



# FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

## **Sinergismo farmacológico entre extractos vegetales y cloxacilina frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero 2019

Autor: Santiago Vidal García  
Modalidad: Experimental  
Tutor/es: Enrique Barraión Catalán

*A mis padres,  
por su esfuerzo constante para darme las oportunidades que ellos nunca  
tuvieron*



## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. ANTECEDENTES .....	3
1.1 El problema de la resistencia a los antibióticos .....	3
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SARM) .....	5
1.3 Las plantas como fuente de biomoléculas activas .....	6
1.4 Polifenoles como agentes activos .....	7
1.5 Extractos botánicos .....	10
1.6 Dianas moleculares de los polifenoles .....	11
2. OBJETIVOS .....	13
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	13
3.1 Preparación de los extractos .....	13
3.2 Fraccionamiento en columna de afinidad .....	15
3.3 Determinación del contenido polifenólico total .....	17
3.4 Capacidad antimicrobiana de los extractos .....	19
3.5 Ensayos de sinergia .....	20
4. RESULTADOS .....	22
5. DISCUSIÓN .....	25
5.1 Contenido en polifenoles y capacidad antimicrobiana .....	25
5.2 Limitaciones del estudio .....	27
5.3 Perspectiva de futuro .....	28
6. CONCLUSIONES .....	28
7. AGRADECIMIENTOS .....	29
8. BIBLIOGRAFÍA .....	30

## RESUMEN

**Antecedentes:** Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) son una causa creciente de infecciones nosocomiales y extrahospitalarias. Diferentes extractos preparados a partir de *Cistus salviifolius* (CS) y uno comercial de *Punica granatum* (PG) han mostrado una notable capacidad antimicrobiana en bacterias grampositivas y gramnegativas, así como un efecto sinérgico cuando se usan junto con ciertos antibióticos comerciales.

**Objetivos:** Comprobar si el método de extracción afecta a la proporción de polifenoles y establecer una correlación con su capacidad antibacteriana. Determinar la actividad sinérgica entre los extractos CS o GP y la cloxacilina en cepas clínicas de SARM.

**Método:** Se prepararon extractos de *C. salviifolius* mediante distintos procedimientos, incluyendo el uso de ultrasonidos y el fraccionamiento en columnas de afinidad. El contenido total en polifenoles se estableció mediante el ensayo Folin-Ciocalteu. A continuación, se probó su capacidad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y se realizaron ensayos de sinergia entre CS o PG y cloxacilina en 10 cepas clínicas de SARM.

**Resultados:** El extracto CS fraccionado ha mostrado ser el de mayor contenido polifenólico ( $60 \pm 5.49$  %GAE), seguido de PG ( $35.906 \pm 2.546$  %GAE), siendo también los de mayor efecto antibiótico, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI<sub>50</sub>) de 49 y 19 µg/mL frente a *E. coli*, respectivamente. CS demostró sinergia con la cloxacilina en un 50% de las cepas de SARM y aditividad en el 30 %; mientras que PG demostró sinergia en el 30 % de las cepas, aditividad en el 20 % y un posible efecto antagónico en el 30 %. En un 20 % de las cepas no se detectó ningún tipo de actividad en CS ni PG.

**Conclusiones:** La infusión simple seguida de fraccionamiento parece el mejor método de extracción para el CS, hallándose correlación entre el contenido en polifenoles y la actividad antimicrobiana. Por otro lado, se ha demostrado una notable actividad sinérgica entre la cloxacilina y ambos extractos frente a las cepas de SARM analizadas, siendo más relevante en el caso del extracto CS.

**Palabras clave:** Sinergismo Farmacológico, Extractos Vegetales, *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina

## ABSTRACT

**Background:** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) are an increasing cause of nosocomial and out-of-hospital infections. Different extracts prepared from *Cistus salviifolius* (CS) and a commercial extract of *Punica granatum* (PG) have shown remarkable activity against grampositive and gramnegative bacteria, as well as a synergistic effect when used together with some commercial antibiotics.

**Objectives:** To assess whether the extraction method affects the extract polyphenolic proportion and to establish a correlation with its antibacterial activity. To determine the synergistic activity between both, CS or GP extracts, and cloxacillin in MRSA clinical strains.

**Method:** Extracts of *C. salviifolius* were prepared by different procedures, including ultrasound-assisted extraction and affinity column purification. Total polyphenolic content has been established by the Folin-Ciocalteu assay. Later, antimicrobial activity against *E. coli* was assessed and synergistic assays between CS or PG and cloxacillin were conducted against 10 clinical strains of MRSA.

**Results:** The fractionated extract of CS has shown the higher polyphenolic content ( $60 \pm 5.49$  %GAE), followed by PG extract ( $35.906 \pm 2.546$  %GAE), also being the ones with major antibiotic effect, showing Minimal Inhibitory Concentrations 50 (MIC<sub>50</sub>) of 49 y 19 µg/mL, respectively, against *E. coli*. CS demonstrated a synergistic effect in the 50 % of the MRSA strains, and additivity in the 30 %; while PG showed a synergistic effect in the 30 % of the strains, additivity in the 20 % and possible antagonistic effect in the 30 %. No effect was shown by the same 20 % of the strains either with CS or PG.

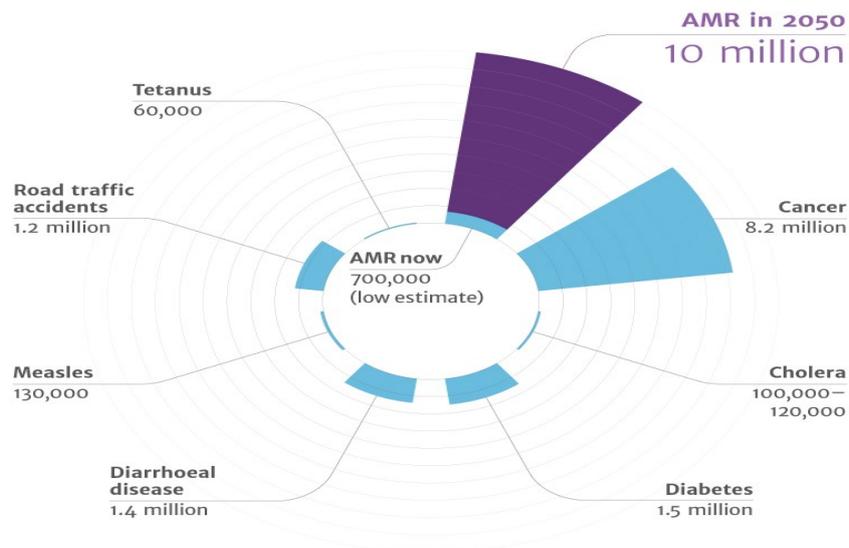
**Conclusion:** Simple infusion followed by column fractionation appears to be the best extraction method, showing correlation between the polyphenolic content and the antimicrobial effect. A remarkable synergistic activity with cloxacillin has been found, being CS the most interesting extract.

**Keywords:** Drug Synergism, Plant Extracts, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.

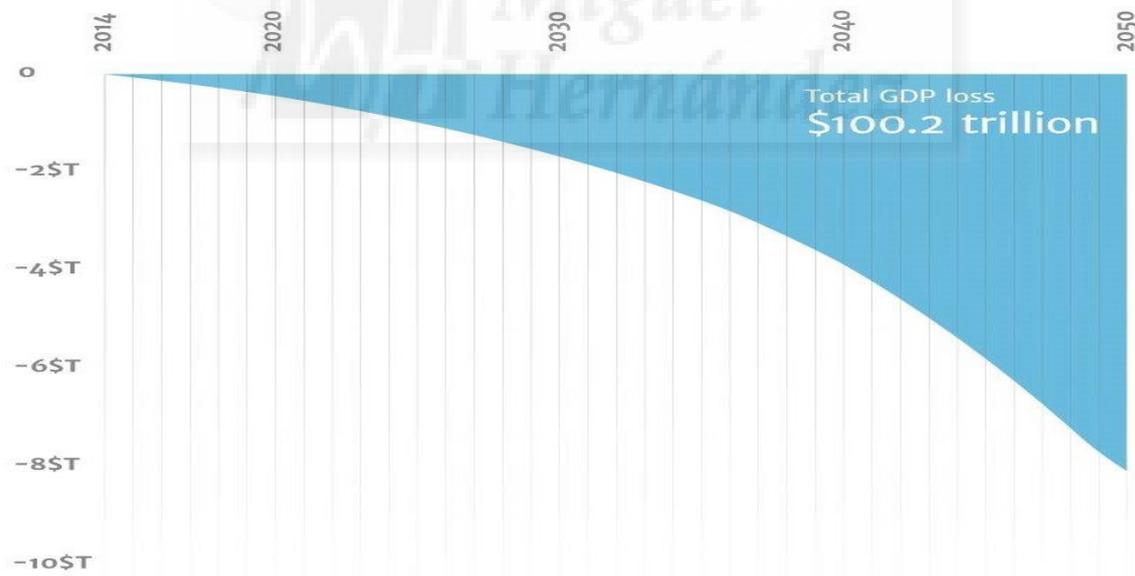
## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 El problema de la resistencia a los antibióticos**

La cada vez más común aparición de cepas resistentes a los distintos agentes antibióticos disponibles se ha convertido en un problema sanitario de primer orden. Estas bacterias son causantes de un gran número de infecciones nosocomiales y, más recientemente, en el ámbito extrahospitalario. Esto repercute en un gran aumento de la morbilidad y la mortalidad, estimándose que para 2050 el número de muertes a causa de infecciones por bacterias multirresistentes ascenderá a unos diez millones de personas (figura 1); así como un importante incremento en el gasto sanitario (figura 2), ante la dificultad de tratamiento y complicaciones que pueden producir. El arsenal terapéutico disponible está mermando de forma alarmante y actualmente el número de medicamentos para tratar este tipo de infecciones multirresistentes es extremadamente reducido <sup>1,2</sup>. La aparición de estas cepas es debida a una respuesta evolutiva natural a causa de la exposición a antibióticos en centros de salud y hospitales, agricultura y ambiente. Por ello, es necesario tratar el problema de forma integral y multidisciplinar sobre cinco campos principales: mecanismos de resistencia, especie del microorganismo, agente antimicrobiano en concreto, hospedador y contexto, paralelamente al desarrollo de nuevos medicamentos y estrategias terapéuticas <sup>3</sup>.



