergic	1:3	1.16 ± 0.49	0.077	Synergic
1:7	0.76 ± 0.24	0.05	Synergic	1:7	0.52 ± 0.45	0.038	Synergic
0:1	15.76 ± 3.41	–	–	0:1	42.11 ± 9.33	–	–
Combination C (Q3G + PU)				Combination D (MY + EA)			
1:0	14.37 ± 3.41	–	–	1:0	12.35 ± 4.29	–	–
7:1	30.75 ± 1.41	1.96	Indifferent	3:1	18.29 ± 7.15	1.40	Indifferent
3:1	25.46 ± 2.37	1.48	Indifferent	1:1	19.31 ± 7.31	1.39	Indifferent
1:3	11.80 ± 7.60	0.41	Synergic	1:3	20.48 ± 1.17	1.36	Indifferent
1:7	8.67 ± 15.52	0.31	Synergic	1:7	21.84 ± 1.49	1.43	Indifferent
0:1	42.11 ± 9.30	–	–	0:1	15.76 ± 3.41	–	–
Combination E (MY + PU)				Combination F (EA + Q3G)			
1:0	15.76 ± 3.41	–	–	1:0	12.35 ± 4.29	–	–
7:1	11.48 ± 2.09	0.67	Additive	7:1	8.47 ± 2.61	0.67	Additive
3:1	10.28 ± 3.45	0.55	Additive	3:1	4.55 ± 1.13	0.36	Synergic
1:3	6.06 ± 0.58	0.17	Synergic	1:3	3.42 ± 1.77	0.25	Synergic
1:7	5.83 ± 1.79	0.19	Synergic	1:7	2.91 ± 0.73	0.21	Synergic
0:1	42.11 ± 9.30	–	–	0:1	14.37 ± 4.10	–	–

MIC₅₀, minimum inhibitory concentration inhibiting 50% of bacterial growth; FICI, fractional inhibitory concentration index; Q3G, quercetin-3-glucoside; MY, myricetin; PU, punicalagin; EA, ellagic acid.

To confirm the synergistic interactions, data for all pure compounds and mixtures were processed using Compusyn software as described in the Material and Methods section (Chou 2006). This software brings information about the interaction between the components of a mixture by determining combination index value, which pharmaceutical meaning is close to FICI value used previously (results are resumed in Table S2). In addition, Compusyn was also used to obtain the polygonogram plot (Fig. S2), which can be used to obtain a simplified visual presentation of the overall interactions between all the tested pure compounds (Chou 2006). In both cases, Compusyn results confirmed all the data presented previously.

The synergy between ellagitannins and flavonols may explain the antimicrobial capacity of *Cistus salviifolius* extract: mechanistic implications

The combinations between the flavonols, Q3G + MY, and between the ellagitannins and their monomeric form EA, EA + PU, exhibited a clear synergistic behavior. In contrast, the crossed combinations of the same compounds were either indifferent (MY + EA) or additive/low synergic (Q3G + PU). The other two crossed combinations, MY + PU and EA + Q3G, also showed a significant synergistic behavior, but not all the proportions exhibited synergistic FICI values, making it difficult to draw conclusions using the simple isobologram. For instance, the combination EA + Q3G showed the best synergic behavior at the ratio 1:7, that is, at the highest proportion of Q3G, which

was confirmed by the lowest FICI value. This result reveals that a low amount of EA is required to obtain synergy with Q3G and to decrease MIC₅₀ values dramatically. This fact could be explained by the capacity of EA to reach several targets and to cooperate in an agonistic and synergistic way, which is maximized at high concentrations of Q3G (Wagner 2011). Moreover, EA and Q3G may show preferences for completely different molecular targets probably because of their dissimilar lipophilicity. If the amount of EA is increased in the mixture, the efficacy does not improve, most likely because all the therapeutic receptors for EA are targeted. A similar hypothesis can be assumed for the combinations Q3G + MY, Q3G + PU, and MY + PU, at 1:3 or 1:7 ratios. The most plausible explanation for this behavior is that these combinations have multi-target effects and the maximum effect is achieved at a low proportion of the first component.

