



FACULTAD DE FARMACIA

Grado en Farmacia

Actividad antimicrobiana de compuestos de origen natural y su aplicación en la industria cosmética

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2019

Autor: Maribel Piqueres Sánchez
Modalidad: Experimental
Tutor/es: Enrique Barraión Catalán
Francisco Javier Álvarez Martínez



ÍNDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Los parabenos en la sociedad	4
1.2. Problemática de las resistencias bacterianas	7
1.3. Extractos botánicos como fuente de biomoléculas activas	8
1.4. Extractos marinos	11
1.5. Dianas moleculares de los extractos.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. Selección y obtención de los microorganismos.....	15
3.2. Selección y obtención del parabeno	15
3.3. Extractos utilizados	16
3.4. Método Kirby-Bauer de difusión en agar.....	16
3.5. Antimicrobianos en placa de 96 pocillos	18
3.6. Sinergia entre extractos y parabenos.....	20
3.7. Diagrama resumen.....	22
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Optimización de los ensayos.....	23
4.2. Antibiograma mediante el método Kirby-Bauer.....	24
4.3. Resultados antibiogramas en placa de 96 pocillos	28
4.4. Resultados sinergia en Kirby-Bauer.....	31
4.5. Resultados sinergia en placa 96	32
5.- CONCLUSIÓN	35
6.- PROYECCIÓN FUTURA	36
7.- AGRADECIMIENTOS	36
8.- BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

En la actualidad, el auge de las bacterias resistentes a antibióticos supone una amenaza para la salud humana a nivel mundial. Además de en la clínica, se están hallando resistencias bacterianas frente a los conservantes usados en los productos cosméticos y de cuidado diario. Este hecho, unido a la controversia social que suscitan algunos conservantes como los parabenos, respecto a su uso y seguridad, hace que sea necesaria la búsqueda de nuevos agentes conservantes alternativos. Existen referencias de extractos botánicos con gran actividad antimicrobiana como son los extractos de *Cistus salviifolius* (CS) y el extracto de piel de fruto de *Punica granatum* (GP), los cuales han sido utilizados en el presente trabajo.

El objetivo de este trabajo es la realización de un primer cribado para evaluar la capacidad antimicrobiana de cuatro extractos (CS, GP, uno derivado de cereza y uno obtenido a partir de un invertebrado marino) frente a 3 especies bacterianas (1 grampositiva y 2 gramnegativas) mediante el método Kirby-Bauer. Después, obtener la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀) de los extractos mediante el método de microdilución en placa de 96 pocillos. Finalmente, comprobar si existe sinergia entre alguno de los extractos botánicos con mejor actividad y el conservante metilparabeno, o incluso si éste último pudiera ser sustituido completamente por el extracto botánico.

Los resultados muestran que los extractos derivados de la cereza y el extracto marino no tienen efecto antimicrobiano, por el contrario sí se obtienen buenos resultados en los extractos GP y CS. Ambos parecen más eficaces frente a las bacterias gramnegativas probadas que frente a la grampositiva. En cuanto a los ensayos de sinergia, se observó en el método de Kirby-Bauer una deformación en los halos de inhibición de GP con el metilparabeno y por el método de microdilución también mostró valores de absorbancias menor o parecidas a la CMI₅₀ de varios compuestos. Aunque es necesario optimizar ambas técnicas para un resultado más concluyente, los resultados sugieren un efecto sinérgico entre los extractos y el metilparabeno.

Palabras clave: *Cistus salviifolius*, *Punica granatum*, parabeno, antimicrobiano, sinergia, conservante.

ABSTRACT

Currently, the rise of antibiotic-resistant bacteria poses a threat to human health worldwide. In addition to the clinic, bacterial resistance against preservatives used in cosmetics and daily care products is being found. This fact, together with the social controversy raised by some preservatives such as parabens, regarding their use and safety, makes it necessary to search for new alternative preservatives. There are references to botanical extracts with great antimicrobial activity such as the extracts of *Cistus salviifolius* (CS) and the fruit skin extract of *Punica granatum* (GP), which have been used in the present work.

The objective of this work is the realization of a first screening to evaluate the antimicrobial capacity of four extracts (CS, GP, one from cherry and one obtained from a marine invertebrate) against 3 bacterial species (1 grampositive and 2 gramnegative) by the Kirby-Bauer method. Then, obtain the minimum inhibitory concentration 50 (MIC₅₀) of the extracts by the 96-well plate microdilution method. Finally, check if there is synergy between any of the botanical extracts with better activity and the preservative methylparaben, or even if the latter could be completely replaced by the botanical extract.

The results show that the extracts derived from the cherry and the marine extract have no antimicrobial effect, on the contrary, good results are obtained in the GP and CS extracts. Both seem more effective against the gramnegative bacteria tested than against the gram-positive. Regarding the synergy assays, a deformation of the GP inhibition haloes with methylparaben was observed in the Kirby-Bauer method and by the microdilution method also showed absorbance values lower or similar to the MIC₅₀ of several compounds. Although it is necessary to optimize both techniques for a more conclusive result, the obtained results suggest a synergistic effect between the extracts and methylparaben.

Keywords: *Cistus salviifolius*, *Punica granatum*, paraben, antimicrobial, synergy, preservative.

1. Introducción

1.1. Los parabenos en la sociedad

Desde la antigüedad, el ser humano se ha preocupado por su aspecto físico y por conservar su juventud; por ello la industria cosmética y los productos de cuidado diario son un sector dinámico y competitivo con un gran impacto económico mundial. En la actualidad, el consumidor ha generado un mercado mucho más crítico en el que además de tener importancia la efectividad del producto, posee una gran relevancia su calidad, tanto en sus propiedades organolépticas - como textura u olor - como en su composición química. Los compuestos químicos más controvertidos a pie de calle son los conservantes, y entre ellos, preocupan especialmente los parabenos. Aunque su presencia en cosméticos siempre ha estado regulada por parte de las organizaciones internacionales, actualmente la preocupación social es tal, que incluso se está planteando volver a confirmar la seguridad de los parabenos⁽¹⁾ y cada vez es más habitual encontrar productos con la publicidad “libre de parabenos”.

El agua y nutrientes presentes en los cosméticos crean un ambiente propicio que los hace susceptibles al desarrollo de microorganismos y hace necesaria la inclusión en las formulaciones de ingredientes con actividad conservante. Éstos se usan para proteger, tanto de una contaminación debida a un origen interno proveniente del almacenamiento o las materias primas utilizadas; como de una contaminación externa durante el proceso de uso por el consumidor durante la vida del cosmético. De entre todos los conservantes empleados en cosmética, una de las familias empleadas es la de los parabenos (Figura 1). Estas sustancias químicas pertenecen a la familia de los ésteres sintéticos derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico y actúan alterando el potencial eléctrico de membrana y permeabilidad del agente microbiológico, bloqueando así la generación de energía y la pérdida de su transporte, imposibilitando su crecimiento y propagación.

Es bien conocido, que los parabenos son moléculas estrogénicas⁽²⁾. Sin embargo, al ejercer una actividad más débil que los estrógenos naturales, implican un riesgo despreciable para la salud humana y son considerados por todas las agencias reguladoras como seguros. No obstante, los cambios de vida

han llevado a la sociedad a estar expuesta diariamente a gran cantidad de parabenos por vía tópica, siendo la piel un área de superficie corporal muy extensa con un porcentaje de absorción elevado, alrededor del 50 - 70 %. De esta manera, es difícil evaluar el riesgo acumulativo de las diferentes concentraciones y mezclas de conservantes, que puedan así interferir en la homeostasis cuerpo humano.

Hay dos tipos de parabenos, los parabenos de origen natural, también llamados orgánicos, metabolizados de forma natural y que se encuentran en alimentos como los arándanos, y los parabenos sintéticos. En la figura 1, se muestra la estructura de los principales parabenos sintéticos, que son los empleados como conservantes en los productos cosméticos. Estos compuestos se diferencian entre sí por la longitud y tipo de su cadena de alquilo, la cual es característica de cada uno. La afinidad de estos compuestos por el receptor estrogénico es mayor conforme aumenta la longitud la cadena de alquilo⁽³⁾. Cabe destacar que en cosmética solo se usan los parabenos de cadena corta, con menor efecto estrogénico.

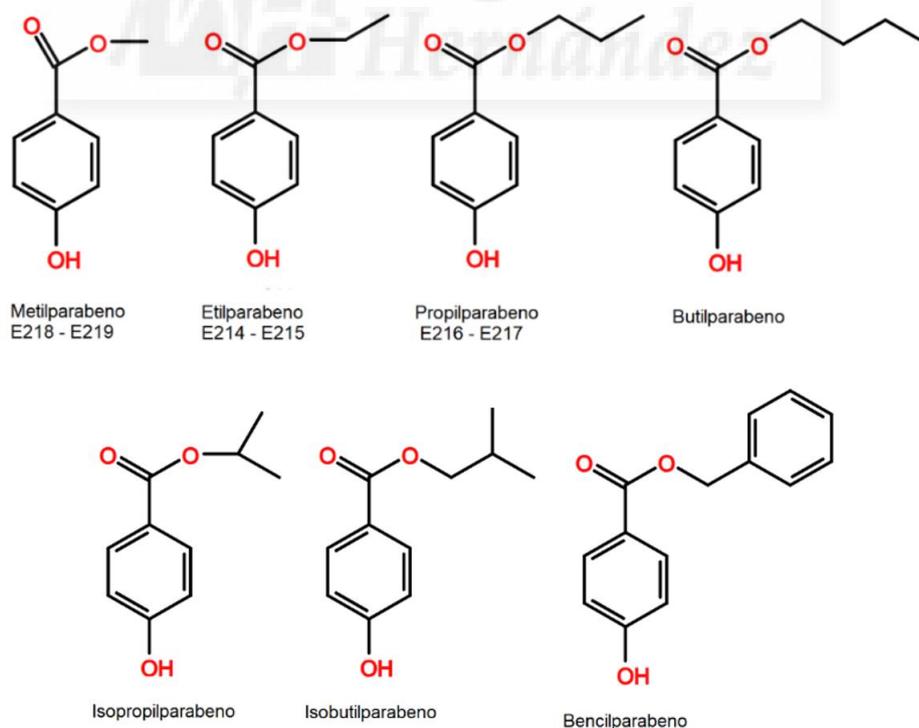


Figura 1. Estructura de los compuestos que engloban la familia de parabenos sintéticos. De izquierda a derecha aumenta la actividad antimicrobiana con el aumento de la cadena de alquilo. Los códigos E se corresponden con sus abreviaturas como conservantes. **Fuente:** Web comercial de la casa Sigma-Aldrich.

La absorción de metil, etil y propilparabeno a través de la piel, tras una administración estándar de 2 mg/cm², está entorno al 60, 40 y 20 %, respectivamente de la dosis inicial aplicada. Estos resultados se han obtenido en diversos estudios en población general, 8 h después de la aplicación tópica e independientemente de la formulación con la que se haya realizado la crema y llegando a proporcionar unos niveles medios de 9,4 mg/mL de metilparabeno en plasma⁽³⁾. A pesar de estos datos, es necesario que futuros trabajos aborden la evaluación del efecto de estas concentraciones en las cohortes humanas sensibles al estrógeno y en niños donde un sistema inmune más débil puede hacer que ciertos compuestos actúen como disruptores endocrinos.