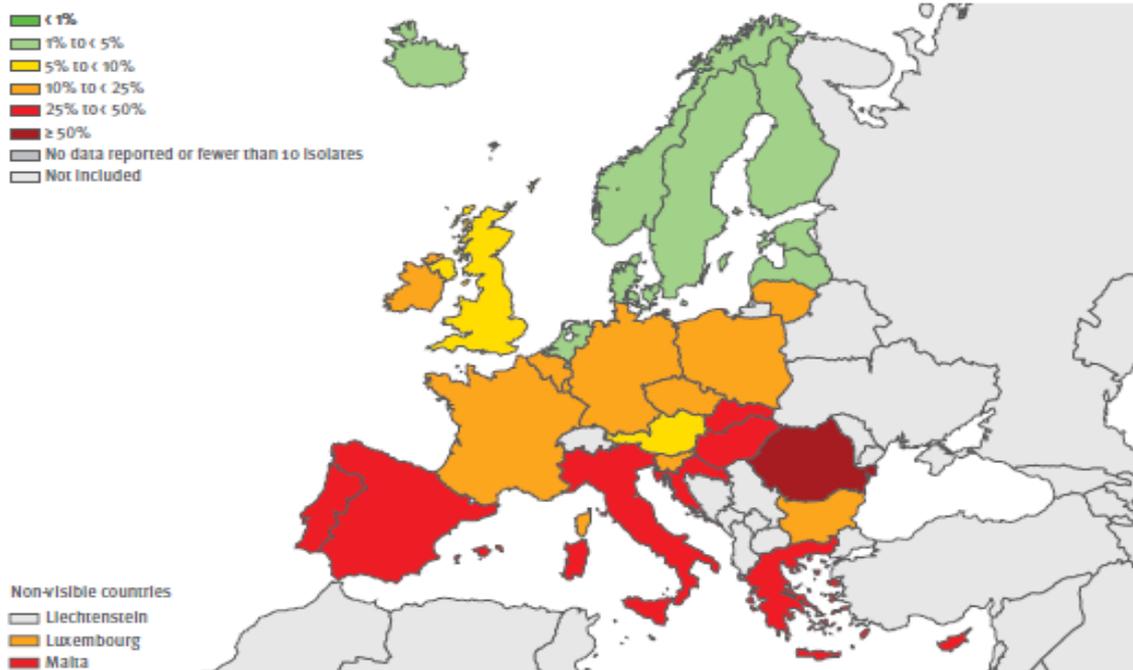
**Figura 1:** Proyección comparativa entre las muertes causadas por bacterias multirresistentes y las debidas a diferentes causas a nivel mundial para el año 2050. Fuente: *Review on Antimicrobial Resistance*. Disponible en: <https://amr-review.org/infographics.html>



**Figura 2:** Pérdida de Producto Interior Bruto (“GDP” por sus siglas en inglés) estimada en trillones de dólares americanos hasta 2050, a causa de la resistencia a los antibióticos. Fuente: *Review on Antimicrobial Resistance*. Disponible en: <https://amr-review.org/infographics.html>

## 1.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

El *S. aureus* se trata de un coco grampositivo, el cual presenta un alto ratio de resistencia a diversos antibióticos y es causa frecuente de infecciones de elevada gravedad, constituyendo una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Estudios moleculares han demostrado que esto se debe a uno o más clones de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) que se han vuelto endémicos en el entorno hospitalario; lo que unido a su facilidad para colonizar la mucosa nasal del ser humano de forma asintomática favorece en gran medida su dispersión <sup>4</sup>. De hecho, en algunos países de Europa, más del 50% de los aislados clínicos de *S. aureus* son SARM (figura 3). Su mecanismo de resistencia más común es el desarrollo de resistencia a betalactámicos mediado por la producción de betalactamasas, que hidrolizan el antibiótico. La meticilina es un integrante de este grupo de antibióticos que no se ve afectado por estas enzimas, por lo que ha sido ampliamente utilizada frente a *S. aureus* resistentes a penicilina, hasta el desarrollo de mecanismos de resistencia frente al mismo: hiperproducción de betalactamasas, modificación de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) y presencia de una PBP adquirida, la PBP2a <sup>5</sup>. Esta proteína provee de actividad transpeptidasa, necesaria para la síntesis de la pared celular, a concentraciones de antibiótico que normalmente inhiben las PBPs sensibles a betalactámicos <sup>6</sup> y es la principal responsable de la resistencia. La mayoría de autores coinciden en que este mecanismo apareció en la década de 1960, debido a la adquisición de los genes *mecA* o *mecC* de otra especie bacteriana, ya que esta proteína no es esencial para la supervivencia del estafilococo <sup>5,7</sup>. Por otro lado, se han detectado mutaciones en la proteína PBP4 en cepas con un elevado nivel de resistencia a betalactámicos. Las cepas carentes de esta mutación no son capaces de desarrollar una gran resistencia, lo que sugiere que esta proteína podría ser esencial, cooperando con PBP2a <sup>8</sup>. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos agentes o estrategias capaces de romper las barreras mencionadas anteriormente.



**Figura 3:** Porcentaje de aislados invasivos de SARM por país en la Unión Europea, 2016 <sup>9</sup>. Fuente: *European Center for Disease Prevention and Control*.

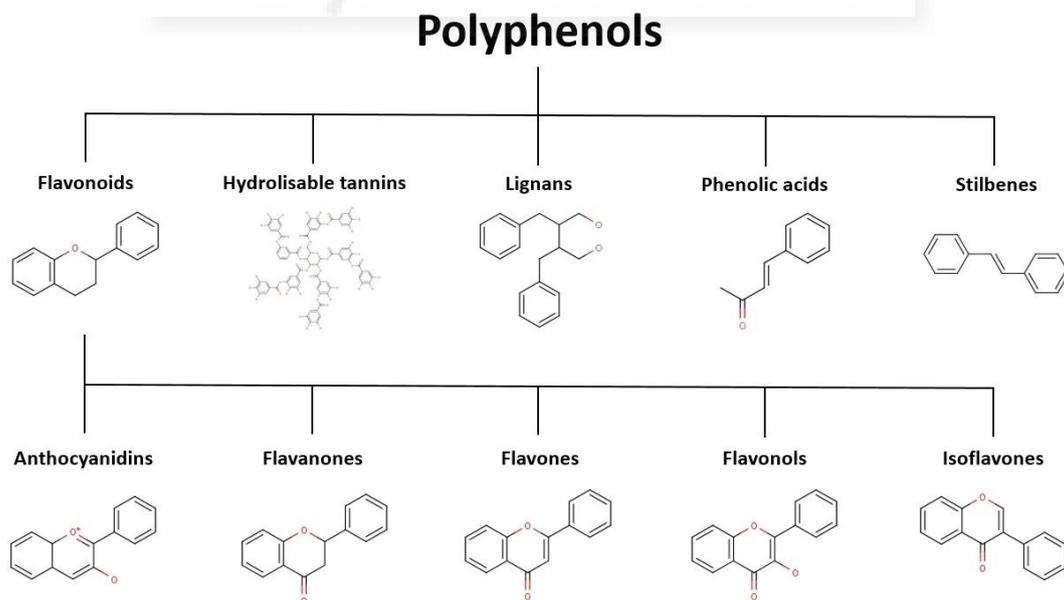
### 1.3 Las plantas como fuente de biomoléculas activas

Las plantas han mostrado ser una gran fuente de moléculas bioactivas. De hecho, sin tener en cuenta las vacunas, alrededor del 75% de los nuevos agentes antibacterianos aprobados entre 1981 y 2014 son de origen natural <sup>10</sup>. Las plantas son organismos carentes de un sistema inmune que les permita defenderse frente a las agresiones. Por este motivo, han desarrollado mecanismos que les permiten responder al estrés ambiental. De entre ellos, la producción de metabolitos secundarios es destacable, ya que constituyen un inmenso arsenal de sustancias con una gran variedad de efectos en distintos organismos <sup>11,12</sup>. Estas sustancias no suelen ser esenciales para los procesos metabólicos básicos, y su gran diversidad se debe en parte a un proceso evolutivo como defensa ante el ataque de microorganismos o la depredación por parte de los animales <sup>13</sup>. Esta diversidad es la responsable de su gran variedad de efectos, ya que actúan como ligandos de una amplia cantidad de dianas moleculares <sup>14</sup>, lo que puede suponer una ventaja a la hora de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

Las terapias combinadas suelen ser más eficientes que la monoterapia debido a la etiología multicausal de muchas patologías y/o a la existencia de varias dianas terapéuticas <sup>15</sup>. Estas estrategia terapéuticas se aprovechan del efecto sinérgico que se produce entre los distintos agentes utilizados, teniendo una especial importancia en la terapia antimicrobiana <sup>16</sup>. Los extractos vegetales son de por sí mezclas de diferentes compuestos, y por lo tanto pueden presentar estas ventajas. Además, su uso en combinación con fármacos tradicionales parece interesante para el desarrollo de nuevos métodos de tratamiento antimicrobiano por lo descrito anteriormente.

