



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

# **Relación entre la actividad biológica de un extracto de *Cistus salviifolius* y las condiciones climáticas**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Febrero 2020

**Autor:** Delia López Delgado

**Modalidad:** Experimental

**Tutor/es:** Enrique Barraión Catalán

## ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	Problemática de la resistencia a los antibióticos .....	1
1.2.	Compuestos naturales .....	2
1.3.	Familia Cistaceae.....	6
1.4.	Diana molecular .....	9
2.	Objetivos .....	10
3.	Material y métodos .....	11
3.1.	Extracción de las muestras .....	11
3.2.	Recopilación de datos climatológicos .....	13
3.3.	Determinación del contenido de fenoles totales.....	14
3.4.	Preparación de los inóculos .....	18
3.5.	Ensayo disco-placa (Método Kirby-Bauer).....	18
4.	Resultados y discusión.....	20
4.1.	Contenido polifenólico respecto las condiciones climáticas .....	20
4.2.	Capacidad antimicrobiana <i>M. luteus</i> respecto las condiciones climáticas.....	22
4.3.	Capacidad antimicrobiana <i>B. subtilis</i> respecto las condiciones climáticas .....	24
4.4.	Capacidad antimicrobiana respecto el perfil polifenólico.....	27
4.5.	Limitaciones de <i>E. coli</i> .....	28
5.	Conclusiones.....	29
6.	Perspectiva de futuro .....	30
7.	Bibliografía .....	31
	AGRADECIMIENTOS .....	35
	ANEXO.....	36

## RESUMEN

El actual problema de la resistencia a los antibióticos es una amenaza para la salud. Este hecho implica la búsqueda de nuevas alternativas tanto en la clínica como en la industria. Los extractos de *C. salviifolius* han demostrado tener capacidad antimicrobiana tanto para bacterias grampositivas como gramnegativas, postulándose como una posible alternativa para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana.

El objetivo de este trabajo es comprobar si la evolución del contenido polifenólico de los extractos de *C. salviifolius* está relacionada con las condiciones climáticas. Mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu se midió la cantidad de polifenoles de diferentes muestras recogidas a lo largo de 28 semanas. Más tarde se determinó la capacidad antimicrobiana mediante el método Kirby-Bauer, utilizando tres cepas bacterianas (2 grampositivas y 1 gramnegativa), y se estudió la relación con las condiciones climáticas (temperatura media y precipitaciones).

Los resultados muestran que las muestras de extractos recopilados a elevadas temperaturas tienen una mayor cantidad de compuestos polifenólicos, mientras que las precipitaciones no parecen influir en dicha cantidad. Los extractos de *C. salviifolius* demostraron actividad antimicrobiana ante las cepas bacterianas grampositivas, pero nula en la bacteria gramnegativa. También se ha demostrado una relación entre el contenido polifenólico y la actividad antimicrobiana. Ensayos futuros dentro del proyecto en el que se engloba este trabajo profundizarán en dichas relaciones y buscarán la mejora de la actividad frente a bacterias gramnegativas.

**Palabras clave:** *Cistus*, antimicrobiano, clima, polifenoles.

## **1. Introducción**

### **1.1. Problemática de la resistencia a los antibióticos**

El desarrollo de resistencia a los antibióticos es un proceso natural e inevitable.<sup>1</sup>

Los patógenos humanos bacterianos que eran susceptibles a los antibióticos ahora son resistentes a causa de mutaciones, que son intrínsecas a la evolución y el proceso de adaptación que depende del potencial de cambio de la bacteria.<sup>2</sup>

La mayoría de antibióticos utilizados convencionalmente se han vuelto inactivos debido a la rápida aparición de resistencia a los medicamentos causada por la rápida evolución bacteriana. Este hecho, junto con que las enfermedades infecciosas son la primera causa de mortalidad en el mundo, hacen que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana sea hoy en día una necesidad de gran importancia.<sup>3,4</sup>

La evolución de la resistencia entre microorganismos se puede dividir en dos periodos. En el primero, las bacterias evolucionan siguiendo un proceso natural bajo antibióticos presentes en el medio ambiente y compuestos tóxicos, formando un fenotipo de resistencia para cualquier cepa.