El Comité Científico sobre Seguridad del Consumidor de la Unión Europea (SCCS) formado por un grupo de expertos sanitarios de diferentes campos y libre de conflictos de intereses, afirmó en 2010 que no hay estudios de absorción dérmica y toxicocinética apropiados para poder evaluar correctamente un vínculo entre la absorción de parabenos y la alteración endocrina en animales y humanos. Por ello, la Unión Europea⁽⁴⁾ establece concentraciones máximas de 0,4 % (p/p) para cada parabeno individual y un límite de 0,8 % (p/p) para los parabenos totales en productos comerciales. En 2011, las concentraciones máximas autorizadas por la UE en cosméticos para la suma de las concentraciones individuales de butilparabeno y propilparabeno se redujo para no exceder el 0,19 %.

El Cosmetic Ingredient Review (CIR) de Estados Unidos, organización equivalente al SCCS europeo, después de evaluar todos los estudios hasta la fecha sobre parabenos llegaron a la conclusión de que son seguros y de que no hay una correlación entre su hallazgo en tejido mamario y cáncer de mama. De hecho, en este país no existe ningún tipo de restricción hacia los parabenos, pero los fabricantes de cosméticos están empezando a buscar conservantes alternativos debido a la presión social y en consonancia con el mercado europeo.

1.2. Problemática de las resistencias bacterianas

Existen hasta 4 niveles de riesgo microbiológico según la probabilidad y capacidad de una bacteria para infectar al manipulador individual o a la población, siendo el nivel 4 el más elevado en bioseguridad, y el nivel 1 el de menor riesgo. En los test de calidad⁽⁵⁾ que se realizan a los cosméticos, cada vez se incluyen un mayor número de bacterias contaminantes debido a que presentan resistencias por los diferentes conservantes usados⁽⁶⁾. Un caso de ello reciente es *Enterobacter gergoviae*, que ha pasado a ser considerado un microorganismo de riesgo 1 a 2, en muy poco tiempo, por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se ha demostrado que este microorganismo ha creado una resistencia innata a los conservantes usados hasta ahora⁽⁷⁾, debido a la producción de una enzima en su membrana llamada PrbA que ejerce un mecanismo de salida del compuesto hacia el exterior de la célula sin que llegue a actuar en la diana. Se ha comprobado que este hecho ocurre a una concentración de los conservantes incluso más alta que las concentraciones máximas permitidas por la Comisión Europea (CE). Algunos de los conservantes frente a los cuales este microorganismo ha desarrollado resistencia fueron los formaldehidos-donantes como diazolidinilurea, imidazolidinilurea, cuaternio-15, hidroximetilglicinato de sodio e hidantoína DMDM. Este hecho además va acompañado de una mayor tolerancia hacia grupos de antibióticos como los β -lactámicos, tetraciclinas y ciprofloxacino. Estos resultados también se han obtenido con otras especies como *Pseudomonas putida* o *Burkholderia cepacia*⁽⁸⁾.

El problema de las bacterias multirresistentes a fármacos también ha afectado en gran medida al mundo de la cosmética. Es necesario conocer y entender el mecanismo de resistencia que desarrollan los microorganismos ante los conservantes para poder buscar nuevos compuestos eficaces y que no permitan desarrollar resistencia cruzada a los antibióticos, o hacia otros grupos de conservantes; ya que se ha comprobado que la susceptibilidad de las bacterias por estos compuestos ha disminuido en las últimas décadas. En la actualidad, este hecho representa una gran amenaza⁽⁹⁾ debido a que hay diferentes cepas bacterianas multirresistentes a antibióticos para las cuáles no hay un tratamiento eficaz y seguro. Además, en los últimos años se ha producido un pronunciado descenso en el hallazgo de nuevos conservantes o estrategias para sortear las resistencias existentes, lo cual podría agravar el problema.

1.3. Extractos botánicos como fuente de biomoléculas activas

El grupo de investigación de Compuestos Bioactivos Naturales (CBN) del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), lleva años estudiando diferentes tipos de plantas que han demostrado ser una importante fuente de moléculas bioactivas con variedad de efectos biológicos al actuar como ligandos en múltiples dianas moleculares. Los extractos vegetales son en sí mismos mezclas complejas y variadas de diferentes compuestos bioactivos, lo que les aporta una gran ventaja frente a las posibles resistencias que pueda provocar un microorganismo hacia los extractos. En el campo de la actividad antimicrobiana, el grupo ha obtenido resultados especialmente interesantes con los extractos obtenidos a partir de la familia botánica *Cistaceae*. Los extractos obtenidos a partir de plantas de esta familia han mostrado una potente capacidad antimicrobiana en diferentes cepas microbianas⁽¹⁰⁾. De entre estos extractos, cabe destacar el obtenido a partir de la especie *C. salviifolius*^(11, 12).

Cistus salviifolius es un arbusto típico del ecosistema semi-árido mediterráneo de hoja perenne y muy valorado al ser una especie pionera en la recuperación de suelos degradados, como el en caso de incendios forestales.

Tradicionalmente, se han utilizado sus aceites esenciales o en infusión para remedios con efecto anti-inflamatorio o sedativo.

También se ha comprobado el efecto de extractos procedente de la piel, zumo u otros subproductos de la granada, mostrando una elevada actividad ante bacterias grampositivas y gramnegativas^(9, 13, 14). El granado (*Punica granatum*), es el árbol cuyo fruto es la granada. Es un árbol frutal de porte mediano y ampliamente distribuido por la ribera mediterránea. Es un árbol de hoja caduca y sus frutos y extractos han mostrado otras propiedades biológicas como diurético y restaurador electrolítico debido a su alto contenido en sales minerales.

Los extractos de *C. salviifolius* y granada han sido caracterizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS/MS) y han presentado un abundante contenido en diferentes compuestos polifenólicos, los cuáles poseen numerosas referencias acerca de su actividad antimicrobiana⁽¹⁰⁾. Por un lado, se ha comprobado que un aumento del contenido de polifenoles en los extractos va asociado a un aumento en la actividad antimicrobiana frente a varias especies de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas. Por otro lado, conocer la composición de los extractos botánicos es importante porque existe sinergia entre diferentes clases de polifenoles, lo que incrementa la actividad biológica de las mezclas de estos.



Figura 2. En la imagen de la izquierda se muestran ejemplares de *Cistus salviifolius*, obtenida en la Universidad Miguel Hernández de Elche. En la

derecha se observa la granada, el fruto de *Punica granatum*. **Fuente:** Izquierda: fuente propia. Derecha: www.commons.wikimedia.org.

Los polifenoles son un grupo de compuestos que nacen como resultado del metabolismo secundario de las plantas. En la figura 3 se muestran las principales familias de compuestos que engloban este grupo. Entre ellos tienen en común la presencia de dos o más grupos fenólicos y suelen encontrarse en la naturaleza unidos a un azúcar, formando heterósidos solubles en agua

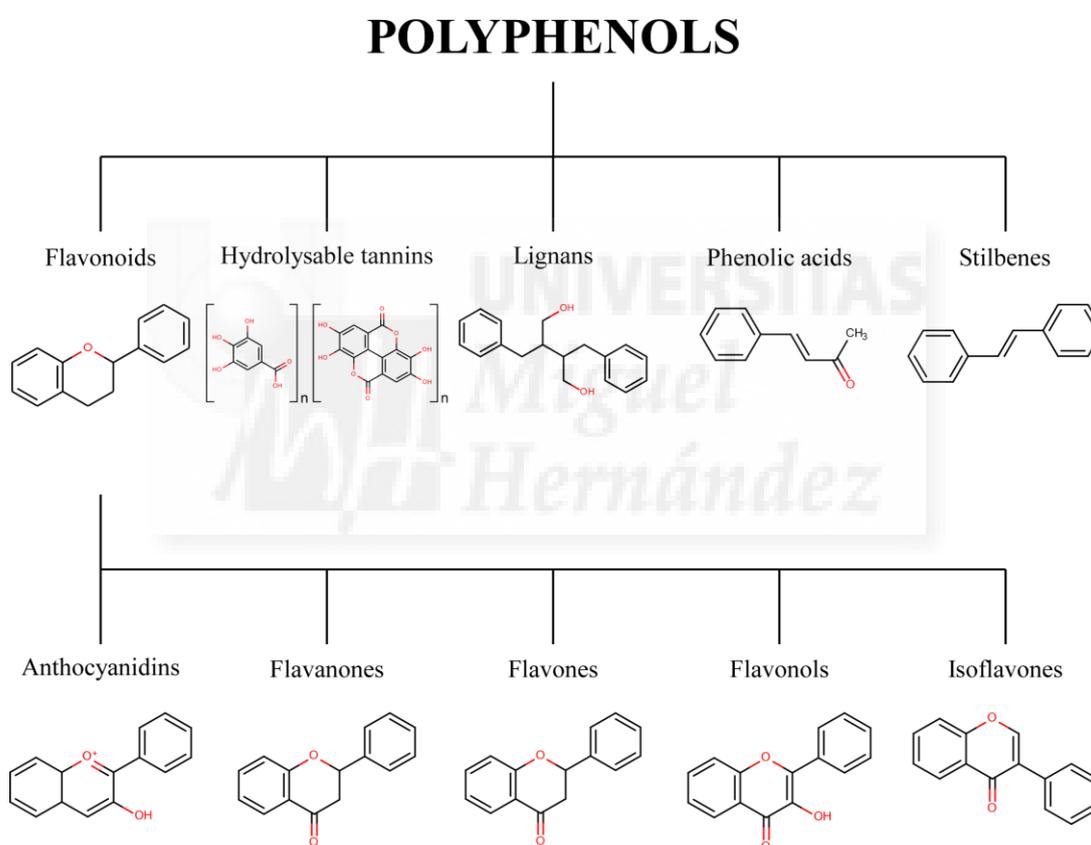


Figura 3. Familias de compuestos que engloban los polifenoles presentes en los extractos botánicos. **Fuente:** Referencia bibliográfica número 12.

Una de las familias de polifenoles que mayoritariamente se han hallado en los extractos de CS y GP son los taninos no hidrolizables como los

elagitaninos, que han demostrado tener efecto antibiótico a concentraciones micromolares⁽¹⁵⁾, siendo sobre todo eficaces frente a bacterias grampositivas.

Otra familia de polifenoles a destacar por su actividad antimicrobiana son los flavonoides, como la epigalocatequina y las procianidinas, que han sido usadas en clínica contra el microorganismo *Staphylococcus aureus* y han demostrado un potente efecto sinérgico al ser probadas en conjunción con antibióticos como la penicilina, revirtiendo la resistencia bacteriana a ésta^(12, 16). Otro compuesto de especial relevancia presente en la piel de la granada es la cianidina 3-glucósido, un pigmento que muestra un mecanismo de acción consistente en desintegrar de forma localizada la membrana externa de las bacterias produciendo la salida del citoplasma, volviendo a la bacteria inestable y disfuncional. Cabe destacar también la actividad bioactiva del kaempferol y de los glucósidos de quercetina y miricetina, presentes todos ellos en el extracto de *Cistus salviifolius*.