#### 1.4 Polifenoles como agentes activos

Los polifenoles constituyen un grupo diverso de sustancias resultado del metabolismo secundario de las plantas, perteneciendo a este grupo, entre otros, los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos (figura 4). Tienen en común la presencia de dos o más grupos fenólicos y suelen encontrarse en forma de heterósidos solubles en agua (conjugados con azúcares). En los siguientes apartados se describen brevemente los principales grupos de polifenoles, con especial atención a las referencias previas sobre su actividad antimicrobiana.



**Figura 4:** Familias y subfamilias de polifenoles <sup>17</sup>.

### 1.4.1 Ácidos fenólicos

Son en realidad fenoles simples, ya que están compuestos por un único anillo fenólico y una función ácido carboxílico. Derivan del ácido benzoico (ácido salicílico, ácido gálico, etc.) y del ácido cinámico (ácido cafeico, ferúlico y sinápico, etc.). Han mostrado actividad antimicrobiana frente a varias especies de bacterias grampositivas y gramnegativas <sup>18</sup>.

### 1.4.2 Taninos

Son mezclas complejas de polifenoles caracterizados por la ausencia de grupos nitrogenados, buena solubilidad en agua y disolventes orgánicos polares (etanol, acetona, etc.). Poseen capacidad para precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides), otorgándoles ésta su poder astringente. Se dividen en dos grandes grupos, los taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) y los taninos no hidrolizables.

Los galotaninos son compuestos formados por la esterificación de hasta cinco unidades de ácido gálico a un azúcar (generalmente glucosa). Han mostrado actividad, sobre todo, frente a bacterias grampositivas <sup>19</sup>.

Los elagitaninos se forman a partir de los galotaninos por acoplamiento oxidativo, dando lugar al ácido hexahidroxidifénico, que esterificará el azúcar. Se encuentran en varios alimentos como las nueces, frutas y bayas y el vino; y son especialmente abundantes en el fruto de la granada (*Punica granatum*) <sup>20</sup>. La punicalina y la punicalagina son dos de los componentes más significativos de este grupo hallados en el reino vegetal. Además de encontrarse en las anteriores fuentes vegetales, los elagitaninos extraídos de fuentes botánicas como la familia *Cistaceae* han mostrado efecto antibiótico a concentraciones micromolares <sup>21,22</sup>.

Los taninos hidrolizables, también conocidos como condensados, son moléculas complejas fruto de la condensación de varios flavanos. Los más conocidos son las procianidinas, derivadas de la condensación de las catequinas. Estudios previos han mostrado la actividad de las procianidinas frente a cepas de SARM, reduciendo su resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediante la supresión de

la actividad  $\beta$ -lactamasa y la reducción de la estabilidad de la membrana celular  
23

### 1.4.3 Flavonoides

Son un grupo caracterizado estructuralmente por un esqueleto polifenólico de 15C. A esta subfamilia pertenecen entre otros los flavanoles, las flavonas y las antocianinas.

Los flavanoles son una de las subclases mayoritarias, siendo sus compuestos más representativos la catequina, epicatequina galato, epigallocatequina y epigallocatequina galato, habiendo mostrado los dos últimos actividad antimicrobiana frente a cepas clínicas de *S. aureus* <sup>24</sup>. Las procianidinas mostraron un efecto antibiótico moderado, aunque un fuerte efecto sinérgico y reversión de la resistencia bacteriana a oxacilina o penicilina en aislados clínicos de SARM <sup>25</sup>.

Las antocianinas son moléculas coloreadas y solubles en agua (pigmentos). Su mayor representante, presente en la mayoría de las plantas, es el glucósido de 3-cianidina. El mecanismo de acción de estas moléculas se basa en la desintegración localizada de la membrana externa de las bacterias, produciendo la salida del citoplasma al exterior <sup>26</sup>

Otros subgrupos de flavonoides que cabe mencionar son los flavonoles (kempferol, quercetina y miricetina), las flavanonas (hesperidina y narigenina), las flavonas (apigenina y luteolina) e las isoflavonas (genisteína). Los flavonoles quercetina y kaempferol han mostrado un gran efecto antibiótico frente a SARM <sup>27</sup>, mientras que la narigenina (flavanona) exhibió, además de actividad antibacteriana, una reducción en la producción de  $\alpha$ -toxina de *S. aureus* <sup>28</sup>. Por otro lado, la luteolina y la apigenina (flavonas) también han mostrado efecto en aislados clínicos de SARM <sup>29,30</sup>.

### 1.4.4 Lignanos

Los lignanos son una subclase de compuestos caracterizados estructuralmente por la unión de dos moléculas de fenilpropano a través de los carbonos C8-C8'.

De entre ellos, el hiposóxido y el rooperol han mostrado efecto inhibitorio contra *S. aureus*, el cual se vio incrementado al usar el extracto completo de *Hypoxis rooperi* que los contenía <sup>31</sup>.

#### 1.4.5 Estilbenos

La estructura básica de los estilbenos consiste en dos anillos aromáticos, a los que se unen distintos sustituyentes, unidos por doble enlace, dando lugar a las formas “*cis*” y “*trans*”. Uno de los integrantes más conocidos de este subgrupo es el resveratrol, que ha mostrado actividad frente a bacterias grampositivas <sup>29</sup>.

#### 1.5 Extractos botánicos

Debido a la ya mencionada promiscuidad de efecto de los distintos polifenoles hallados en los vegetales, se ha visto casos en los que el uso directo de los extractos botánicos ha mostrado mayor actividad que sus constituyentes por separado <sup>31,32</sup> bien por esta promiscuidad de algunos polifenoles individuales, o por la presencia de varios compuestos con diferentes acciones y/o dianas.

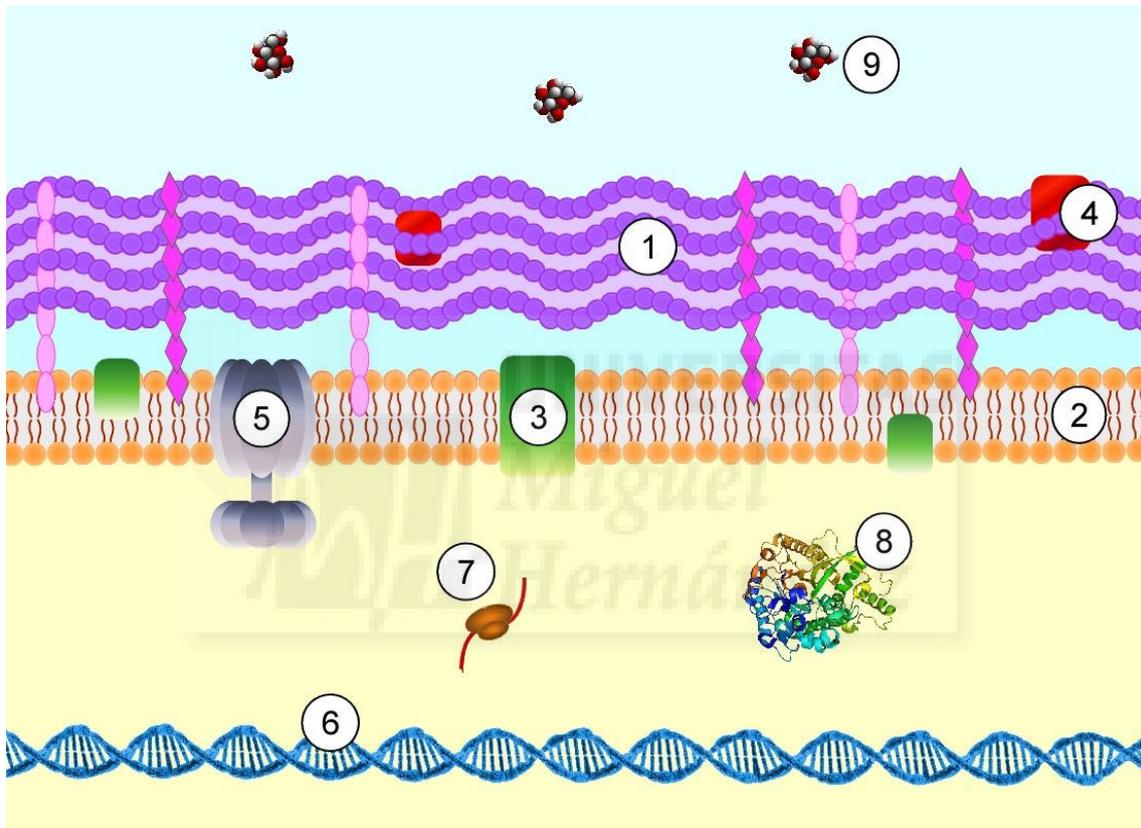
Diversos estudios han mostrado la capacidad antimicrobiana de los extractos procedentes de diferentes componentes de la familia *Cistaceae*. Los extractos acuosos de *C. ladanifer* y *C. populifolius* mostraron una remarcable actividad frente *S. aureus*. No obstante, de entre las diferentes especies de *Cistus* estudiadas, el más activo fue el extracto acuoso de *C. salviifolius* secado mediante *spray-dryer* y sometido a fraccionamiento en columna de afinidad <sup>22</sup>. Los polifenoles mayoritarios en los extractos de *C. salviifolius* que contribuyen a sus propiedades antimicrobianas pertenecen a las familias de los elagitaninos y flavonoides: punicalagina, punicalagina galato, punicalina, ácido elágico, epigalocatequina galato, hexóxido de miricetina, 3-arabinósido de miricetina, glucósido de quercetina y diglucósido de kaempferol <sup>33</sup>.