El segundo periodo comprende el inicio de la utilización de antibióticos con fines terapéuticos, en concentraciones mucho más altas que las que se encuentran en el ambiente, acelerando una resistencia adquirida.<sup>2</sup>

Varios estudios han demostrado el potencial de los antibióticos combinados con inhibidores específicos de bacterias. Se han probado varias moléculas, de origen natural o sintético, como inhibidores potenciales.

La mayor parte del progreso en la medicina moderna del siglo XX en cirugía, quimioterapia contra el cáncer y trasplante de órganos se atribuye al uso de antibióticos. Sin embargo, la aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos

y su difusión es un importante problema de salud pública mundial contemporáneo.<sup>3,4</sup>

Uno de los ejemplos más esclarecedores es el caso de la familia de los  $\beta$  - lactámicos. Desde el descubrimiento de la penicilina, esta familia de antibióticos ha sido muy populares, pero hoy está amenazada por la aparición de múltiples mecanismos de resistencia. Los inhibidores de la  $\beta$ -lactamasa (clavulanato, sulbactam y tazobactam) se introdujeron en la práctica clínica y mejoraron en gran medida la eficacia de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.<sup>5</sup>

La introducción de antibióticos nuevo en la terapia es baja. Prevenir la aparición conociendo las causas de la evolución de la resistencia a los antibióticos es cada vez más importante. La resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un desafío importante en el tratamiento de infecciones bacterianas.<sup>1,2</sup>

En estos días, se han propuesto muchas estrategias para superar las resistencias bacterianas, la mayoría de ellos son compuestos resultantes de la investigación sobre moléculas obtenidas a partir de fuentes naturales.<sup>5</sup>

## **1.2. Compuestos naturales**

Las plantas son una fuente de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana y más del 75% de los compuestos antibacterianos recientemente aprobados en las últimas tres décadas provienen de fuentes vegetales.<sup>6</sup>

Las plantas son una fuente prometedora de nuevos compuestos que pueden acabar siendo una alternativa a los antibióticos. El uso de antimicrobianos derivados de plantas está reemplazando cada vez más el uso de productos químicos no solo en el campo farmacéutico sino también, y de manera más relevante, en las industrias de alimentos, cosméticos e higiene.<sup>7,8</sup>

A partir de extractos botánicos se han desarrollado inhibidores de la resistencia a los antibióticos, como algunos extractos de granada, pudiendo usarse junto con los antibióticos existentes, y extendiendo la vida útil de algunos antibióticos al mejorar su eficacia terapéutica.

Extractos etanólicos de granada han mostrado buenos resultados en la conservación de alimentos al proteger contra los patógenos causantes de intoxicación alimentaria, como infecciones gastrointestinales. como por ejemplo las producidas por la *Escherichia coli enterohemorrágica*, que provoca diarrea hemorrágica. También ha exhibido actividad bactericida contra bacterias patógenas transmitidas por el agua, como por ejemplo *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella spp.* y *Listeria monocytogenes*. Esta aplicación podría ser útil sobre todo en países menos desarrollados donde el saneamiento de los alimentos está bastante comprometido.