En la actualidad, el grupo de investigación en donde se ha desarrollado el presente trabajo, está estudiando otros extractos botánicos como es el caso un extracto derivado de la cereza, que debido a su contenido en polifenoles, antocianinas y vitamina C podría también tener actividad antimicrobiana y ha sido incluido en el presente trabajo. Ya se ha comprobado que juega un papel importante como agentes antiinflamatorios y antioxidantes en patologías clínicas como la obesidad⁽¹⁷⁾.

1.4. Extractos marinos

Los organismos marinos también son una fuente de estudio con un extraordinario potencial a la hora de encontrar nuevos compuestos con interesantes propiedades biológicas. Aunque se desconocen aún muchos elementos del metabolismo secundario de los organismos marinos, las moléculas aisladas en algas, esponjas, bacterias, peces e invertebrados marinos entre otros, han mostrado actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer

como melanoma, cervicouterino de colón etc. Además, se han encontrado otras actividades farmacológicas como antiinflamatoria y analgésica⁽¹⁸⁾.

Dolabella auricularia (Figura 4), también conocida comúnmente como “Liebre de mar” es una especie de babosa de mar se puede encontrar de manera autóctona en el océano Índico y oeste del Pacífico; es herbívoro y su alimentación se basa en algas y puede llegar a medir 40 cm de longitud. De péptidos aislados de esta especie como la dolastina deriva el desmetil-auristatina E, un potente fármaco antimetabólico con grandes resultados *in vivo* e *in vitro* para diferentes tipos de cáncer⁽¹⁸⁾. El extracto perteneciente a dicho organismo ha sido caracterizado por el grupo y se ha encontrado una composición alta en ácidos grasos, esteroides, terpenos y derivados del drimenol ciclohexenona entre otros más minoritarios como macrólidos y galactósidos, cuya composición está pendiente de publicación (en revisión a la fecha de entrega de este trabajo).



Figura 4. Imagen de *Dolabella auricularia*. **Fuente:** www.marinespecies.org - World Register of Marine Species: WoRMS.

Existen diferentes referencias bibliográficas en las que se ha detectado actividad antibacteriana de compuestos purificados a partir de *D. auricularia* como son las dolabellaninas A y B2 y las aplisianinas A, E y P. También se ha comprobado la actividad antifúngica de dolabellanina A y aplisianina E. Ante estos resultados previos, y sabiendo que la secuencia de la parte N-terminal de

dolabellanina A es similar a otros péptidos antibacterianos del reino animal ⁽¹⁹⁾, se decidió incluir este extracto en el presente trabajo.

1.5. Dianas moleculares de los extractos

Los polifenoles presentan numerosas dianas celulares para ejercer su actividad antimicrobiana, por lo tanto, parece menos probable que las bacterias puedan desarrollar resistencia contra ellos debido a su mecanismo de acción múltiple. Este hecho posiciona a los extractos naturales ricos en polifenoles como una posible alternativa o complemento a los actuales conservantes cosméticos⁽²⁰⁾. Algunas de las dianas moleculares conocidas de los polifenoles se muestran a continuación en la figura 5.

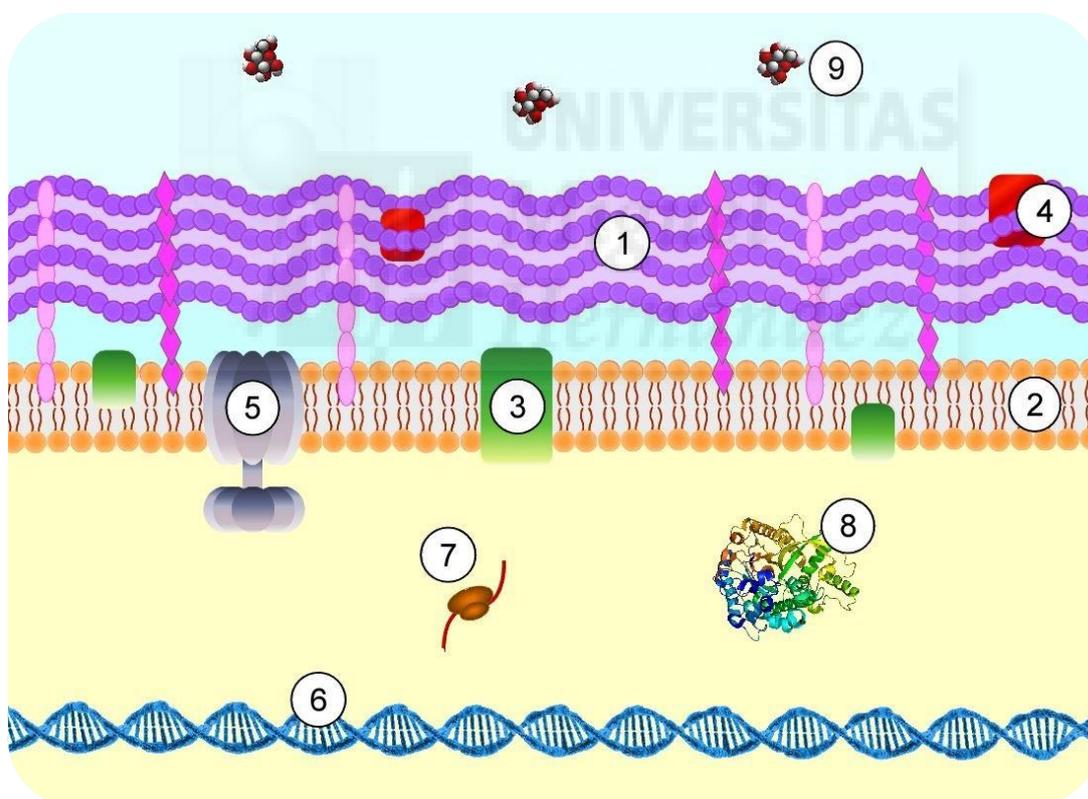


Figura 5: Esquema de las principales dianas de los polifenoles. Pared celular y proteínas que la conforman como PBP2a (1 y 4), membrana celular y sus componentes como canales (2 y 3), ATPasa y cadena transportadora de electrones (5), ADN (6), formación de ARN (7), proteínas del citoplasma (8),

iones y otras moléculas solubles presentes (9). **Fuente:** Referencia bibliográfica número 15.

A pesar de las múltiples dianas de acción descritas, se conocen también dianas concretas de algunos polifenoles específicos. Un polifenol ejemplo de ello es la quercetina. Recientemente, se ha comprobado que la quercetina reduce y controla la infección intestinal por la cepa de *Escherichia coli* O157:H7. Esta cepa es patógena debido a que se une a las células epiteliales intestinales mediante la integrina $\beta 1$ que presenta en la membrana celular externa. La quercetina interviene bloqueando la unión de dicha integrina y una quinasa de adhesión local y devolviendo a las células epiteliales su estado natural de motilidad. Este mecanismo de acción permite postular a la quercetina como un potencial tratamiento antimicrobiano frente a las infecciones entéricas⁽²¹⁾. Otros ejemplos de actividades sobre dianas específicas están incluidos en la bibliografía⁽¹⁵⁾ y demuestran el importante papel que los polifenoles tienen en el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas.

2. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

1. Determinar la CMI₅₀ de dos extractos vegetales (*Cistus salviifolius* y *Punica granatum*) con actividad antimicrobiana conocida en las especies microbianas seleccionadas.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto marino NB y RCSF3.
3. Estudiar la posible existencia de un efecto antimicrobiano sinérgico entre el parabeno y los extractos vegetales o marinos.

3. Materiales y métodos

3.1. Selección y obtención de los microorganismos

La selección de las bacterias se realizó en base a dos criterios: la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽²²⁾ para determinar el riesgo que conlleva un microorganismo infeccioso, a la hora de trabajar con él en el laboratorio, y los microorganismos comúnmente utilizados en los ensayos de cosmética para comprobar la eficacia de los conservantes. Las bacterias de nivel de riesgo 2 son las más utilizadas en este ámbito, sin embargo, debido a las condiciones del laboratorio, de seguridad y de experiencia previa de trabajo, se decidió trabajar con bacterias de nivel de riesgo 1 que poseen pocas posibilidades de provocar infecciones en el ser humano. Las bacterias seleccionadas fueron: *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* (una grampositiva y dos gramnegativas, respectivamente).

Las bacterias se obtuvieron a través de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) en forma de liófilo. Su activación en un ambiente estéril se realizó con un medio general (Medio 1, CECT) que contenía: peptona (15 %), extracto de levadura (3 %), cloruro de sodio (6 %) y d (+) – glucosa (1 %). Después de resquebrajar la ampolla en la que va contenido el liófilo con ayuda de la llama, se introducen alrededor de 0,5 mL de medio líquido y se resuspende el liófilo. A continuación, se siembra tanto en medio semisólido con agar (cultivo madre), como en un cultivo líquido (alrededor de 5 mL) y se incuba a la temperatura indicada de crecimiento, con agitación. Se congelaron diversos subcultivos de microorganismo en cultivo al 50 % de glicerol a -80 °C, para una reutilización futura, o como respaldo en caso de contaminación del cultivo madre.

3.2. Selección y obtención del parabeno

A la hora de elegir el parabeno, se escogió el parabeno que en mayor porcentaje fue encontrado al analizar muestras de múltiples productos de cuidado personal y cosméticos (toallitas húmedas, lociones, desodorante, maquillaje, etc.) en diversos estudios. De los 6 parabenos más comúnmente

detectados, el metilparabeno presentó el mayor porcentaje de aparición, estando presente en el 77 % de las ocasiones⁽²³⁾. Este compuesto se halla disponible comercialmente y se obtuvo a través de la compañía química Sigma-Aldrich.

3.3. Extractos utilizados

El extracto de *Punica granatum* es un extracto comercial (Nutragranate, Nutracitrus S.L., Elche) enriquecido en punicalinas y punicalaginas soluble en agua. El extracto *C. salviifolius*, de referencia interna CS 120911, es un extracto de elaboración propia del grupo de investigación y cuyo proceso de obtención y caracterización se encuentra recogido en la referencia⁽¹¹⁾. El extracto marino NB fue obtenido por el grupo de investigación como se describe en la referencia^(12, 24) y su composición está actualmente en revisión previa a su publicación en la revista Marine Drugs (Q1, IF:4.379). El extracto de cereza RCSF3 fue también obtenido por el grupo de investigación y su obtención y publicación está bajo revisión en la revista Phytochemical Analysis (Q2, IF:2.711).

3.4. Método Kirby-Bauer de difusión en agar

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos tanto de manera cualitativa como cuantitativa. En primer lugar, se empleó el método Kirby-Bauer para, de una manera cualitativa, valorar la sensibilidad de los agentes microbianos a cada extracto y poder realizar un primer cribado. En el ensayo se tuvo en cuenta la ausencia de colonias bacterianas en el agar, para valorar cualitativamente la susceptibilidad del microorganismo al compuesto utilizado que puede ser sensible, intermedio o resistente.