También se ha estudiado el efecto de varios extractos procedentes de la piel, zumo o subproductos de la granada (*P. granatum*), mostrando actividad frente a varias especies de bacterias grampositivas <sup>34</sup>. De hecho, un extracto de base metanólica demostró capacidad antibacteriana frente diversas cepas clínicas de

*S. aureus*, sensibles y resistentes a meticilina, además de un potente efecto sinérgico con antibióticos tradicionales al actuar como inhibidores de las bombas de eflujo y/o mejorando la captación de los mismos <sup>35</sup>.

### 1.6 Dianas moleculares de los polifenoles

La existencia de distintas dianas moleculares posibles explica la diversidad de efectos de los polifenoles (figura 5).



**Figura 5:** Esquema de las principales dianas de los polifenoles <sup>17</sup>. 1: pared celular; 2: membrana celular; 3: proteínas de membrana; 4: proteínas de la pared celular (PBP2a, etc.); 5: ATPasa y cadena transportadora de electrones; 6: ADN; 7: formación de ARN; 8: proteínas del citoplasma; 9: iones y otras moléculas solubles.

#### 1.6.1 Síntesis y componentes de la pared celular

La pared celular es una de las dianas mayoritarias para los compuestos polifenólicos, siendo las bacterias grampositivas generalmente más

susceptibles, ya que la membrana exterior de las gramnegativas actúa como una barrera de permeabilidad reduciendo la captación de estos compuestos <sup>36</sup>.

Los polifenoles pueden destruir la integridad estructural de la pared celular y la matriz intracelular, produciendo deformación celular, rotura de la pared y condensación de material celular en la membrana <sup>37</sup> y el consiguiente aumento de la permeabilidad celular <sup>38</sup> y muerte del microorganismo.

Un mecanismo potencial que explica la degradación de la pared celular es la inactivación por la agregación de ciertas proteínas de superficie, incluyendo PBPs (“penicillin binding proteins”), que son clave en la formación de la pared <sup>39</sup>. Estudios previos han demostrado que la epicatequina galato (ECG) se une a la membrana celular de MRSA, reduciendo su fluidez al producir transformaciones lipídicas que afectan a la maquinaria de biosíntesis del peptidoglicano; afectando también a la cooperación entre PBP2 y PBP2a para superar la resistencia a betalactámicos <sup>40</sup>. Se ha visto que algunos polifenoles, como ciertos flavonoides y taninos, interaccionan de forma inespecífica con las PBPs, incluyendo PBP2a, inhibiendo el crecimiento de MRSA <sup>41</sup>

Diversos polifenoles han mostrado propiedades inhibitorias de betalactamasas, como son: epicatequina, epigalocatequina galato, ácido tánico, quercetina y kaempferol <sup>42,43</sup>. La quercetina y el kaempferol demostraron, además, sinergia con antibióticos como ciprofloxacino y rifampicina <sup>43</sup>.

### **1.6.2 Otras proteínas diana de los polifenoles**

Otras posibles dianas para los polifenoles son las proteínas de adhesión de superficie, proteínas de membrana y polipéptidos de la pared celular <sup>36</sup>. Por ejemplo, se ha visto que polifenoles derivados de *Larrea tridentata* afectaron a la actividad de algunas proteínas pertenecientes al sistema de transporte ABC de MRSA, impidiendo a la bacteria eliminar los fitoquímicos y produciendo su muerte <sup>44</sup>.

### 1.6.3 Regulación de la expresión génica

Ciertos polifenoles pueden modificar la expresión génica, produciendo importantes cambios metabólicos en bacterias resistentes. Por ejemplo, el magnolol, un lignano, ha demostrado poder reducir de forma significativa la expresión de los genes de resistencia *mecA*, *mecI*, *femA* y *femB*<sup>45</sup>. La quercetina y la epigallocatequina inhiben la síntesis de ARN en *S. aureus*<sup>46</sup>.

### 1.6.4 Formación de biofilms

Muchas bacterias forman biofilms para sobrevivir. De hecho, la mayoría de las infecciones por estafilococos están relacionadas con su capacidad de formar dichas estructuras. Los polifenoles han demostrado propiedades anti-biofilm en *S. aureus*<sup>47</sup> y en *Streptococcus pyogenes*, el cual es causa habitual de faringitis bacteriana, por lo el uso de polifenoles podría ser de ayuda en la prevención de esta patología<sup>48</sup>.

## 2. OBJETIVOS

Por todo lo expuesto, se ha decidido realizar este estudio centrándose en tres objetivos fundamentales:

1. Comprobar si el método de extracción de polifenoles a partir de *C. salviifolius* afecta a la proporción de polifenoles en el extracto y establecer una correlación con su capacidad antimicrobiana.
2. Determinar la actividad sinérgica con cloxacilina de los extractos de *C. salviifolius* y *P. granatum* frente a MRSA.
3. Analizar la composición de dichos extractos con el fin de encontrar los candidatos más probables implicados en su actividad antimicrobiana.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Preparación de los extractos

En primer lugar, se recolectó aproximadamente 1 kg de *C. salviifolius* cultivado en el parterre de la universidad (figura 6). Una parte se dejó secar a temperatura (T) ambiente, mientras que otra se dejó secar en estufa a 50 °C, ambas durante

24h; y se trituraron 400 g de hoja fresca. A continuación, se procedió a la extracción a partir de hoja fresca (recién recolectada) en agua, mediante el método descrito previamente por el grupo de acogida<sup>21</sup>. Transcurrido el tiempo de extracción, se realizó una filtración a vacío, con el fin de eliminar las partes sólidas presentes en la mezcla. Después, se procedió a concentrar el líquido resultante (800 mL aproximadamente) mediante el uso de rotavapor, resultando en 400 mL de extracto acuoso concentrado, con una turbidez de 21° Brix, al que se le dio el nombre de “CS160418”. Posteriormente, se procedió a eliminar el disolvente mediante *spray-dryer*, modelo “Mini Buchi 290”, obteniéndose 27.9 g de producto seco (rendimiento del 7% p/p).



**Figura 6:** Plantación de *C. salviifolius* en el parterre de la universidad.

Por otro lado, una vez seca la planta almacenada a las dos temperaturas usadas, se procedió a realizar la extracción de ambos stocks del mismo modo: 26.3 g de hoja secada a temperatura ambiente triturada en 131.5 mL de agua (CS160418-AB) y 24.3 g de hoja secada en estufa a 50 °C en 121.5 mL de agua (CS1640418-ET). Debido al menor volumen de extracción, la eliminación del disolvente se llevó a cabo mediante *Speedvac*, modelo “GeneVac miVac DUO concentrator” durante aproximadamente 9h. Además, se usó como control un extracto preparado y almacenado en el laboratorio en 2011, el extracto CS120911. Más tarde, se realizó una nueva recolección del CS proveniente del parterre de la

universidad, y se prepararon nuevos extractos mediante los siguientes procedimientos:

- CS290518-CV: Extracción convencional descrita en párrafos anteriores.
- CS290518-US<sub>1</sub>: Extracción convencional con un pulso inicial de ultrasonidos, a 40 W de potencia, de 4min de duración.
- CS290518-US<sub>2</sub>: Extracción convencional con dos pulsos de ultrasonidos de 2 min de duración, a 40 W, uno al inicio y otro tras 2h de extracción.
- CS290518-MW<sub>1</sub>: Extracción convencional con un pulso inicial de 60s de microondas a 385 W.
- CS290518-MW<sub>2</sub>: Extracción convencional con dos pases de 30s de microondas a 385 W, el primero al inicio y el segundo transcurridas 2h de extracción.

Todos los extractos fueron sometidos a filtración tras su preparación, y almacenados en disolución en el frigorífico a 2 °C.

Para *P. granatum*, se usó un extracto comercial (Nutragranate, Nutracitrus S.L., Elche) enriquecido en punicalinas y punicalaginas como medio comparativo.

### 3.2 Fraccionamiento en columna de afinidad

Tras analizar los datos de contenido polifenólico y capacidad antimicrobiana obtenidos, se decidió realizar el fraccionamiento, mediante cromatografía en columna de afinidad (figura 7), a partir del extracto CS160418, por ofrecer éste mejores resultados.