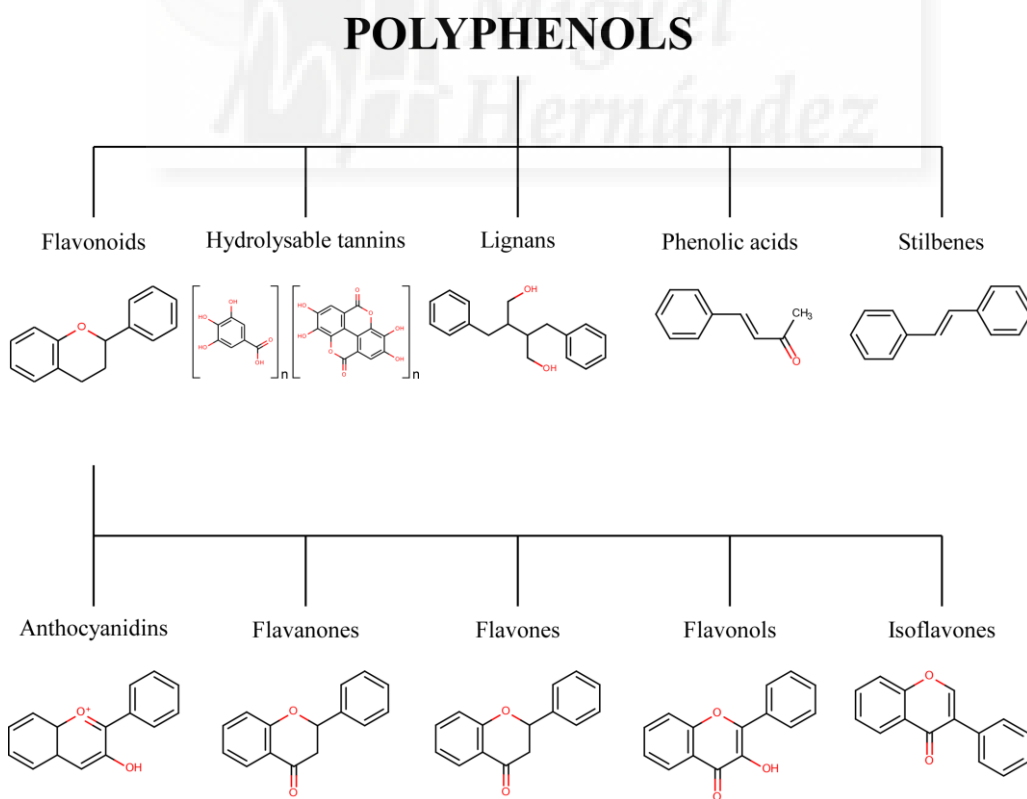
También existen estudios en los que extractos de flores de granada fueron aplicados en heridas provocando una disminución del tamaño en comparación con el grupo control y un aumento significativo de la contracción de la herida y el recambio de colágeno, provocando una buena cicatrización.<sup>9</sup>

La monoterapia ha sido el enfoque clásico abordado para la mayoría de los compuestos antimicrobianos naturales o sintéticos. Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que las terapias combinadas son más eficientes que los tratamientos basados en un solo fármaco, probablemente debido a la etiología multicausal de muchas enfermedades y / o la existencia de varios objetivos terapéuticos. Se postula que las plantas, y por lo tanto los compuestos y extractos derivados de ellas, han desarrollado promiscuidad molecular como estrategia para lograr la máxima potencia farmacológica, y varios autores han resaltado la relevancia de los efectos sinérgicos en la investigación de fitoterapia.<sup>16</sup> La terapia con múltiples fármacos se usa actualmente para tratar no solo enfermedades infecciosas sino también enfermedades no transmisibles como el cáncer o las enfermedades cardiovasculares. Las terapias combinadas

pueden aprovechar los efectos sinérgicos entre las acciones farmacológicas complementarias de leves a moderadas de los compuestos de un extracto botánico junto con el fármaco.<sup>6</sup>

El uso de compuestos derivados de plantas también ofrece importantes ventajas relacionadas con el impacto ambiental, ya que en el caso de las plantas del género *Cistus*, algunas de sus especies son ricas en resinas inflamables, por lo que su crecimiento excesivo provoca problemas ambientales e incendios forestales.<sup>7</sup>

Los polifenoles son los compuestos bioactivos más abundantes en los extractos botánicos. Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios de plantas. Se caracterizan por contener anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo o metoxilo. Sus principales familias se muestran en la **Figura 1**.