A plausible explanation of the synergistic behavior of PU and EA mixture, which is achieved at all proportions studied, may be based on the different molecular targets of the monomeric and polymeric forms. Our result may also explain the antimicrobial capacity of pomegranate extracts rich in both compounds (Howell and D'Souza 2013). MY also behaved synergistically with PU; however, no synergy was observed between MY and the monomeric form EA (Fig. S1). From a mechanistic point of view, this fact may be because PU has the ability to reach its molecular target at the bacterial membrane because of its bigger size, whereas the monomer may reach deeper targets. This is consistent with the fact that plant extracts containing tannins exhibit bacteriostatic properties by inhibiting biofilm

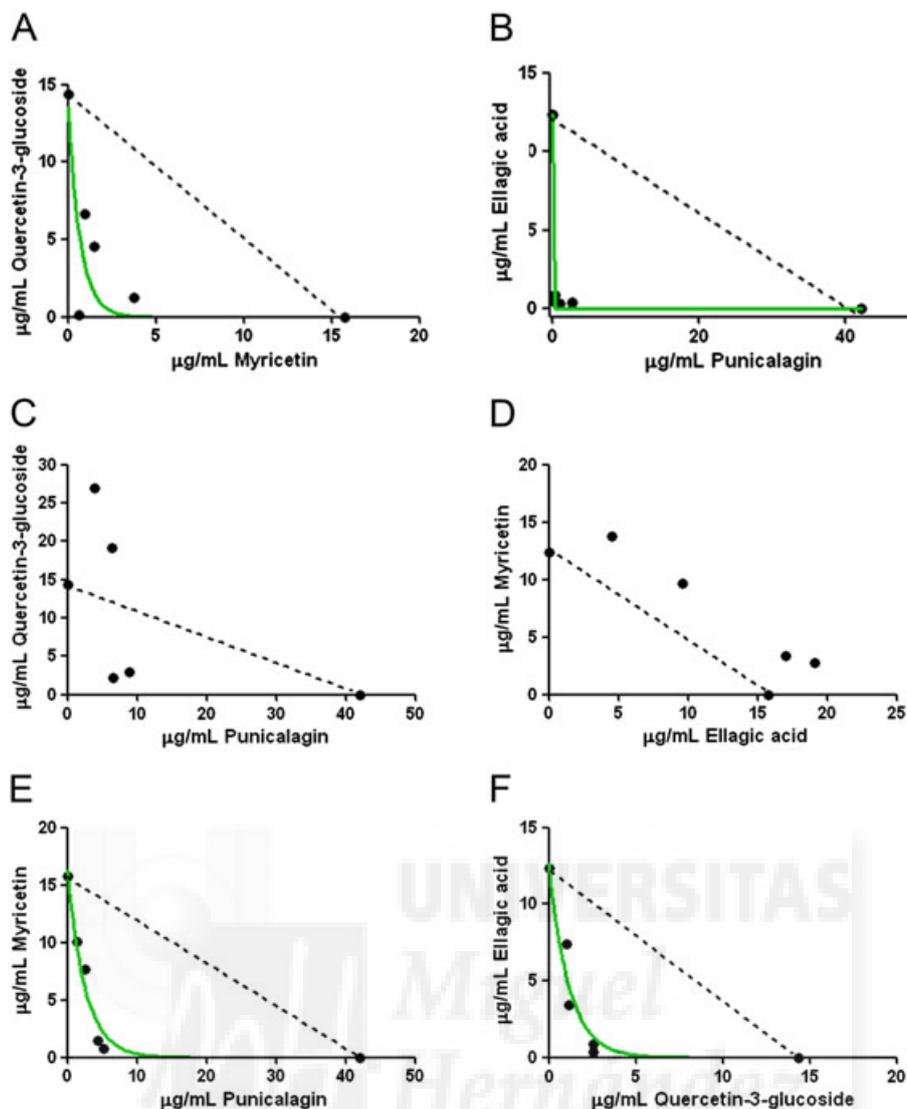


Figure 2. Isobolograms for the MIC₅₀ values of the selected polyphenolic compounds grouped in pairwise combinations and obtained from *Staphylococcus aureus* growth inhibitory assays: quercetin-3-glucoside (Q3G) + myricetin (MY) (A), ellagic acid (EA) + punicalagin (PU) (B), Q3G + PU (C), MY + EA (D), MY + PU (E), and EA + Q3G (F). This figure is available in color online at wileyonlinelibrary.com/journal/ptr.

formation via bacterial membrane damage (Trentin *et al.*, 2013). Regarding flavonols, if we compare the Q3G+PU and MY+PU combinations, it can be concluded that MY contributes more than Q3G to the synergic behavior at identical concentration because a lower FICI value is obtained. It is unknown whether the higher antimicrobial capacity of MY compared with quercetin glucoside in these combinations is because of the trihydroxyphenyl moiety of the B-ring or because of the absence of the glucose (Fig. S1).