Se lavaron tres veces con agua destilada 50 g de resina Amberlite® FPX66, de densidad  $\rho = 0.68 \text{ g/cm}^3$  y se rellenó una columna de 15 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro, con un volumen ( $V_c$ ) de  $73.63 \text{ cm}^3$ . Para calcular la cantidad de resina necesaria ( $m_r$ ), primero se obtuvo el volumen interno de la columna:

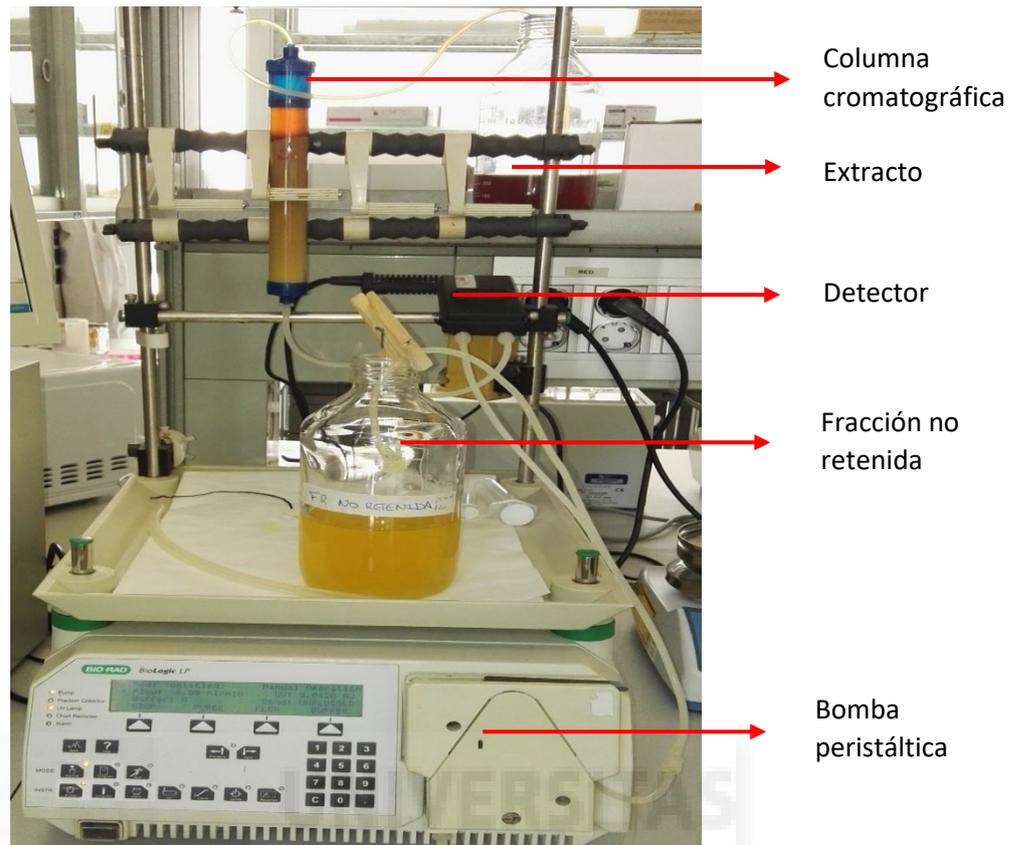
$$V_c = \pi \times r^2 \times h = 73.63 \text{ cm}^3$$

$$m_r = \rho \times V_c = 50.07 \text{ g}$$

Una vez conectado el circuito al detector y la bomba peristáltica, para asentar la resina se dejó pasar 1 volumen (73.63 cm<sup>3</sup>) de agua destilada a través de la columna y, posteriormente, 1 volumen de etanol (EtOH) absoluto. Para terminar, se dejó pasar 2 volúmenes más de agua destilada para eliminar el EtOH restante.

Se preparó un stock de 750 mL a 20 mg/mL a partir del residuo seco de CS160418 y se dejó pasar a través de la columna, recogiéndose en un bote la fracción no retenida (700 mL) y, a continuación, se pasaron 3 volúmenes de agua destilada, con el fin de eliminar los restos de la fracción no retenida que pudieran quedar. Después, la columna se eluyó pasando 100 mL de EtOH absoluto, hasta que el detector mostró una caída en la lectura de absorbancia, indicando que la fracción retenida (FR) había sido eluída por completo. Se obtuvieron 70 mL de FR, que fueron almacenados en un bote. Para terminar, se procedió al lavado de la columna con 3 volúmenes de agua destilada.

La FR se sometió a concentración mediante rotavapor y la eliminación total del disolvente se llevó a cabo mediante *Speedvac* durante 22h. Finalmente se obtuvieron 2.92 g de polvo seco (rendimiento de extracción del 19.44% p/p), al que se le dio el nombre de CS160418-FR. El polvo fue almacenado en un armario de vacío para su posterior uso.



**Figura 7:** Diseño para la cromatografía.

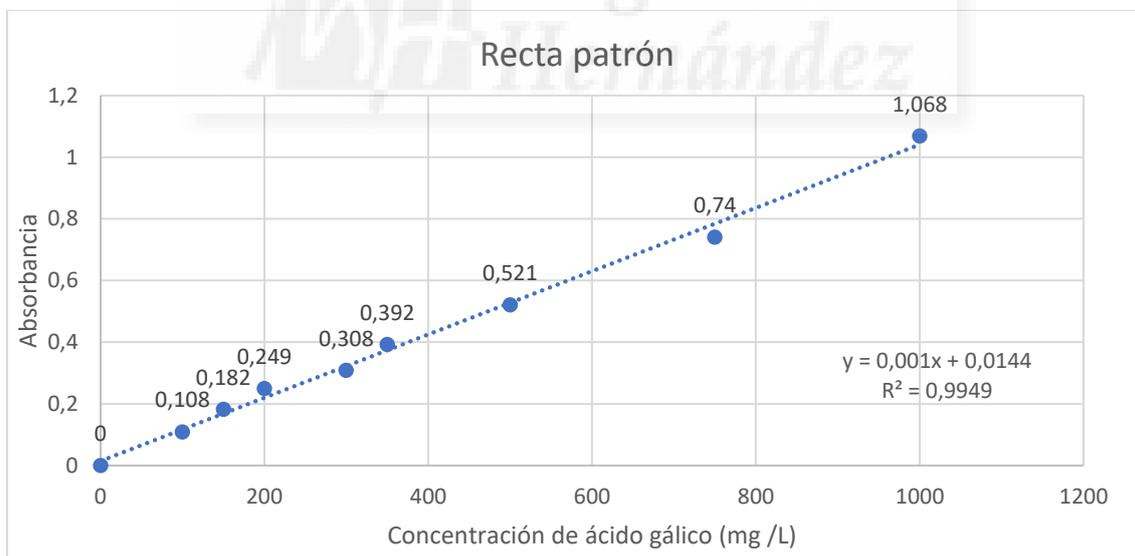
### 3.3 Determinación del contenido polifenólico total

Se preparó un stock a 10 mg/mL en agua de cada uno de los extractos, incluyendo un extracto concentrado en 2011 y almacenado en el laboratorio (CS120911) y se realizó un test colorimétrico basado en el reactivo de Folin-Ciocalteu <sup>49</sup>, que reacciona con los compuestos fenólicos produciendo un color azul, permitiendo estimar el contenido total en polifenoles de cada uno de ellos, siguiendo el protocolo de laboratorio. Para ello, cada extracto contó con 3 replicados en el ensayo a concentraciones de 3 mg/mL, 1.5 mg/mL y 0.75 mg/mL (figura 8). Se prepararon los tubos *ependorf* necesarios con el siguiente contenido en cada uno: 50  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico), 10  $\mu$ L de solución patrón o extracto a la concentración necesaria, 100  $\mu$ L de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro al 20% (p/v), 840  $\mu$ L de agua destilada. Tras agitar, los tubos se dejaron reposar durante 20 min y, a continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de cada uno en el pocillo

correspondiente de la p96. Para la recta patrón se ensayaron concentraciones de ácido gálico de 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.35, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL (figura 9). La medición espectrofotométrica se llevó a cabo a una longitud de onda  $\lambda = 700$  nm en un lector de placas modelo “BMG Spectrostar Omega”.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		0	0.1	0.15	0.2	0.3	0.35	0.5	0.75	1			Recta patrón
B		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 1
C		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 2
D		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 3
E		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 4
F		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 5
G		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 6
H		3	3	3	1.5	1.5	1.5	0.75	0.75	0.75			Ext. 7

**Figura 8:** Esquema de una placa diseñada para el ensayo de Folin-Ciocalteu. Las concentraciones están expresadas en mg/mL



**Figura 9:** Recta de calibrado para el ensayo de Folin.

El ácido gálico (figura 10) es un compuesto fenólico simple, usado por su sencillez como modelo a la hora de calcular el contenido polifenólico total. El resultado se expresa en “proporción de equivalentes de ácido gálico” (% GAE).

Y se obtiene a partir de los datos de absorbancia, mediante los siguientes cálculos:

$$GAE (\mu g) = \frac{Abs - 0.0144}{0.001}$$

$$GAE_{\text{corregido}} (\mu g) = GAE \times \text{Dilución}$$

$$\% GAE_{\text{total}} = \frac{GAE_{\text{Corregido}}}{C_{\text{ext}}} \times 100$$

El cálculo de GAE se realiza a partir de la ecuación de la recta de regresión. El  $GAE_{\text{corregido}}$  se define como el contenido polifenólico en el extracto de partida, y se obtiene multiplicando el resultado de GAE por el factor de dilución a la que se encuentra el contenido del pocillo. El  $\% GAE_{\text{total}}$  es la proporción de polifenoles en el extracto de partida, y se calcula obteniendo el porcentaje de la división del resultado de  $GAE_{\text{corregido}}$  entre la concentración del extracto de partida ( $C_{\text{ext}}$ ), expresada en  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 10:** Estructura del ácido gálico.