**Figura 1:** Principales familias de polifenoles.<sup>6</sup>

La actividad antimicrobiana de extractos de plantas y metabolitos secundarios de plantas aislados, como flavonoides, taninos y alcaloides, se ha demostrado para varios microorganismos. Las plantas, en general, desarrollan fenoles para protegerse contra los rayos UV y los agentes patógenos ambientales y evitar ser ingeridas por algunos animales. Lo que conlleva que la cantidad de polifenoles de las plantas esté relacionada con la temperatura de manera indirecta, ya que ésta depende fundamentalmente de las horas de insolación.

Los compuestos fenólicos se han asociado tradicionalmente a actividades biológicas tales como antioxidantes, antimicrobianos, antialérgicos, antiaterogénicos, antiinflamatorios, antitrombóticos, cardiprotectores, vasodilatadores, antihepatotóxicas, antivirales o citotóxicos.<sup>6,9,10</sup>

Una familia de polifenoles a destacar son los taninos. La concentración de taninos en las plantas no solo es específica de la especie, sino que también depende de la fertilidad del suelo y el pH, la intensidad de la luz, la edad de la planta o el estrés por temperatura. Los elagitaninos forman el grupo más grande dentro de esta familia. Además, estos compuestos se han utilizado desde la antigüedad en la industria de la curtiduría y tienen importantes aplicaciones cosméticas.<sup>6,8</sup>

Dentro de la familia de los flavonoides, se puede destacar Kaempferol, que promueve la mayor disminución en la fluidez de la membrana, al tiempo que proporcionó las mayores actividades antibacterianas contra *E. coli*.

Entre las enfermedades infecciosas causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, una de las más frecuente es la causada por *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina (MRSA), que causa una amplia variedad de infecciones adquiridas en la comunidad y en el hospital que están asociadas con una alta morbilidad. En un estudio sobre la actividad estimulante de los polifenoles y capsaicinoides de la pimienta utilizando los métodos de difusión por disco y microdilución, se determinó que la mejor combinación para *S. aureus* fue



quercetina (flavonol) con ácido cafeico (ácido fenólico), y kaempferol con quercetina para *Pseudomonas aeruginosa*. Estudios previos también mostraron que el galato de epigallocatequina (flavonoide) y el ácido tánico pueden actuar sinérgicamente con los  $\beta$ -lactámicos contra *S. aureus*.<sup>11,12</sup>