Para la realización de este ensayo se realizó un césped bacteriano, para ello, el día anterior a realizar la placa, se preparó un cultivo overnight: se cogió una colonia aislada del cultivo madre y se resuspendió en aproximadamente 5 mL de medio líquido y se incubó durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 10 mL de buffer salino (PBS) al 1 x, y se añadieron a la placa 60 μ L y con el asa Digrafsky se repartieron por toda la

superficie. Posteriormente se colocaron los discos de papel de filtro sobre los que se añadieron una solución del compuesto a probar y posteriormente incubaba la placa. El volumen añadido por disco fue de 5 a 20 μL , según la cantidad de compuesto que se quiera añadir y teniendo en cuenta que 20 μL es el volumen máximo que puede retener el disco. El período de incubación fue de 48 h para *M. luteus* a 30 °C ya que debido a su forma esférica y agrupación en tétradas le cuesta más crecer y formar un buen césped bacteriano. Por otro lado, el tiempo de incubación para *E. coli* y *B. subtilis* fue de entre 16 y 24 h a 37 y 30 °C respectivamente.

Se realizó un barrido usando diferentes cantidades de extracto por disco: 25, 50, 100, 200, 400, 600 μg . Después de la incubación, se realizó una fotografía de la placa y se analizó de forma cuantitativa usando el software *Axion Vision Rel. 4.8lnk* que permite medir con pixeles. Mediante este programa se determinó el porcentaje de halo de inhibición observado respecto al tamaño del resto de la placa. El diseño de placa que se siguió para este ensayo fue el siguiente (Figura 6):

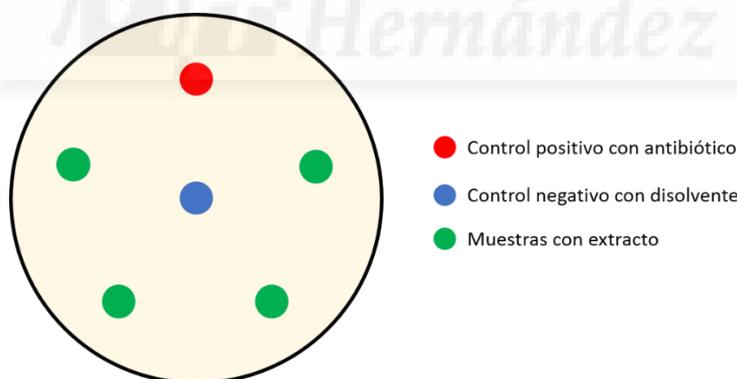


Figura 6. Diseño de las placas para el ensayo Kirby-Bauer.

El medio semisólido usado fue *Müller-Hinton* (MH) con agar. Para comprobar que los disolventes se utilizaron en concentraciones subinhibitorias y no interferían con el efecto de los compuestos probados, se añadió un control negativo del disolvente en el que estaba disuelto el extracto.

Para *M. luteus* y *B. subtilis* se usó la cloxacilina como antibiótico en el control positivo de inhibición y para *E. coli* se usó la neomicina, ambos compuestos a una concentración de 0,25 mg/mL. Se realizaron replicados intra e interplaca de las muestras de extracto para minimizar variabilidades debidas al estado del medio, humedad, temperatura y otras variables ambientales.

De la misma forma, se evaluó también la actividad del parabeno siguiendo el mismo esquema de la placa para el extracto. Se probaron las cantidades de 100, 200, 400, 800 y 1600 µg de metilparabeno por disco. El stock de metilparabeno se preparó al 50 % de etanol.

3.5. Antimicrobianos en placa de 96 pocillos

A continuación, se realizaron ensayos antimicrobianos en placa de 96 pocillos mediante el método de microdilución con el fin de valorar el crecimiento del microorganismo en estas condiciones, comprobar si existe una mayor eficacia por parte de los extractos al tratarse de un medio líquido y determinar una posible sinergia entre el parabeno y los extractos. De esta manera, se realiza un antibiograma del cuál puede obtenerse la concentración mínima inhibitoria 50 (CMI₅₀), la concentración mínima de compuesto capaz de inhibir del 50 % del crecimiento bacteriano. Se eligió dicho método al igual que se hace con los antibióticos debido a que permite obtener una rápida evidencia de la actividad en los conservantes⁽²⁴⁾. Este cálculo fue posible gracias al procesamiento y análisis de los resultados a través del software informático *GraphPad Prism 6*.

Para empezar el ensayo se realizó un cultivo overnight siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Una vez se resuspendió el precipitado bacteriano en PBS, se realizaron diluciones seriadas y se eligió la más adecuada para realizar el inóculo basándose en método espectofotométricos.

Posteriormente, se añadió a cada pocillo de la placa los siguientes reactivos/productos: 50 µL del antimicrobiano a probar a diferentes concentraciones, 130 µL de medio 1, y 20 µL de bacteria diluida. Se realizó un control positivo de crecimiento bacteriano (con 100 µL del disolvente utilizado (agua + el disolvente correspondiente utilizado para el stock del compuesto

antimicrobiano utilizado) + 130 μ L medio y 20 μ L de bacteria. También se incluyó un control de contaminación que contenía los mismos componentes que el control positivo, pero con 20 μ L de PBS. Se realizaron 3 replicados intra e inter placa para evitar variabilidades en el cálculo de la CMI₅₀.

El diseño de placa utilizado fue el siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Extracto GP (diluciones seriadas desde 2 hasta 0,015 mg/mL)								control positivo	control contamin.	
C		Extracto GP (diluciones seriadas desde 2 hasta 0,015 mg/mL)										
D		Extracto GP (diluciones seriadas desde 2 hasta 0,015 mg/mL)										
E		Extracto CS (diluciones seriadas desde 2 hasta 0,015 mg/mL)										
F		Extracto CS (diluciones seriadas desde 2 hasta 0,015 mg/mL)										
G		Extracto CS (diluciones seriadas desde 2 hasta 0,015 mg/mL)										
H												

Figura 7. Barrido de concentraciones en cada pocillo indicadas en mg/mL.

Después, se incubó la placa según las características requeridas para cada bacteria. Alrededor de la placa se añadió agua para evitar la pérdida de volumen en los pocillos del ensayo por evaporación. Al día siguiente de la incubación, se añadieron a los pocillos 50 μ L del tinte cloruro de *p*-yodonitrotetrazolio (INT) a 1mg/mL. Este tinte en presencia de células viables por las deshidrogenasas bacterianas otorga un color rojizo al pocillo⁽²⁵⁾. A continuación, se realizó una lectura colorimétrica a 570 nm para así obtener más tarde con el análisis de datos la CMI₅₀. En este estudio, la concentración mínima inhibitoria también se puede estimar visualmente como la concentración más baja de extracto sin turbidez visual, aunque posee una menor exactitud y objetividad.

Este procedimiento se realizó de la misma manera para el cálculo de la CMI₅₀ del metilparabeno partiéndose de una concentración de 2 mg/mL y probándose para cada una de las tres cepas bacterianas.

3.6. Sinergia entre extractos y parabenos

Se realizaron los ensayos de sinergia de forma cualitativa por el método Kirby-Bauer siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente. En este caso no se realizaron controles positivos y negativos con el disolvente puesto que ya se tenían datos suficientes para valorar su efecto. Con la medida de halos de inhibición obtenidos en el primer ensayo, en la placa de sinergia se utiliza dicha toma para colocar los discos con extracto y metilparabeno respectivamente a una distancia en la cual sus halos puedan interactuar. Según como se observe la unión entre los halos de inhibición podemos sacar conclusiones cualitativas acerca de si ambos compuestos poseen o no sinergia entre ellos como se puede observar en la figura 8. En la imagen A se observa una relación de sinergia debido a que la interacción entre los halos sufre una deformación aumentando el tamaño de sus halos iniciales en el lugar donde se encuentran ambos dos. En la imagen B, al contrario, se observa el fenómeno de antagonismo debido a que el halo podría expandirse más, pero no lo hace, frenado como por una especie de “pared” que es fruto de la difusión del otro compuesto. Se observa como el halo de inhibición pierde su forma redondeada normal. Por último, la relación de indiferencia ocurre cuando ambos halos interaccionan, pero en el lugar donde se encuentran los halos no sufren ninguna deformación, por lo que ambos compuestos juntos no potencian la actividad antimicrobiana.

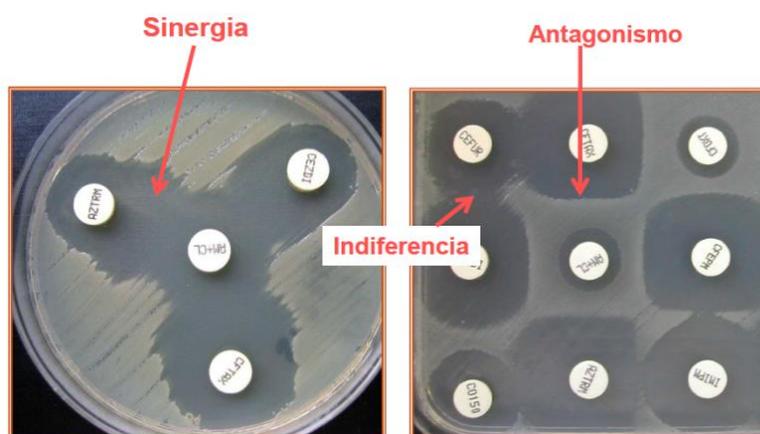


Figura 8. Antibiograma por el método Kirby-Bauer de diversos conservantes frente a *E. coli*. **Fuente:** www.wider.es/casosclinicos.

Para valorar la sinergia cuantitativamente se realizó el antibiograma en placa de 96 pocillos con él método del tablero (checkerboard), que permite estudiar el efecto combinado de dos compuestos y valorar las interacciones farmacológicas que entre ellos se den (sinergia, indiferencia/aditividad o antagonismo). Se realizan diluciones seriadas del metilparabeno y del extracto botánico a determinar, incluyendo valores superiores e inferiores a la CMI determinada anteriormente; de manera que la CMI₅₀ de cada compuesto se posicione en medio de la placa. De esta forma habrá un pocillo en el cual ambas CMI₅₀ coincidan, como se ve en la figura 9 (pocillo coloreado verde). La placa se puede dividir en 4 zonas: la zona 1 donde se encuentran la mayor concentración de extracto y metilparabeno y se espera una alta capacidad bactericida. La zona 2 donde la concentración de metilparabeno es alta y la de extracto es baja, la zona 3 donde pasa lo contrario, alta concentración de extracto y baja de metilparabeno; y la zona 4 donde ambas concentraciones tanto extracto como metilparabeno son bajas y donde se espera obtener resultados indicadores de sinergia. En el caso de que estuviéramos antes una relación de sinergia entre ambos compuestos en esta parte de la placa, la zona 4, se observarían valores de absorbancia alrededor de los mostrados en el pocillo verde central. Y con menor concentración de ambos se obtendrían mejores resultados que con ambos por separado a la misma concentración.