### 3.4 Capacidad antimicrobiana de los extractos

Se realizaron antibiogramas mediante el método de microdilución, siguiendo el protocolo de laboratorio previamente publicado <sup>21</sup>, frente a una cepa control de *Escherichia coli* (DH5a competent cells) con cada uno de los extractos, incluyendo un extracto comercial de *P. granatum* enriquecido en punicalina y punicalagina, que sirvió de referencia. Se ensayaron 2 replicados para cada extracto a concentraciones seriadas de 1000  $\mu\text{g/mL}$  a 1.95  $\mu\text{g/mL}$  (figura 11). Cada pocillo contenía 180  $\mu\text{L}$  de medio líquido Müller-Hinton (MH) más extracto

a las concentraciones indicadas y, posteriormente, se inocularon 20  $\mu$ L de la suspensión de bacterias y se dejó incubar en estufa a 37° C durante 20h. En cada placa también se incluyeron un control positivo (180  $\mu$ L de MH y 20  $\mu$ L de inóculo bacteriano) y un control negativo (200  $\mu$ L de MH). Para el cálculo de la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI<sub>50</sub>), o la concentración de extracto que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano, se añadieron 50  $\mu$ L de una disolución acuosa a 1 mg/mL del tinte cloruro de p-yodonitrotetrazolio (INT), el cual confiere un color rojizo en presencia de células viables, al sufrir una transformación a formazán por las deshidrogenasas bacterianas <sup>50</sup>. Se dejó incubar 30 min a T ambiente, y se procedió a realizar una lectura colorimétrica de la placa a una longitud de onda  $\lambda$ = 570 nm, utilizando un lector de placas modelo “BMG Spectrostar Omega”. El blanco de la lectura se realizó mediante una primera medición de absorbancia a  $\lambda$ = 570 nm, previa a la adición del tinte. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante el programa informático *GraphPad 6*.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ext. 1	A	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	Control positivo	Control negativo
	B	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		
Ext. 2	C	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		
	D	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		
Ext. 3	E	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		
	F	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		
Ext. 4	G	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		
	H	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95		

**Figura 11:** Esquema de una p96 preparada para el antibiograma. Las concentraciones de cada pocillo están indicadas en  $\mu$ g/mL.

### 3.5 Ensayos de sinergia

Se realizaron ensayos de sinergia mediante el método de microdilución, en los que se probaron mezclas a distintas concentraciones de el extracto CS160418-FR y cloxacilina, y del extracto PG y cloxacilina frente a 10 aislados clínicos de

SARM. Se realizaron dos replicados para cada una de las mezclas y cepas en placas p96. Para ello, se prepararon todas las mezclas y controles necesarios en placas p96 (figura 12), conteniendo cada pocillo 100  $\mu$ L de las correspondientes diluciones en agua, y se congelaron hasta el momento del ensayo. Se cultivó cada una de las cepas en agar sangre y se dejaron incubar en estufa a 37 °C durante 20 h aproximadamente. A continuación, se prepararon inóculos de cada una de las cepas en suero salino y se usó un lector de McFarland para establecer la concentración deseada de bacteria. En el momento que la lectura alcanza los 0.5 McFarland, se trasvasaron 0.5 mL de esta suspensión a 4.5 mL de medio MH líquido y se procedió a homogeneizar. Una vez preparados los inóculos, se añadieron 100  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en MH a cada uno de los pocillos, exceptuando los correspondientes al control negativo de crecimiento y se dejaron incubar en estufa a 37 °C durante aproximadamente 20h. Transcurrido el tiempo necesario, se añadió a cada pocillo 50  $\mu$ L de la disolución de INT a 1 mg/mL con el fin de visualizar los pocillos en los que existe crecimiento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Control Positivo	Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)	Extracto (MIC <sub>50</sub> /4)	Ext (MIC <sub>50</sub> /4) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								Control Negativo
<b>B</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> /2)	Ext (MIC <sub>50</sub> /4) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								
<b>C</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> /2)	Ext (MIC <sub>50</sub> /2) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								
<b>D</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> )	Ext (MIC <sub>50</sub> /2) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								
<b>E</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> )	Ext (MIC <sub>50</sub> ) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								
<b>F</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> X2)	Ext (MIC <sub>50</sub> ) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								
<b>G</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> X2)	Ext (MIC <sub>50</sub> X2) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								
<b>H</b>			Extracto (MIC <sub>50</sub> X4)	Ext (MIC <sub>50</sub> X2) + Cloxa (8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 $\mu$ g/mL)								

**Figura 12:** p96 con las distintas diluciones de extracto y cloxacilina ensayadas.

Una vez recopilados los datos de crecimiento, se procedió al cálculo del *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI), con el fin de determinar la existencia o no de sinergia. El FICI ha sido interpretado bajo el siguiente criterio <sup>51</sup>: efecto sinérgico si  $FICI \leq 0.5$ ; efecto aditivo si  $0.5 < FICI \leq 1$ ; efecto indiferente si  $1 < FICI < 2$ ; y efecto antagónico si  $FICI \geq 2$ . El cálculo del FICI se lleva a cabo de la siguiente manera:

$$FICI = \frac{C_{cm}}{C_c} + \frac{C_{em}}{C_e}$$

Siendo  $C_{cm}$  la mínima concentración de cloxacilina en la mezcla que inhibe el crecimiento;  $C_{em}$  la mínima concentración de extracto en la mezcla que inhibe el crecimiento;  $C_c$  la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la cloxacilina y  $C_e$  la CMI para el extracto.

#### 4. RESULTADOS

Los resultados para el contenido polifenólico, expresados en equivalentes de ácido gálico (%GAE), para los distintos extractos se representan en la siguiente tabla (tabla 1).

EXTRACTO	%GAE
<b>CS160418</b>	28.80 ± 0.42
<b>CS160418-AB</b>	21.01 ± 2.14
<b>CS260418-ET</b>	17.93 ± 4.27
<b>CS120911</b>	28.01 ± 1.19
<b>CS290518</b>	34.99 ± 0.81
<b>CS290518-US<sub>1</sub></b>	35.01 ± 4.09
<b>CS290518-US<sub>2</sub></b>	30.09 ± 1.34
<b>CS290518-MW<sub>1</sub></b>	26.84 ± 0.84
<b>CS290518-MW<sub>2</sub></b>	33.74 ± 1.93
<b>CS160418-FR</b>	60.05 ± 5.46
<b>PG</b>	35.91 ± 2.55

**Tabla 1:** Tabla en la que se muestra el contenido en polifenoles de cada uno de los extractos.

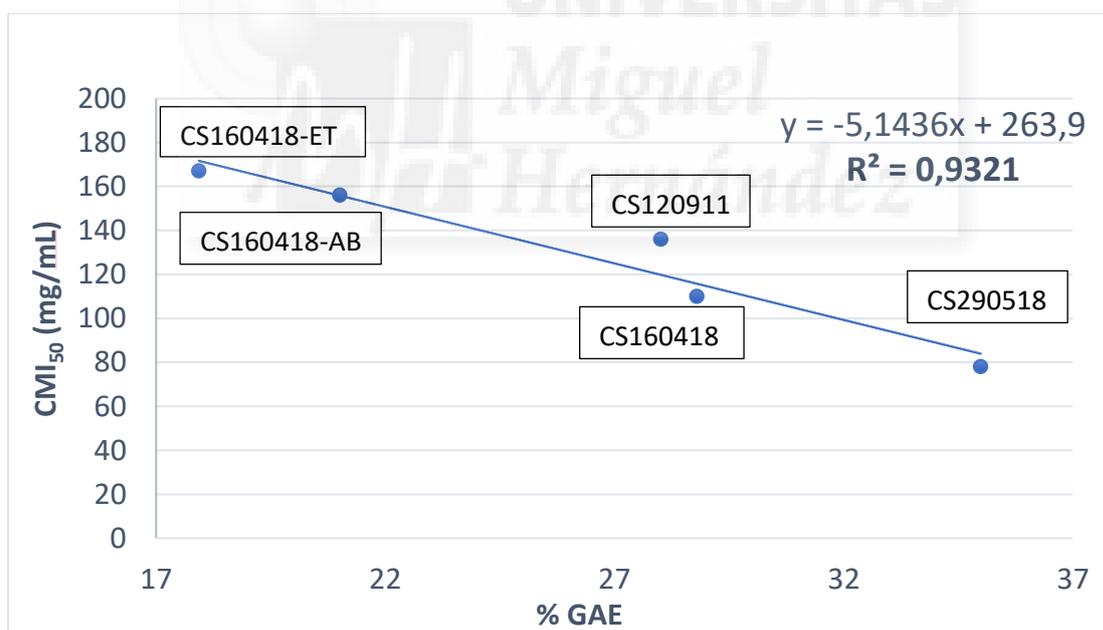
Respecto a la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, los resultados obtenidos para la CMI<sub>50</sub>, expresados en µg/mL, de los extractos ensayados se muestran en la siguiente tabla (tabla 2). Los extractos obtenidos mediante el uso de

microondas y ultrasonidos (MW y US respectivamente en tabla 1), no se ensayaron en esta fase por no aportar una mejora significativa en el contenido de polifenoles totales respecto al extracto obtenido mediante infusión simple (CS290518).