The results obtained in this study demonstrate that for each blend, there is an optimum proportion that gives the best results in terms of synergy. *C. salviifolius* extract is a complex combination of polyphenols; hence, other unknown multiple interactions may take place. Despite this fact, the approximate proportions of the active compounds in the extract, which have similar structure to those exhibiting strong synergic behavior in the mixtures of pure compounds, can be roughly estimated. From the quantification data obtained in Table 1, the following proportions were found in the extract for those compounds that have exhibited synergy through FICI analysis: Q3G + MY 1:1.2, EA + PU 1:3, MY + PU 1:3, and EA + Q3G 1:1.6. All of these proportions are

close to those of the pure compounds showing synergic behavior (Table 2); therefore, this could explain the strong antimicrobial activity of the complete extract. The FICI values for the synergic mixtures found in the present study are similar to those previously reported for synergic combinations between antibiotics and essential oils (Rosato *et al.*, 2007; Joray *et al.*, 2011) or ellagitannins (Hussin and El-Sayed 2011), suggesting that the synergic interactions between the *C. salviifolius* polyphenols are relevant. In agreement with our results, it has also been postulated that the potent antibacterial capacity of the pomegranate extracts might be due to the potential synergistic action of ellagitannins, anthocyanins (pelargonidin-3-galactose and cyanidin-3-glucose), and flavonols (quercetin and MY) (Howell and D'Souza 2013).

Here, we report for the first time the synergistic interaction between ellagitannins, flavonols, and between ellagitannins and flavonols, which may explain the strong antimicrobial capacity of *C. salviifolius* extract and that of other botanical extracts containing these compounds at certain proportions. Botanical mixtures may be able to reach multiple target sites, most likely because of the ability of plants to develop molecular

promiscuity or to present polypharmacologic effects through evolution. This feature may provide plant mixtures of bioactive compounds with the capacity to exert synergistic therapeutic effects (Gertsch 2011; Wagner 2011; Barrajon-Catalan *et al.*, 2014). According to the literature, some of the combinations of the natural polyphenols in this study exhibit MIC₅₀ values close to drug potency level or within the tenfold range of drug potency level (Qin *et al.*, 2012); therefore, their potential as phytopharmaceuticals may deserve further attention.

In conclusion, the results presented previously prove that the selected combinations of polyphenols, which are also present in the *C. salviifolius* aqueous extract, show a synergic antimicrobial activity through the Barenbaum's isobole approach and FICI calculation. The PU and EA combination showed an extremely potent synergic effect, and the combinations MY/PU, EA/Q3G, and Q3G/MY exhibited significant synergic antimicrobial effects. These compounds are present in *C. salviifolius* extract at ratios that correspond to similar synergic proportions in the pairwise combinations that have been studied for synergic behavior, thus explaining the antimicrobial activity of *C. salviifolius* extract against

S. aureus. It may be worth to extend the study of the antimicrobial effects observed here to other bacterial strains, alone or in combination with antibiotics, which may create the base for a new generation of phytopharmaceuticals.