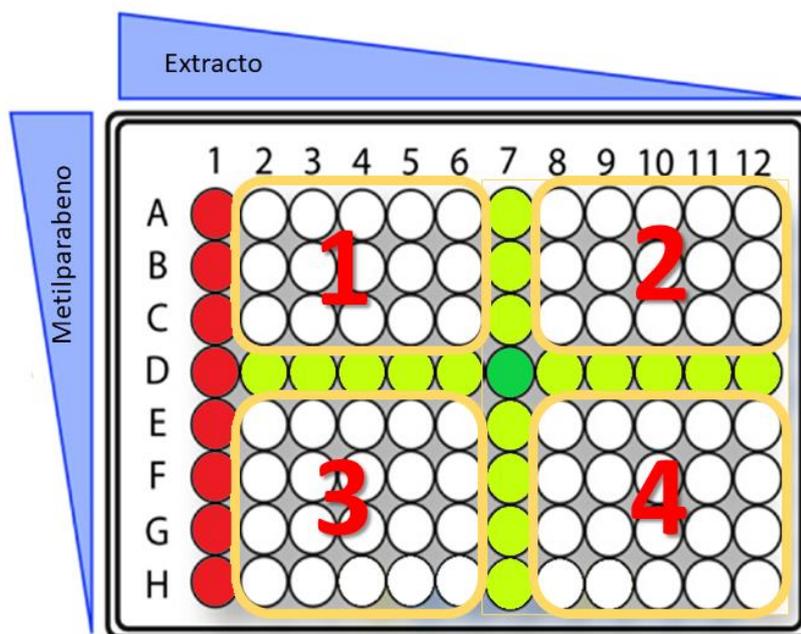


Figura 9. Esquema del protocolo seguido para el ensayo de sinergia. Los triángulos indican el sentido de la concentración del compuesto de mayor (base) a menor concentración (vértice más lejano).

Este tipo de ensayo otorga gran cantidad de información al cruzarse diferentes concentraciones de ambos compuestos en un intervalo muy amplio.

3.7.- Diagrama resumen

A continuación, se muestra un diagrama resumen de los métodos utilizados cronológicamente a lo largo del trabajo y su evolución:

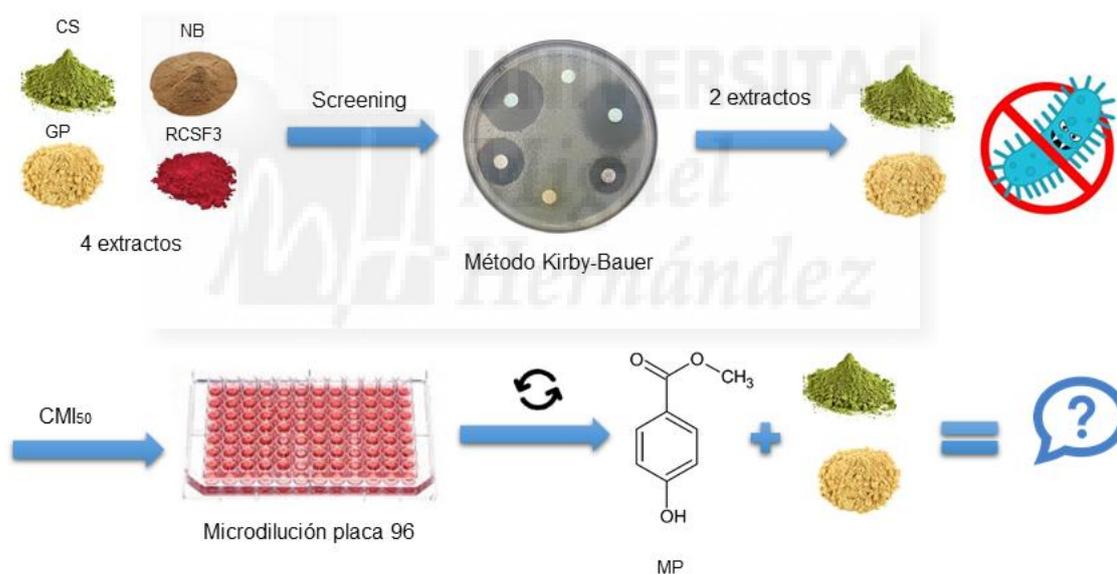


Figura 10. Diagrama resumen de material y métodos utilizados en el trabajo. Se parte de 4 diferentes extractos, que tras un cribado inicial mediante el método de Kirby-Bauer se quedó en sólo dos (CS y GP). Posteriormente se realizó un segundo cribado mediante el método de microdilución y finalmente se evaluó la sinergia entre los dos extractos seleccionados (CS y GP) el metilparabeno.

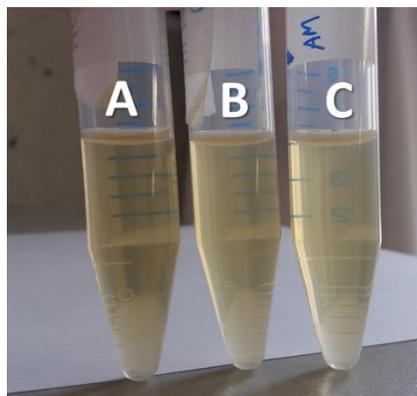
4.- Resultados y discusión

4.1.- Optimización de los ensayos

Dado que los extractos utilizados en el presente trabajo presentan una limitada solubilidad en medio acuoso, se realizó una primera aproximación para estudiar la solubilidad de los mismos en los medios de cultivo de trabajo y la necesidad de añadir algún cosolvente, todo ello estudiado a diferentes concentraciones y para cada uno de los cuatro extractos.

El extracto más sensible a precipitar por su escasa solubilidad fue el CS. En la figura 11 se ven algunas de las diferentes pruebas realizadas. En la imagen 2, el tubo A se encuentra CS a 10 mg/mL disuelto en agua al 20 % de DMSO. En el tubo B el extracto de CS se encuentra a 2 mg/mL y 4 % de DMSO y se observa una buena disolución. En el tubo C, las condiciones que se muestran son del extracto de CS a 1 mg/mL y 2 % de DMSO, e incluso después de aplicar ultrasonidos, se observa una cierta turbidez indicativa de que el extracto no está totalmente disuelto. En el caso del extracto de GP (Figura 11, imagen 1) se parte de una concentración de 4 mg/mL (tubo A), y se baja la concentración en el resto de tubos: en el tubo B a 2 mg/mL y en el tubo C a 1 mg/mL. En todas las pruebas se observa un buen resultado, lo que puede ser debido a su composición química puesto que está formado por compuestos más hidrófilos que el extracto de CS. Ensayos similares se realizaron para los extractos de cereza y *D. auricularia*.

1



2

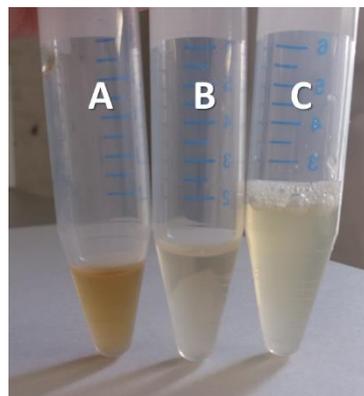


Figura 11. En la izquierda las disoluciones realizadas con GP donde se observa la poca variación de solubilidad. Y en la derecha las pruebas realizadas con CS.

Debido a estos resultados, se optimizó el protocolo inicial con los volúmenes de medio, bacteria y compuesto en cada pocillo de la placa como se detalló anteriormente en el apartado de los métodos utilizados. Estos cambios permitieron solucionar completamente los problemas de solubilidad de todos los extractos.

Destacar también la optimización que se realizó para mejorar el césped bacteriano de *M. luteus* ya que, debido a su morfología como se comentó anteriormente en la sección de material y métodos, le cuesta crecer y formar un césped uniforme. Para ello se optimizó tanto la cantidad de inóculo como el tiempo de crecimiento tal y como se detalla en el apartado de materiales y métodos.

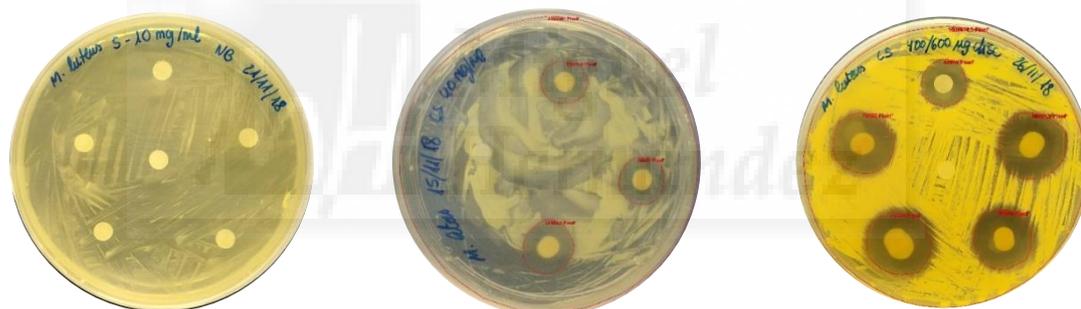


Figura 12. Diferentes placas obtenidas durante el proceso de optimización de *M. luteus*. La primera placa trascurridas 16 h de incubación, y la segunda y tercera después de 24 y 48 h de incubación respectivamente. Las dos últimas analizadas usando el software Axion Vision Rel. 4.8lnk. Se observa la medida en pixeles de toda la placa en comparación con los pixeles de los diferentes halos de inhibición.

4.2. – Antibiograma mediante el método Kirby-Bauer

A continuación, se muestra una tabla con imágenes de las placas obtenidas según el método Kirby-Bauer, a las cantidades en las que se obtuvo

un mejor resultado: para el metilparabeno fueron 800 y 1600 μg ; y en el caso de los extractos se corresponde con las cantidades de 400 y 600 μg por disco discos (lado izquierdo y derecho de la placa respectivamente), siguiendo el esquema mostrado en la figura 6.

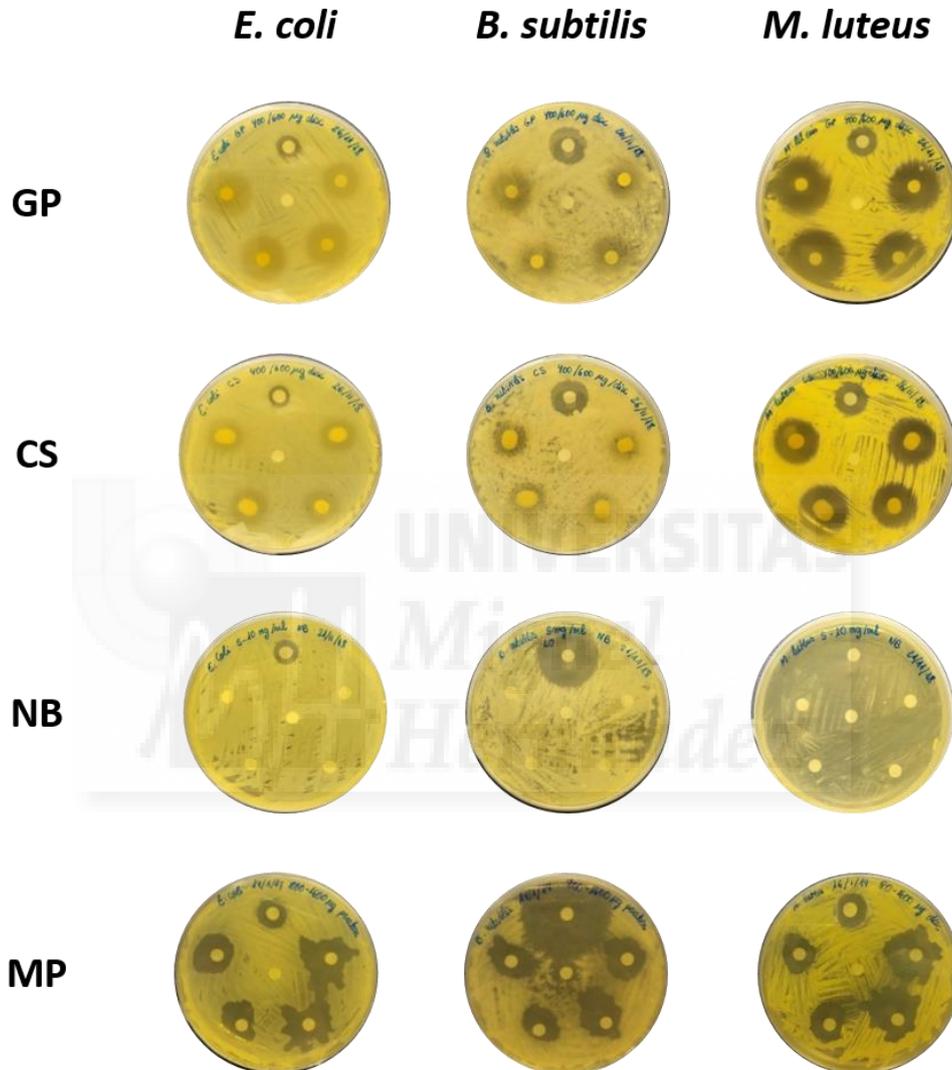


Figura 13. Resultados del primer ensayo cribado de extractos Kirby-Bauer. Los extractos están mostrados según el código descrito anteriormente y el metilparabeno está representado por las letras “MP”.