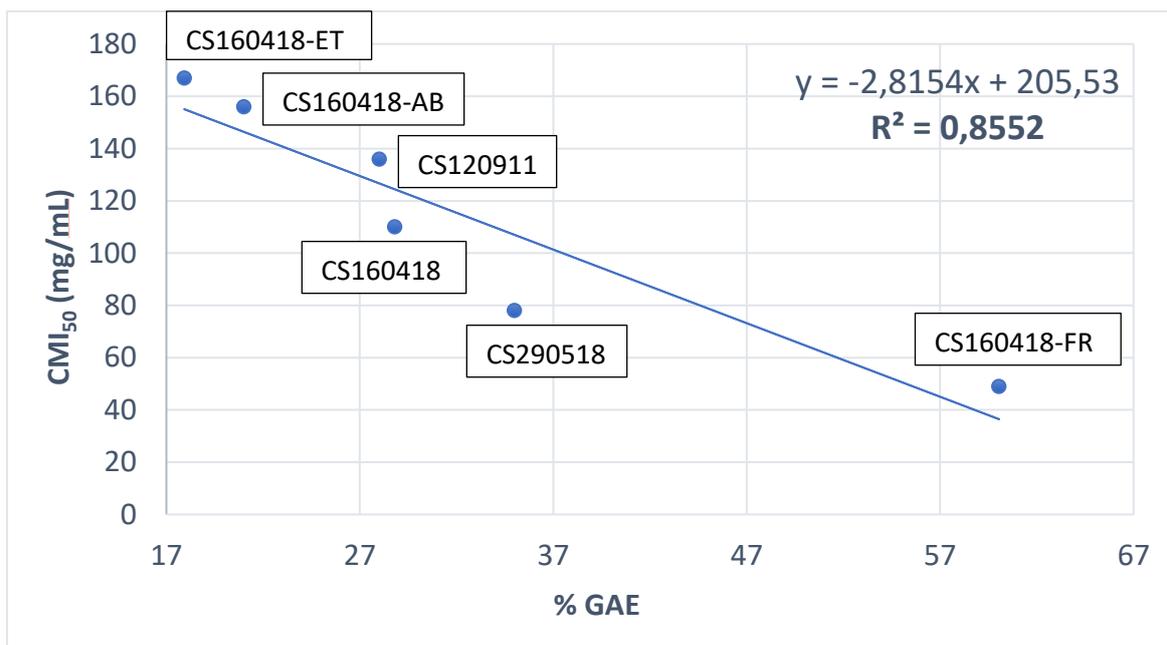
EXTRACTO	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)
CS160418	110 ± 46
CS160418-AB	156 ± 52
CS160418-ET	167 ± 69
CS120911	136 ± 83
CS290518	78 ± 44
CS160418-FR	49 ± 10
PG	19 ± 11

**Tabla 2:** Tabla en la que se muestran los valores de la CMI<sub>50</sub>, frente a *E. coli*, de los distintos extractos.

Atendiendo a la correlación entre el contenido en polifenoles y la actividad antimicrobiana del extracto (figuras 13 y 14), se puede apreciar una relación lineal entre el %GAE y la CMI<sub>50</sub>



**Figura 13:** correlación entre el %GAE de los distintos extractos de cistus y la CMI<sub>50</sub> para *E. coli*, sin incluir el extracto fraccionado (CS160418-FR).



**Figura 14:** Correlación entre el %GAE de los distintos extractos de cistus y la CMI<sub>50</sub>, incluyendo el extracto fraccionado (CS160418-FR).

Los ensayos de sinergia realizados como se detalla en el apartado de metodología, llevados a cabo con las mezclas de extracto CS160418-FR y cloxacilina han mostrado sinergia en un 50% de las cepas, aditividad en el 30% y no han mostrado efecto alguno en el 20%. Las mezclas de extracto PG y cloxacilina, por otro lado, han mostrado efecto sinérgico en el 30% de las cepas, aditividad en el 20%, un posible antagonismo en el 30% y no han mostrado ningún efecto en el 20% (mismas cepas que en el caso de la mezcla con cistus). Los resultados para el FICI se muestran a continuación (tabla 3).

CEPA	FICI	
	CS	PG
C3I3-6832	0.38	0.5*
C3I1-8728	0.75	≥2#
C3I2-9477	0.56	≥2#
C3H9-2933	0.75	0.5
C3I4-7959	0.38*	0.5*
C3F3-4446	N.C.	N.C.
C3F6-0021	0.31*	0.5*
C3F7-9468	0.38*	0.63*
C3F4-4561	0.5*	≥2#
C3F5-4961	N.C.	N.C.

**Tabla 3:** FICI calculado para las mezclas de CS y cloxacilina y PG y cloxacilina frente a las distintas cepas.

En la tabla 3, los valores de FICI que aparecen marcados con un asterisco (\*) no han podido ser calculados de forma exacta, puesto que la bacteria crecía a todas las concentraciones de cloxacilina y/o extracto presente en los controles de crecimiento. Por este motivo, se usó para su cálculo el valor de concentración máximo presente en dichos controles, de modo que el valor real del FICI es menor que el calculado. Los casos que han mostrado un FICI  $\geq 2$  (antagonismo), marcados con el símbolo # en la tabla 3, tampoco han podido ser calculados con exactitud, debido que la bacteria crecía en todas las mezclas de extracto+cloxacilina, incluyendo aquéllas que presentaban una concentración de cloxacilina superior o igual a la CMI de la misma. Del mismo modo, en algunos casos, no fue posible realizar un cálculo de los valores (marcado como no calculado N.C. en la tabla 3). Esto fue debido a que en esos casos la bacteria crecía a cualquier concentración tanto de cloxacilina y/o extracto como de las sus mezclas.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Contenido en polifenoles y capacidad antimicrobiana

Como se observa en los resultados anteriores, los extractos que mejor relación han mostrado entre la simplicidad del método de extracción y el contenido final

en polifenoles son aquéllos preparados mediante extracción convencional (CS160418 y CS290518), el extracto fraccionado (CS160418-FR) y el extracto de granada (PG). Por tanto, el mejor método de extracción parece ser la extracción convencional, siguiendo el método referenciado anteriormente. El uso de hoja fresca ha resultado una mejor opción frente a la hoja seca, probablemente por la degradación de compuestos fenólicos durante el secado. Por último, el uso de ultrasonidos o microondas no parece incrementar significativamente el rendimiento de extracción, en cuanto al contenido polifenólico final.

En lo referente a la correlación entre el contenido en polifenoles y la actividad antimicrobiana los resultados muestran que, efectivamente, cuanto mayor es la fracción polifenólica en el extracto, mayor es el efecto antimicrobiano del mismo; existiendo una relación lineal entre ambos. No obstante, se puede observar que la correlación es menor de lo esperado al añadir los datos del extracto fraccionado (160418-FR). Es posible que esto se deba a la existencia de mecanismos de acción saturables y/o a que el fraccionamiento podría estar seleccionando ciertos compuestos fenólicos frente a otros, modificando el efecto final.

Estos resultados concuerdan con otros estudios, que han mostrado que los métodos de extracción y secado pueden afectar en gran medida al contenido en polifenoles y la actividad antimicrobiana de los extractos <sup>22</sup>. En lo respectivo a la actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, un estudio previo ha mostrado que el método de extracción que consigue la máxima actividad antibacteriana es también la infusión simple, pero en este caso utilizando una mezcla hidroalcohólica seguida de secado mediante spray-dryer <sup>22</sup>, proceso muy similar al estudiado en el presente trabajo.

Respecto a los estudios de sinergia, según los resultados obtenidos el extracto de cistus parece ser más adecuado frente a SARM que el extracto de granada, ya que presenta un porcentaje mayor de cepas en las cuales se obtiene resultados de sinergia entre el extracto y la cloxacilina. La existencia de sinergia hace que cepas que antes eran resistentes al antibiótico, se vuelvan sensibles al

mismo en presencia del extracto, y por lo tanto revirtiendo, al menos en parte, la resistencia del microorganismo. Esto podría significar un avance en cuanto al tratamiento de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes y concretamente frente a cepas de SARM, ya que si se logra una aplicación práctica de estos extractos o de algunos de sus componentes, consiguiendo revertir estas resistencias, se podría seguir utilizando los antibióticos ya disponibles (generalmente más baratos y de menor toxicidad para el ser humano) que han quedado obsoletos, facilitando el tratamiento y mejorando el pronóstico de la enfermedad. Esto conllevaría una reducción de la morbilidad asociada a estas infecciones, suponiendo también un gran ahorro en el gasto sanitario. A pesar de que se necesita seguir desarrollando más estudios en este ámbito, los datos recogidos parecen prometedores.

Estos resultados concuerdan con estudios previos, que muestran que el extracto acuoso de *C. salviifolius* secado mediante spray-dryer es el que ofrece una mejor inhibición del crecimiento en *S. aureus* <sup>22</sup>. Además, otro estudio ha mostrado que algunos de los polifenoles contenidos en los extractos de *C. salviifolius* presentan un potente efecto sinérgico entre ellos, lo que podría explicar que con el aumento de la fracción polifenólica del extracto, el efecto sinérgico sea también mayor <sup>33</sup>.

## **5.2 Limitaciones del estudio**

Algunos de los cálculos del FICI no han podido ser llevados a cabo con total exactitud debido a la variabilidad en la resistencia de los distintos aislados clínicos ensayados, de modo que algunos crecían a todas las concentraciones de antibiótico y/o extracto presente en los controles. Para obtener conclusiones de mayor peso sería necesario realizar el ensayo en un mayor número de cepas, así como aumentar el rango de concentraciones de los controles y las mezclas de cloxacilina y extracto presentes en las placas, de modo que se pueda calcular el FICI de una forma más exacta.

### 5.3 Perspectiva de futuro

Los resultados del estudio parecen prometedores, por lo que resultaría interesante seguir desarrollando investigación en este campo. Algunos de los objetivos a desarrollar en un corto plazo son:

- Caracterización de los extractos: mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas, con el fin de determinar qué compuesto o compuestos son los mayores responsables de esta actividad.
- Estudio en otras especies microbianas de interés clínico.
- Estudio en más cepas clínicas de SARM y ampliación de las concentraciones a estudio.
- Aplicación práctica: búsqueda de una posible aplicación, para lo que será necesario el desarrollo de diversos estudios sobre posibles vías de administración o aplicación; forma farmacéutica adecuada para su uso; toxicidad, etc.

### 6. CONCLUSIONES

- La extracción convencional ha resultado el mejor método para la obtención de extractos polifenólicos a partir de *C. Salviifolius*.
- Cuando este extracto es purificado mediante resinas de afinidad, se obtienen los mejores resultados de contenido polifenólico y actividad antimicrobiana.
- Existe una correlación evidente entre el contenido en polifenoles del extracto y la actividad antimicrobiana del mismo.
- El extracto de *C. salviifolius* cistus ha mostrado un mejor efecto frente a SARM en los ensayos de sinergia que el extracto de granada.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al personal del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) por permitirme desarrollar este proyecto en un ambiente de trabajo inmejorable y, en especial, a mi tutor, Enrique Barraón y a Javier Álvarez por su ayuda y apoyo constantes.