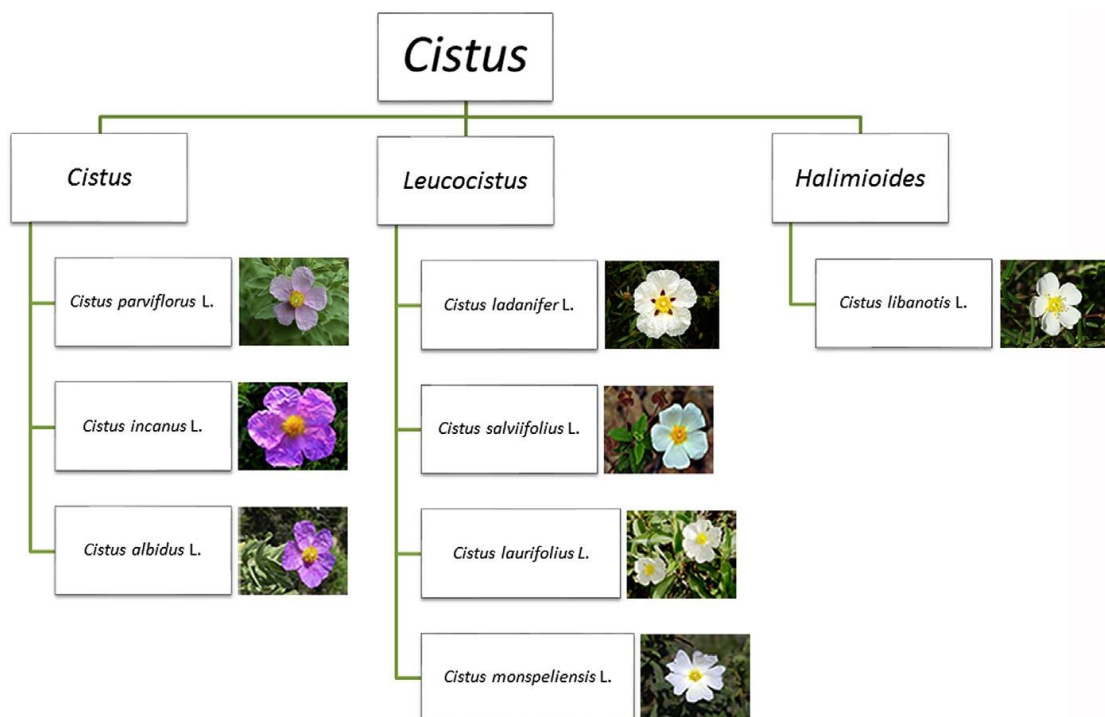
### 1.3. Familia Cistaceae

La familia Cistaceae es una gran familia nativa mediterránea de arbustos perennes con hojas perennes, opuestas, simples, normalmente de superficie ligeramente rugosa, de 2-8cm de largo. Sus flores son hermafroditas, actinomorfas e hipogíneas, con tres o cinco sépalos (generalmente los externos más pequeños que los internos) opuestos a los pétalos.<sup>13,14</sup>

Esta familia se adapta fácilmente a los incendios forestales, sus semillas resisten los incendios y se repueblan rápidamente en la siguiente temporada.<sup>9</sup>

Todas las especies de *Cistus* secretan aceites esenciales en diferentes cantidades. Parte de los estudios sobre especies de *Cistus* se centran en la composición de sus aceites esenciales, mientras que la otra parte lo hace en el complejo perfil polifenólico de sus extractos obtenidos mediante diferentes técnicas.<sup>14</sup>

El desarrollo y la evolución de las plantas están estrechamente relacionadas con su perfil polifenólico. El género *Cistus* se divide en tres subgéneros: *Cistus*, *Leucocistus* y *Halimoides*. El primero incluye plantas de flores moradas y los dos últimos comprenden especies que muestran flores blancas (**Figura 2**). Mientras que los extractos del subgénero *Cistus* están casi desprovistos de elagitaninos y contienen principalmente flavonoides, los de plantas de los subgéneros *Leucocistus* y *Halimoides* están enriquecidos de elagitaninos, especialmente *Leucocistus*, pero contienen una menor cantidad de flavonoides.<sup>13,14</sup>



**Figura 2:** Esquema del género *Cistus*.<sup>14</sup>

*C. salviifolius* ha sido utilizado tradicionalmente como agente astringente y cicatrizante en algunos países del área mediterránea e incluso como sustituto del té. El aceite de *C. salviifolius* también ha mostrado actividad neuroprotectora a la inhibición de acetilcolinesterasa lo que podría utilizarse como prevención de trastornos neurodegenerativos.<sup>14,15</sup>

*C. salviifolius* junto con *C. ladanifer* son las especies dentro del género *Leucocistus* que contienen la concentración más alta de elagitaninos. Además, *C. salviifolius* también contiene una concentración alta de flavonoides al contrario que las especies de su mismo subgénero. La actividad antimicrobiana observada para los extractos de *Cistus* podría deberse a la combinación de elagitaninos y flavonoides presentes en sus extractos.<sup>9,13</sup>

Un estudio realizado con la recogida de dos muestras de *C. salviifolius* en diferentes áreas geográficas reveló que, aunque el perfil polifenólico es cualitativamente similar, se encontraron algunas diferencias cuantitativas,

especialmente con respecto al grupo de elagitaninos. Estas diferencias revelan que el suelo y/o el clima pueden tener cierta influencia en la composición polifenólica de la planta.