Los extractos NB y RCSF3 no mostraron efecto en ninguna cepa, por lo que, tras este ensayo, se decidió eliminarlos del cribado, pasando sólo a la segunda fase los extractos CS y GP. En la imagen de *M. luteus* con NB, se

observa la diferencia de crecimiento de césped bacteriano de 24 h de incubación respecto al resto de placas de *M. luteus* incubadas durante 48 h. Cabe destacar que la placa de *M. luteus* con NB también se dejó incubar hasta las 48 h para ver mejor un posible efecto antimicrobiano por parte del extracto; aunque no se obtuvo un resultado positivo y la imagen obtenida no fue de suficiente calidad. En las placas de *E. coli* y *B. subtilis* se observa un descenso alrededor del disco con extracto CS y GP de crecimiento bacteriano, pero no es una inhibición total, como sí se muestra en *M. luteus*.

M. luteus es la cepa bacteriana que muestra una mayor sensibilidad a los extractos CS y GP, y *B. subtilis* y *E. coli* presentan un efecto intermedio. Solo se han podido analizar cuantitativamente los halos de inhibición de *M. luteus* debido que estaban bien delimitados. Obteniéndose los siguientes resultados:

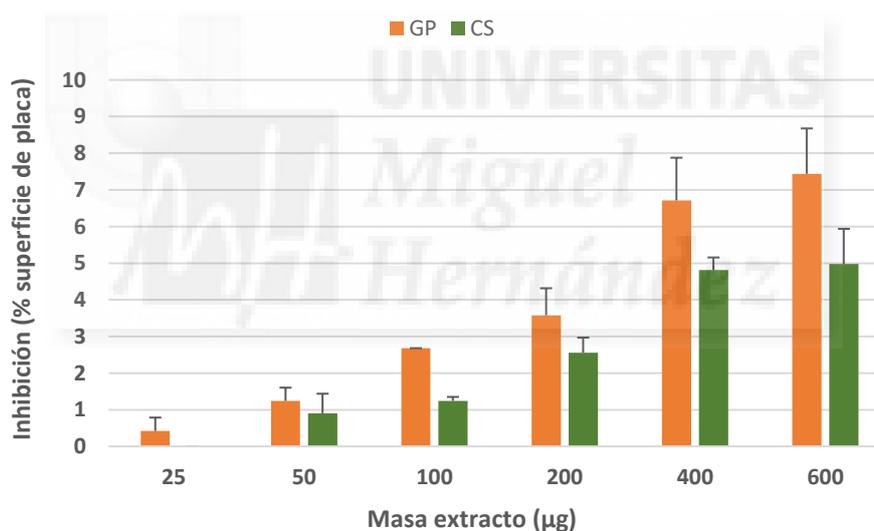


Figura 14 Correlación entre la masa de CS y GP en *M. luteus* respecto su halo de inhibición.

Como muestra la figura 14, se observa una mayor actividad en el extracto de granada, se observa actividad antimicrobiana incluso a 25 µg por disco mientras que en CS es a partir de 50 µg. También se aprecia una mayor inhibición del crecimiento en todas las concentraciones de GP probadas llegando a inhibir un 7,4 % de crecimiento bacteriano respecto el total de la placa a la

concentración más alta probada – 600 μg – mientras que con el extracto de CS solo se llega a un 5 % de inhibición a dicha concentración.

Los resultados de los ensayos antimicrobianos en Kirby-Bauer empleando el metilparabeno se muestran a continuación:

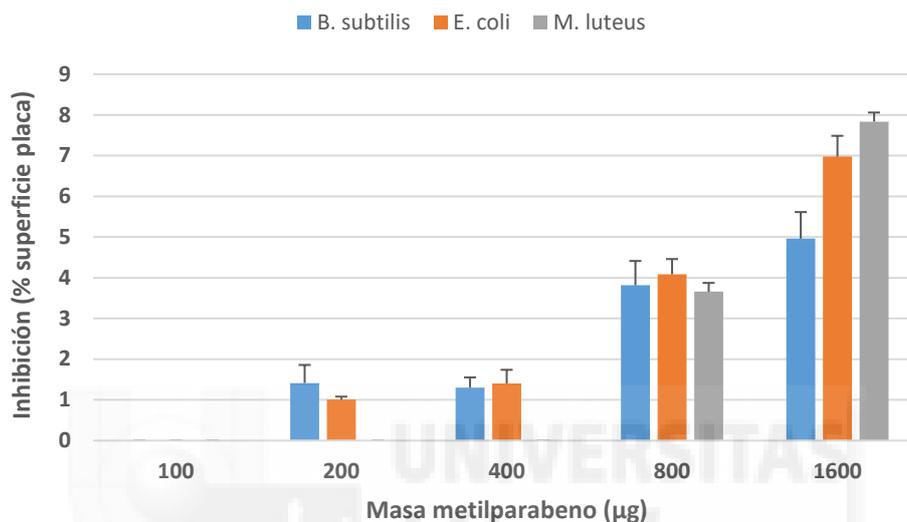


Figura 15. Efecto del metilparabeno frente a las 3 cepas bacterianas probadas.

El metilparabeno, a diferencia del extracto, sí muestra efecto en las 3 cepas analizadas. En las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* tiene efecto a concentraciones más bajas (a partir de 200 μg por disco) mientras que en *M. luteus* no muestra efecto hasta los 400 μg consiguiéndose con la máxima cantidad por disco - 1600 μg – el mayor porcentaje de inhibición. Es con esta cantidad de conservante con la que varían más los halos de inhibición entre las cepas, ya que en las demás cantidades probadas mostraban valores muy similares. Cabe destacar que los halos de inhibición presentan en la placa una morfología regular esperada excepto en las concentraciones más elevadas de 800 y 1600, sobre todo en esta última como puede verse en la figura 10, en donde se observa que tiene una forma muy irregular en todas las cepas.

4.3.- Resultados antibiogramas en placa de 96 pocillos

La dificultad de crecer en un medio sólido en comparación con un medio líquido debido a la condición osmótica y la dilución realizada en los extractos influye en la actividad antimicrobiana. Por ello, se decidió probar en las cepas de *B. subtilis* y *E. coli* que mostraban en medio con agar una actividad antimicrobiana poco definida, pero con gran potencial por el método de microdilución en placa de 96 pocillos. Después de realizar diversas pruebas con *M. luteus* no se pudo determinar mediante este método debido a que por su morfología de coco y una agrupación en tétradas crece de manera muy dispar en los diferentes pocillos y no se pudo correlacionar con un posible efecto del extracto.

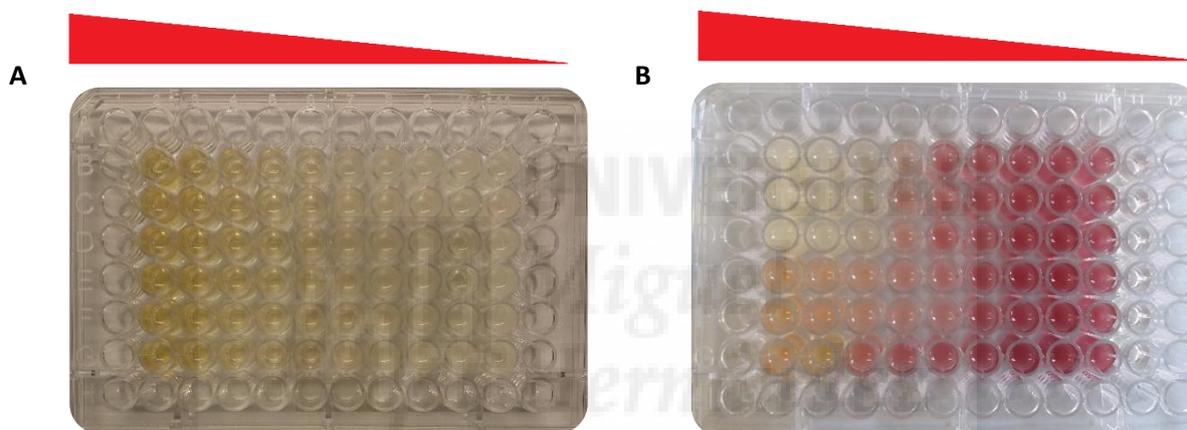


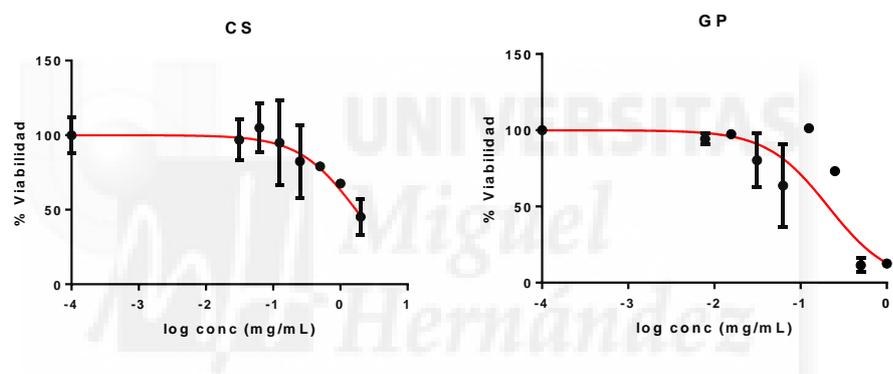
Figura 16. Ejemplo de placas de 96 pocillos en las que se probaron diferentes concentraciones de los extractos (que se reducen de izquierda a derecha como muestra el triángulo rojo sobre las placas) según el diseño de la figura 7. En la imagen A puede observarse la dilución de los extractos tras la incubación de la cepa bacteriana. Mientras que en la imagen B se observa el resultado de la placa después de ser tratada con el tinte INT; en las 3 primeras filas con el extracto de GP y en las 3 últimas filas con el extracto de CS donde se puede apreciar la tonalidad de cada extracto en los primeros pocillos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos mediante el análisis con el GraphPad 6:

	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
CS	717 ± 850	45 ± 8
GP	157 ± 96	69 ± 49

Tabla 1. CMl_{50} de los extractos elegidos con mejor resultado en el cribado con su desviación estándar. Concentración mostrada en $\mu\text{g/mL}$.