Acknowledgements

This investigation was supported by PTQ-08-03-08076 contract to E. Barrajon-Catalan, AGL2011-29857-C03-03 Grant from MICINN (Ministerio de Ciencia e Innovación), PROMETEO/2012/007 and ACOMP/2013/093 Grants from Generalitat Valenciana, and CIBER (CB12/03/30038, Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, CIBERobn) from Instituto de Salud Carlos III. We thank M. T. Garzón for her valuable technical assistance. We also thank Químicas del Vinalopó, S.L., and Endemic Biotech, S.L., for providing us with the raw materials.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Barrajon-Catalan E, Fernandez-Arroyo S, Roldan C, *et al.* 2011. A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship. *Phytochem Anal* **22**(4): 303–312.
- Barrajon-Catalan E, Fernandez-Arroyo S, Saura D, *et al.* 2010. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem Toxicol* **48**(8-9): 2273–2282.
- Barrajon-Catalan E, Herranz-Lopez M, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menendez JA, Micol V. 2014. Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: far beyond their antioxidant properties. *Adv Exp Med Biol* **824**: 141–159.
- Bedoya LM, Bermejo P, Abad MJ. 2009. Anti-infectious activity in the Cistaceae family in the Iberian Peninsula. *Mini Rev Med Chem* **9**(5): 519–525.
- Berenbaum MC. 1989. What is synergy? *Pharmacol Rev* **41**(2): 93–141.
- Betts JW, Kelly SM, Haswell SJ. 2011. Antibacterial effects of theaflavin and synergy with epicatechin against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int J Antimicrob Agents* **38**(5): 421–425.
- Brehm-Stecher BF, Johnson EA. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apriteone. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10): 3357–3360.
- Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**(3): 621–681.
- Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Op Biotech* **23**(2): 174–181.
- Darvesh AS, Bishayee A. 2013. Chemopreventive and therapeutic potential of tea polyphenols in hepatocellular cancer. *Nutr Cancer* **65**(3): 329–344.
- EUCAST. 2000. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST definitive document.
- Eumkeb G, Siritwong S, Phitaktim S, Rojtinnakorn N, Sakdarat S. 2011. Synergistic activity and mode of action of flavonoids isolated from smaller galangal and amoxicillin combinations against amoxicillin-resistant *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **112**(1): 55–64.
- F'Guyer S, Afaq F, Mukhtar H. 2003. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photo* **19**(2): 56–72.
- Freeman BL, Eggett DL, Parker TL. 2010. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *J Food Sci* **75**(6): C570–C576.
- Gertsch J. 2011. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. *Planta Med* **77**(11): 1086–1098.
- Gilbert B, Ferreira Alves L. 2003. Synergy in plant medicines. *Curr Med Chem* **10**(1): 13–20.
- Hancock V, Dahl M, Vejborg RM and Klemm P. 2010. Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. *J Med Microbiol* **59**(4): 496–498.
- Herranz-Lopez M, Fernandez-Arroyo S, Perez-Sanchez A, *et al.* 2012. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: perspectives and implications. *Phytomedicine* **19**(3-4): 253–261.
- Howell AB, DH D'Souza. 2013. The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**: 606212–606222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23762148>.
- Hussin WA, El-Sayed WM. 2011. Synergic interactions between selected botanical extracts and tetracycline against gram positive and gram negative bacteria. *J Biol Chem* **11**(7): 433–441.
- Joray MB, ML Gonzalez, SM Palacios, MC Carpinella. 2011. Antibacterial activity of the plant-derived compounds 23-methyl-6-O-desmethyllauricepyrone and (Z, Z)-5-(trideca-4, 7-dienyl)resorcinol and their synergy with antibiotics against methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *J Agric Food Chem* **59**(21): 11534–11542.
- Khandelwal AR, Hebert VY, Kleinedler JJ, *et al.* 2012. Resveratrol and quercetin interact to inhibit neointimal hyperplasia in mice with a carotid injury. *J Nutr* **142**(8): 1487–1494.
- Lin RD, Chin YP, Lee MH. 2005. Antimicrobial activity of antibiotics in combination with natural flavonoids against clinical extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Phytother Res* **19**(7): 612–617.
- Machado TDB, Leal ICR, Amaral ACF, *et al.* 2002. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc* **13**(5): 606–610.
- Mandalari G, Bisignano C, D'Arrigo M, *et al.* 2010. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *Lett Appl Microbiol* **51**(1): 83–89.
- Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* **75**(3): 311–335.
- Odds FC. 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* **52**(1): 1.
- Ong KC, Khoo HE. 1997. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol* **29**(2): 121–126.
- Qin C, Tan KL, Zhang CL, *et al.* 2012. What does it take to synergistically combine sub-potent natural products into drug-level potent combinations? *PLoS One* **7**(11): e49969.

- Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM. 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* **20**(7): 932–952.
- Ríos JL and Recio MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity." *J Ethnopharmacol* **100**(1-2): 80–84.
- Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* **14**(11): 727–732.
- Seeram, NP, Adams LS, Henning SM, *et al.* 2005. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem* **16**(6): 360–367.
- Taguri, T, Tanaka T, Kouno I. 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biol Pharm Bull* **27**(12): 1965–1969.
- Taylor PW (2013). Alternative Natural Sources for a New Generation of Antibacterial Agents. *Int J Antimicrob Agents*.
- Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barrajón-Catalán E, *et al.* 2013. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol* **55**: 313–322.
- Trentin DS, Silva DB, Amaral MW, *et al.* 2013. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PLoS One* **8**(6): e66257.
- Vegara S, Funes L, Martí N, *et al.* 2011. Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituents of plant extracts in carrot broth. *Food Chem* **128**(4): 872–877.
- Wagner H. 2011. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* **82**(1): 34–37.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