Agradecer también al personal del Servicio de Microbiología del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) y, particularmente, a Juan Carlos Rodríguez, por darme todas las facilidades posibles para desarrollar mi trabajo.

Para terminar, a mis padres y hermano, a mi pareja, Marina y a mis amigos por todo su apoyo. A Cris, Mari, Roberto, Ana, Ari, Ricardo, Belén, Lou y tantos otros que dejo sin nombrar. Muchas gracias por haber confiado en mí y por ser un soporte tan grande.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lee C-R, Cho I, Jeong B, Lee S. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12 de septiembre de 2013;10(9):4274-305.
2. McCarthy M. Number of agents being developed to combat drug resistant bacteria is «alarmingly low,» warns report. *BMJ*. 19 de abril de 2013;346(apr19 2):f2548-f2548.
3. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*. enero de 2016;387(10014):176-87.
4. Lindsay JA. Hospital-associated MRSA and antibiotic resistance—What have we learned from genomics? *International Journal of Medical Microbiology*. agosto de 2013;303(6-7):318-23.
5. Palavecino EL. Clinical, Epidemiologic, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. En: Ji Y, editor. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2014. p. 1-24.
6. Lim D, Strynadka NCJ. Structural basis for the  $\beta$  lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*. 21 de octubre de 2002;9:870.
7. Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A. Complementation of the Essential Peptidoglycan Transpeptidase Function of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) by the Drug Resistance Protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 15 de noviembre de 2001;183(22):6525-31.
8. Chatterjee SS, Chen L, Gilbert A, da Costa TM, Nair V, Datta SK, et al. PBP4 Mediates  $\beta$ -Lactam Resistance by Altered Function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. noviembre de 2017;61(11).
9. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016. 2017.
10. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 25 de marzo de 2016;79(3):629-61.
11. Wink M, Ashour ML, El-Readi MZ. Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3.

12. Lamming DW, Wood JG, Sinclair DA. Small molecules that regulate lifespan: evidence for xenohormesis. *Molecular Microbiology*. 16 de julio de 2004;53(4):1003-9.
13. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 14 de junio de 2001;411(6839):843-7.
14. Barraji3n-Catal3n E, Herranz-L3pez M, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Men3ndez JA, et al. Molecular Promiscuity of Plant Polyphenols in the Management of Age-Related Diseases: Far Beyond Their Antioxidant Properties. En: Camps J, editor. *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases - Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics*. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 141-59.
15. Gertsch J. Botanical Drugs, Synergy, and Network Pharmacology: Forth and Back to Intelligent Mixtures. *Planta Medica*. julio de 2011;77(11):1086-98.
16. Qin C, Tan KL, Zhang CL, Tan CY, Chen YZ, Jiang YY. What Does It Take to Synergistically Combine Sub-Potent Natural Products into Drug-Level Potent Combinations? Sem DS, editor. *PLoS ONE*. 28 de noviembre de 2012;7(11):e49969.
17. Alvarez-Martinez FJ, Barrajon-Catalan E, Encinar JA, Rodriguez-Diaz JC, Micol V. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: a Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry*. 8 de octubre de 2018;25.
18. de Camargo AC, Regitano-d'Arce MAB, Rasesa GB, Canniatti-Brazaca SG, do Prado-Silva L, Alvarenga VO, et al. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. *Food Chemistry*. diciembre de 2017;237:538-44.
19. Engels C, Schieber A, G3nzle MG. Inhibitory Spectra and Modes of Antimicrobial Action of Gallotannins from Mango Kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 1 de abril de 2011;77(7):2215-23.
20. Garcia-Mu3oz C, Vaillant F. Metabolic Fate of Ellagitannins: Implications for Health, and Research Perspectives for Innovative Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2 de diciembre de 2014;54(12):1584-98.
21. Barraji3n-Catal3n E, Fern3ndez-Arroyo S, Saura D, Guill3n E, Fern3ndez-Guti3rrez A, Segura-Carretero A, et al. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. agosto de 2010;48(8-9):2273-82.

22. Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barrajon-Catalán E, Roldán-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food and Chemical Toxicology*. mayo de 2013;55:313-22.
23. Kusuda M, Inada K, Ogawa T-O, Yoshida T, Shiota S, Tsuchiya T, et al. Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biosci Biotechnol Biochem*. junio de 2006;70(6):1423-31.
24. Bazzaz BSF, Sarabandi S, Khameneh B, Hosseinzadeh H. Effect of Catechins, Green tea Extract and Methylxanthines in Combination with Gentamicin Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* - Combination therapy against resistant bacteria -. *Journal of Pharmacopuncture*. 31 de diciembre de 2016;19(4):312-8.
25. Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa T, Shiota S, Tsuchiya T, et al. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. septiembre de 2005;66(17):2047-55.
26. Lacombe A, Wu VCH, Tyler S, Edwards K. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 30 de abril de 2010;139(1-2):102-7.
27. Mokhtar M, Ginestra G, Youcefi F, Filocamo A, Bisignano C, Riazi A. Antimicrobial Activity of Selected Polyphenols and Capsaicinoids Identified in Pepper (*Capsicum annum* L.) and Their Possible Mode of Interaction. *Current Microbiology*. noviembre de 2017;74(11):1253-60.
28. Zhang Y, Wang J, Dong J, Wei J, Wang Y, Dai X, et al. Inhibition of  $\alpha$ -toxin production by subinhibitory concentrations of naringenin controls *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Fitoterapia*. abril de 2013;86:92-9.
29. Su Y, Ma L, Wen Y, Wang H, Zhang S. Studies of the in Vitro Antibacterial Activities of Several Polyphenols against Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 19 de agosto de 2014;19(8):12630-9.
30. Sato Y, Suzuki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. octubre de 2000;72(3):483-8.
31. Laporta O, Funes L, Garzón MT, Villalaín J, Micol V. Role of membranes on the antibacterial and anti-inflammatory activities of the bioactive compounds from *Hypoxis rooperi* corm extract. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. noviembre de 2007;467(1):119-31.

32. Munyendo WLL, Orwa JA, Rukunga GM, Bii CC. Bacteriostatic and Bactericidal Activities of *Aspilia mossambicensis*, *Ocimum gratissimum* and *Toddalia asiatica* Extracts on Selected Pathogenic Bacteria. *Research Journal of Medicinal Plant*. 1 de junio de 2011;5(6):717-27.
33. Tomás-Menor L, Barraón-Catalán E, Segura-Carretero A, Martí N, Saura D, Menéndez JA, et al. The Promiscuous and Synergic Molecular Interaction of Polyphenols in Bactericidal Activity: An Opportunity to Improve the Performance of Antibiotics? *Phytotherapy Research*. marzo de 2015;29(3):466-73.
34. Howell AB, D'Souza DH. The Pomegranate: Effects on Bacteria and Viruses That Influence Human Health. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1-11.
35. Braga LC, Leite AA., Xavier KG., Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Canadian Journal of Microbiology*. julio de 2005;51(7):541-7.
36. Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA. Antibacterial Activity Directed Isolation of Compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*. noviembre de 2007;72(9):M341-5.
37. Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. septiembre de 2013;12(5):483-508.
38. Lambert RJ, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. septiembre de 2001;91(3):453-62.
39. Nakayama M, Shimatani K, Ozawa T, Shigemune N, Tomiyama D, Yui K, et al. Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 4 de mayo de 2015;79(5):845-54.
40. Bernal P, Lemaire S, Pinho MG, Mobashery S, Hinds J, Taylor PW. Insertion of Epicatechin Gallate into the Cytoplasmic Membrane of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Disrupts Penicillin-binding Protein (PBP) 2a-mediated  $\beta$ -Lactam Resistance by Delocalizing PBP2. *Journal of Biological Chemistry*. 30 de julio de 2010;285(31):24055-65.
41. Santiago C, Pang EL, Lim K-H, Loh H-S, Ting KN. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from *Duabanga grandiflora*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. diciembre de 2015;15(1).

42. Mandal SM, Dias RO, Franco OL. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. *Journal of Medicinal Food*. octubre de 2017;20(10):1031-8.
43. Lin R-D, Chin Y-P, Hou W-C, Lee M-H. The Effects of Antibiotics Combined with Natural Polyphenols against Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Medica*. junio de 2008;74(08):840-6.
44. Favela-Hernández J, Clemente-Soto A, Balderas-Rentería I, Garza-González E, Camacho-Corona M. Potential Mechanism of Action of 3'-Demethoxy-6-O-demethyl-isoguaiacin on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 8 de julio de 2015;20(7):12450-8.
45. Kim SY, Kim J, Jeong S-I, Jahng KY, Yu K-Y. Antimicrobial Effects and Resistant Regulation of Magnolol and Honokiol on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 2015;2015:1-9.
46. Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. enero de 1987;26(8):2231-4.
47. Dias-Souza MV, dos Santos RM, Cerávolo IP, Cosenza G, Ferreira Marçal PH, Figueiredo FJB. Euterpe oleracea pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs. *Microbial Pathogenesis*. enero de 2018;114:29-35.
48. Macé S, Truelstrup Hansen L, Rupasinghe HPV. Anti-Bacterial Activity of Phenolic Compounds against *Streptococcus pyogenes*. *Medicines*. 1 de mayo de 2017;4(2):25.
49. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. abril de 2007;2(4):875-7.
50. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. abril de 2016;6(2):71-9.
51. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. *Clin Microbiol Infect*. septiembre de 2000;6(9):503-8.