B. subtilis



E. coli

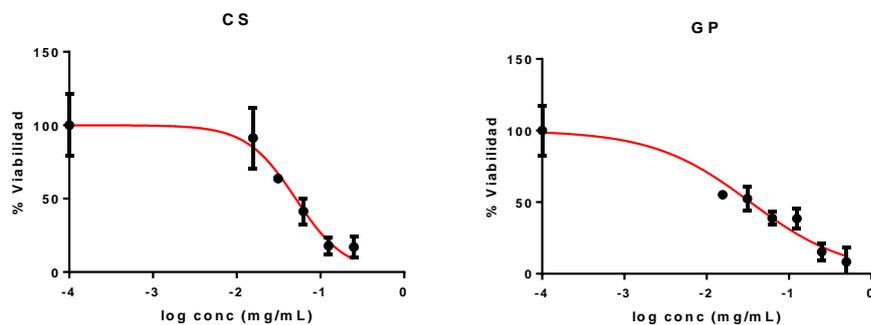


Figura 17. Gráficos de las curvas sigmoideas de inhibición obtenidas.

Los resultados muestran una mayor sensibilidad por los extractos por la cepa de *E. coli*. *B. subtilis* posee una CMl_{50} superior.

En el caso del metilparabeno se siguió el mismo proceso partiendo de una concentración de 2 mg/mL. Donde se obtuvieron las CMI₅₀ que se muestran a continuación

	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
MP	78 ± 36	36 ± 12

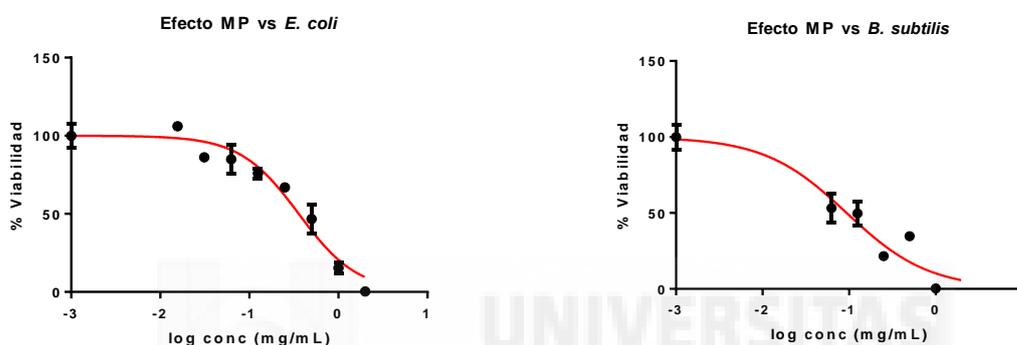


Tabla 2 y figura 18. CMI₅₀ en µg/mL y graficas sigmoides obtenidas en microdilución en el metilparabeno.

Comparando los datos correspondientes a la CMI₅₀ del metilparabeno y los extractos botánicos de GP y CS podemos afirmar que el parabeno es más potente que los extractos ya que con menor dosis consigue mayor efecto inhibitorio. El metilparabeno posee mayor efecto inhibitorio contra *B. subtilis* a menos concentración que los extractos. En el caso de *E. coli*, aunque la CMI₅₀ también es más baja que en el extracto no es por un intervalo menor. *E. coli* es más sensible a la inhibición por parte de ambos compuestos – metilparabeno, y extractos de GP y CS – que *B. subtilis*.

Los resultados obtenidos, se enmarcan dentro de los valores que usualmente presentan los extractos vegetales en la bibliografía, algunos de los cuales están incluidos en revisiones como⁽¹⁵⁾.

En todas las gráficas obtenidas para las diferentes muestras probadas se observó una forma sigmoide, lo que refleja una cinética de inhibición dosis-

dependiente. Es decir, a mayor concentración de compuesto mayor inhibición del crecimiento bacteriano. Esto era de esperar en el caso del metilparabeno puesto que es un conservante de acción conocida, pero ocurre lo mismo en los extractos de CS y GP, dando lugar a una ventana de estudio para un posible intercambio por el metilparabeno.

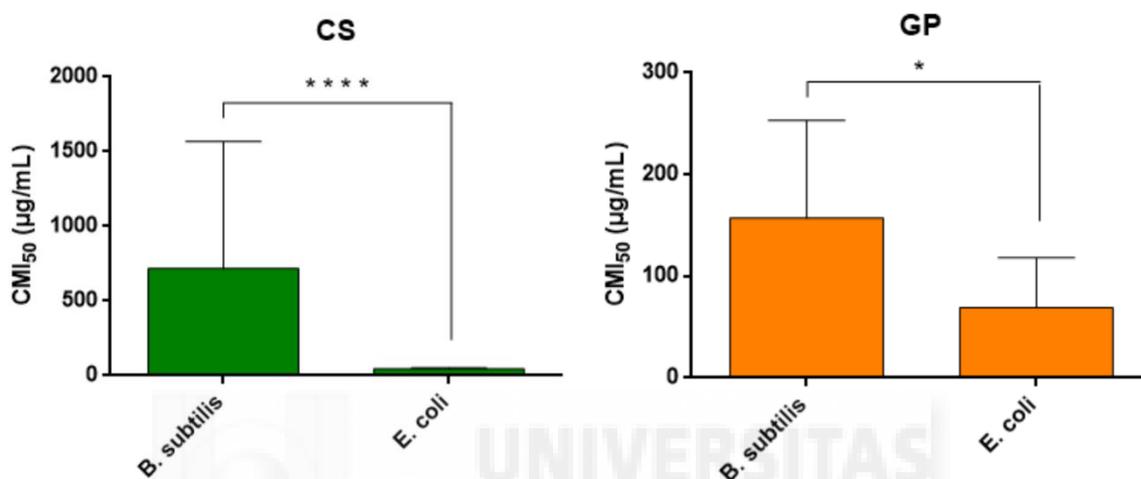


Figura 19. Comparativa en gráficos de barras de la actividad antimicrobiana de ambos extractos (CS y GP) frente a *B. subtilis* y *E. coli*. * = $p < 0.05$. **** = $p < 0.0001$.

El análisis estadístico, two way ANOVA, realizado mediante el software informático Graphpad Prism 6 reveló que ambos extractos resultaron más eficaces frente a *E. coli* que frente *B. subtilis*. También se comparó estadísticamente la actividad de ambos extractos frente a la misma bacteria. Los resultados obtenidos reflejaron diferencias significativas en el caso de *B. subtilis* entre CS y GP, siendo más activo este último extracto ($p < 0.0001$). Mientras que *E. coli* no mostraba diferencia significativa entre ambos extractos ($p > 0.05$).

4.4.- Resultados sinergia en Kirby-Bauer

Solo pudo probarse la sinergia por el método Kirby-Bauer en la cepa *M. luteus* debido a la claridad en sus halos de inhibición, descartándose las cepas de *E. coli* y *B. subtilis*. Para el ensayo se eligieron las cantidades según el ensayo

anterior de metilparabeno de 600 μg debido a que el halo de inhibición presentaba una morfología más regular (el halo de inhibición a 1600 μg presentaba una forma muy irregular), y se probó a una cantidad de extracto de GP de 200 μg y una de CS de 400 μg . Se eligieron estas cantidades con el objetivo de formar un halo de inhibición de un tamaño considerable y comparable que permitiera observar bien una fácilmente la posible interacción entre el metilparabeno y los extractos correspondientes. Se observó una deformación acompañada por un agrandamiento de los halos de inhibición del extracto de GP en contacto con el metilparabeno. Para el extracto de CS no se observó con claridad dicho efecto, aunque se observaron algunos indicios. Por este motivo se propone la optimización de la técnica para la obtención de resultados más concluyentes.

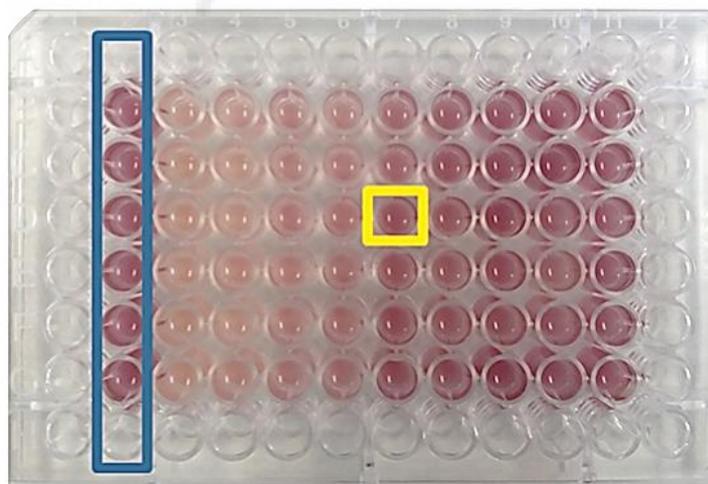
4.5- Resultados sinergia en placa 96

A la hora de analizar el ensayo tipo tablero de ajedrez o checkerboard descrito en la figura 9, se dividió la placa en cuatro zonas quedando en el centro – columna 7, fila D – el pocillo en el cuál se unen las CMI_{50} del metilparabeno y el correspondiente extracto (ver esquema en figura 9). Además, para poder valorarlas mejor, se utilizó un formato condicional de escalas de color que otorga el color rojo a las absorbancias con valores más altos y así sucesivamente con absorbancias menores y colores como naranja y amarillo hasta llegar al color verde, indicando las absorbancias con valores más bajos.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CS	A												
	B		1,135	0	0	0,059	0,06	0,744	0,766	0,874	0,795	0,988	
	C		1,001	0,133	0,065	0	0	0,606	0,727	0,808	0,875	1,024	
	D		1,067	0,144	0	0	0,055	0,622	0,66	0,827	0,72	0,985	
	E		0,964	0,25	0	0	0,096	0,667	0,592	0,837	0,595	0,838	
	F		0,958	0,234	0	0	0,462	0,564	0,622	0,634	0,596	1,004	
	G		1,033	0,024	0	0	0,136	0,565	0,658	0,909	0,699	0,81	
	H												
GP	A												
	B		1,759	0	0	0,085	0,615	0,911	1,985	1,15	1,343	1,376	
	C		1,551	0,197	0	0,177	0,47	0,846	0,899	1,069	1,26	1,19	
	D		1,353	0	0	0,124	0,346	0,752	0,963	0,892	1,092	1,142	
	E		1,299	0	0	0,078	0,572	0,823	0,969	0,922	1,542	1,055	
	F		1,441	0,042	0	0,048	0,264	0,802	1,048	1,038	1,413	1,103	
	G		1,638	0	0,089	0	0,913	1,285	1,64	0,874	1,686	0,71	
	H												

Tabla 3. Resultado de los extractos en el checkerboard realizado en *E. coli*.

Como se observa en la tabla 3 correspondiente a los datos de checkerboard para *E. coli*, las absorbancias más altas representan el control positivo de crecimiento bacteriano usado en la placa, emplazado en la primera columna. En el primer cuadrante encontramos que la concentración de parabeno como va disminuyendo de arriba abajo en los pocillos y la de extracto como es máxima en la izquierda y disminuye hacia la derecha. La absorbancia donde se unen ambas CMI₅₀ es en el caso del CS 0,622 y en GP 0,752. Por lo que, en el siguiente cuadrante de la placa, en la derecha inferior donde la concentración de ambos compuestos es baja se esperaría ver sinergia si la absorbancia de los pocillos es menor o similar a estos valores. Esto ocurre en algunos pocillos como es el caso del CS que da absorbancias más bajas alrededor de 0.596 o alrededor de la absorbancia de la CMI₅₀ a concentraciones más bajas que la CMI₅₀ conjunta para ambos compuestos. Igual ocurrió con GP, donde en el último pocillo del extremo inferior derecho de la placa se obtiene la misma absorbancia que con la CMI₅₀ conjunta de ambos compuestos aun estando ambos a una concentración mucho menor.



Control positivo

Figura 20. Placa de sinergia en *E. coli* con el extracto de GP donde se ven las degradaciones de color por el tinte INT, según las bacterias viables en el

pocillo. El cuadro amarillo es el pocillo en el que unen las CMI₅₀ de ambos compuestos.

En el caso de *B. subtilis* hubo una limitación puesto que al probarse a una concentración más elevada que en *E. coli* había parte del extracto que precipitaba formando poso en el fondo del pocillo. De tal manera, al ir a medir la absorbancia el lector no atraviesa dicho poso y da valores inexactos. Por lo que no fue posible obtener un resultado concluyente cuantitativo. En la figura 19 se muestra la imagen de la placa donde se puede valorar cualitativamente el resultado gracias a las diferentes tonalidades que otorga el tinte INT. *B. subtilis* se muestra menos sensible a los extractos que *E. coli*, por lo que se observa una mayor tonalidad roja en la placa que en la figura 18.

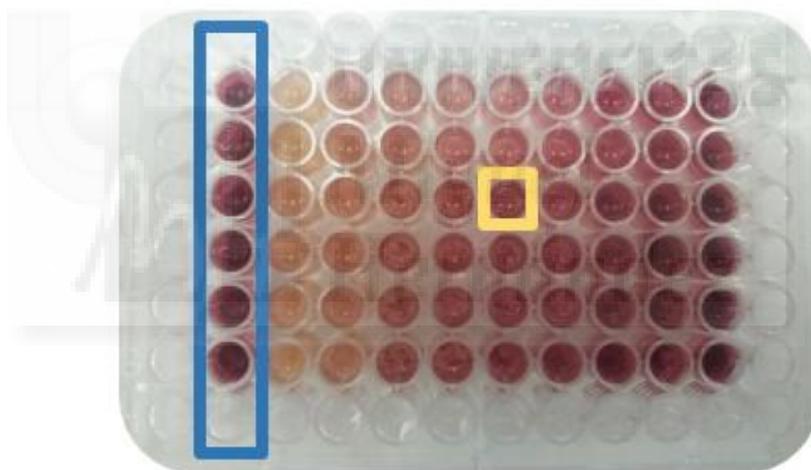


Figura 21. *Placa de sinergia en *B. subtilis* con el extracto de GP. La primera columna muestra el control positivo de crecimiento (cuadro azul) y en las siguientes, una disminución de la tonalidad rojiza debido al efecto del metilparabeno conjuntamente con la actividad del extracto. El cuadro amarillo muestra donde se unen la CMI₅₀ de ambos compuestos.*

Este protocolo está pendiente de optimización, ya que los resultados obtenidos por el momento han sido solamente cualitativos. Mediante la

modificación del protocolo y diseño de la placa se pretende poder calcular el FIC (fractional inhibitory concentration), un parámetro cuantitativo que se relaciona con la sinergia en la capacidad antimicrobiana entre dos compuestos⁽¹²⁾.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos hasta la fecha y mostrados en páginas anteriores, los extractos de CS y GP poseen una interesante actividad antimicrobiana que permite el desarrollo de estudios futuros para valorar su papel como ingredientes alternativos o complementarios a los parabenos.

5.- Conclusiones

Las principales conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- En general, se observó una mayor eficacia antimicrobiana de los extractos botánicos de CS y GP frente a las bacterias gramnegativas que frente a las grampositivas.
- Este hecho podría deberse a la presencia de la pared celular en las bacterias grampositivas, la cual podría actuar como barrera de protección extra frente a la acción de los polifenoles, disminuyendo su índice de penetración y evitando que ejerzan su actividad en múltiples dianas internas.
- La limitada solubilidad de los extractos a altas concentraciones. Es una limitación del ensayo por microdilución en placa de 96 pocillos.
- Este problema puede solventarse mediante el uso de cosolventes compatibles y la inclusión de los correspondientes controles.
- La anterior limitación tiene una posible solución en una formulación cosmética, ya que se podrían obtener mejores resultados debido a que suelen estar formuladas en dos fases, una oleosa y otra de tipo acuoso. Este hecho podría ayudar a obtener mejores resultados de solubilidad, ya que las sustancias activas del extracto podrían distribuirse de acuerdo a su mayor afinidad y solubilidad.
- Dada la actividad antimicrobiana encontrada para los extractos CS y GP, éstos podrían postularse como una posible alternativa o como agentes complementarios a los conservantes cosméticos actuales.

Además, podrían aportarle al cosmético otros beneficios además de la cualidad antimicrobiana, tales como una actividad antioxidante, un aroma agradable debido a los componentes volátiles, o un color atractivo o distintivo.

- Aunque los resultados son positivos, es necesario ampliar el estudio a otras cepas microbianas y realizar un ensayo “challenge test” para poder valorar finalmente la utilidad futura de los extractos.

6.- Proyección futura

- Optimización y repetición del ensayo de sinergia por el método Kirby-Bauer para el extracto CS y el metilparabeno.
- Optimización del método para el cálculo cuantitativo de la sinergia antimicrobiana entre los extractos y el metilparabeno en microdilución.
- Ampliar es estudio a otras cepas microbianas de interés.
- Realizar un ensayo tipo “challenge test” para valorar la estabilidad y efecto conservante de los extractos en un producto cosmético.

7.- Agradecimientos

Dar las gracias a mi tutor Enrique Barrajón, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia: realizar el TFG en su grupo de investigación. Poder ver y trabajar desde dentro como es este maravilloso campo y siempre estar disponible a guiarme en las ideas que tenía a lo largo de todos estos meses. A mi co-tutor, Javier Álvarez por enseñarme todo lo que sé de microbiología y biología molecular, por sus palabras de ánimo en los momentos de bajón y por esas risas en los almuerzos que daban vida. A mis compañeras de laboratorio 0.02 y 0.03, Noelia, Marina, Encarna, Jessica, Almu, Vero... que alegran los días con sus anécdotas, resolviendo y escuchando cualquier duda que tuviera: gracias.

Por último, a mis padres el alma de mi vida.

8.- Bibliografía

1. Comisión europea. Revisión del Reglamento (CE) nº 1223/2009. 2018.

2. Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Gorska M, Jablonska E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;474:238-51.
3. Karpuzoglu E, Holladay SD, Gogal RM, Jr. Parabens: potential impact of low-affinity estrogen receptor binding chemicals on human health. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2013;16(5):321-35.
4. Comisión Europea. Diario oficial de la Unión Europea. 2014;282:5-6 y anexos.
5. Wolfgang S. Comparison of Microbial Challenge Testing Methods for Cosmetics. *H&PC today.* 2013;8:32-8.
6. Orus P, Gomez-Perez L, Leranoz S, Berlanga M. Increasing antibiotic resistance in preservative-tolerant bacterial strains isolated from cosmetic products. *Int Microbiol.* 2015;18(1):51-9.
7. Periamé M, Pages JM, Davin-Regli A. *Enterobacter gergoviae* membrane modifications are involved in the adaptive response to preservatives used in cosmetic industry. *J Appl Microbiol.* 2015;118(1):49-61.
8. Periamé M, Pages JM, Davin-Regli A. *Enterobacter gergoviae* adaptation to preservatives commonly used in cosmetic industry. *Int J Cosmet Sci.* 2014;36(4):386-95.
9. Lehtinen S, Blanquart F, Lipsitch M, Fraser C, with the Maela Pneumococcal C. On the evolutionary ecology of multidrug resistance in bacteria. *PLoS Pathog.* 2019;15(5):e1007763.
10. Barrajon-Catalan E, Fernandez-Arroyo S, Saura D, Guillen E, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A, et al. Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8-9):2273-82.
11. Tomas-Menor L, Morales-Soto A, Barrajon-Catalan E, Roldan-Segura C, Segura-Carretero A, Micol V. Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:313-22.
12. Tomas-Menor L, Barrajon-Catalan E, Segura-Carretero A, Marti N, Saura D, Menendez JA, et al. The promiscuous and synergic molecular interaction of

polyphenols in bactericidal activity: an opportunity to improve the performance of antibiotics? *Phytother Res.* 2015;29(3):466-73.

13. Pallavali RR, Avula S, Degati VL, Penubala M, Damu AG, Durbaka VRP. Data of antibacterial activity of plant leaves crude extract on bacterial isolates of wound infections. *Data Brief.* 2019;24:103896.

14. Joshi C, Patel P, Kothari V. Anti-infective potential of hydroalcoholic extract of *Punica granatum* peel against gram-negative bacterial pathogens. *F1000Res.* 2019:70.

15. 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. *Curr Med Chem.* 2018.

16. Barrajon-Catalan E, Herranz-Lopez M, Joven J, Segura-Carretero A, Alonso-Villaverde C, Menendez JA ea. Molecular promiscuity of plant polyphenols in the management of age-related diseases: far beyond their antioxidant properties. *Adv Exp Med Biol* 2014;824:141-59.

17. Herranz-Lopez M, Olivares-Vicente M, Encinar JA, Barrajon-Catalan E, Segura-Carretero A, Joven J, et al. Multi-Targeted Molecular Effects of *Hibiscus sabdariffa* Polyphenols: An Opportunity for a Global Approach to Obesity. *Nutrients.* 2017;9(8).

18. Fernandez-Perez MH-B, I. Regueira-Betancourt, SM. Marine bioactives in cancer treatment. *Revista electrónica Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta.* 2015;40.

19. Ryosuke I, Kisuji J, Yamazaki M. A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia* *Developmental and comparative immunology.* 2003;27:305-11.

20. Lee Y, Lee Y, Park S. Synergistic Antimicrobial Effect of *Lonicera japonica* and *Magnolia obovata* extracts and Potential as a Plant-Derived Natural Preservative. *J Microbiol Biotechnol.* 2018;28:1814-22.

21. Xue Y, Du M, Zhu MJ. Quercetin Prevents *Escherichia coli* O157:H7 Adhesion to Epithelial Cells via Suppressing Focal Adhesions. *Front Microbiol.* 2018;9:3278.

22. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio* 2005.

23. Ocana-Gonzalez JA, Villar-Navarro M, Ramos-Payan M, Fernandez-Torres R, Bello-Lopez MA. New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. *Anal Chim Acta*. 2015;858:1-15.
24. Wolfgang S. ISO11930 - A Comparison to other Methods to Evaluate the Efficacy of Antimicrobial Preservation. *Sofw Journal*. 2012;138:44-53.
25. Dufour P, Colon M. The tetrazolium reduction method for assessing the viability of individual bacterial cells in aquatic environments improvements, performance and applications. *Hydrobiologia*. 1992;232:211-8.