Este estudio podría apoyarse en otro estudio evolutivo que ha informado sobre la diferencia de la composición polifenólica entre especies del mismo subgénero, *C. libanotis* y *C. clusii* que pertenecen a *Halimioides*. *C. clusii* se recolecta de un suelo más mineralizado con un clima más soleado y seco, lo que podría explicar la alta cantidad de flavonoles es esta especie debido a que estos compuestos son tradicionalmente considerados agentes fotoprotectores.<sup>13</sup>

En cambio, en el primer estudio, también se recolectaron muestras de *C. ladanifer* en las mismas circunstancias y utilizando el mismo método, y estas no mostraron diferencias cualitativas entre ellas. Sin embargo, cuanto más mineralizado estaba el suelo, se encontró una mayor abundancia de elagitaninos, lo que ha sugerido en este caso una relación entre la calidad del suelo y la abundancia de estos compuestos están relacionados con su origen evolutivo y subgénero, y no tanto en el suelo o el clima no tendría tanta importancia. Son necesarios más estudios para corroborar las diferentes hipótesis.

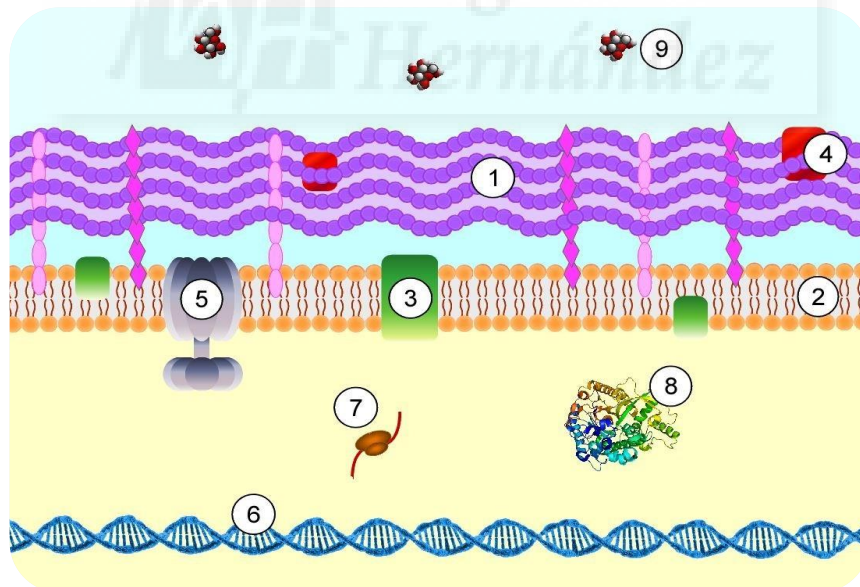
Trabajos previos del grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo han demostrado la actividad del extracto acuoso de *C. salviifolius* contra *Staphylococcus aureus*, una bacteria grampositiva era particularmente potente, solo o en combinación con antibióticos. La sinergia entre elagitaninos y flavonoles puede explicar la capacidad antimicrobiana del extracto, este hecho puede deberse a que punicalagina, uno de los compuestos de la familia de los elagitaninos, tiene la capacidad de alcanzar su objetivo molecular en la membrana bacteriana debido a su mayor tamaño, mientras que el monómero de ácido elágico, otro compuesto de la familia de los elagitaninos, puede alcanzar objetivos más profundos. Por otro lado, el extracto de *C. salviifolius* es una

combinación compleja de polifenoles; por lo tanto, pueden tener lugar otras interacciones múltiples desconocidas.<sup>11</sup>

Además, varios estudios han demostrado que los extractos acuosos de *C. salviifolius* mostraron actividad antimicrobiana más potente contra grampositivas (*S. aureus*) que contra gramnegativas (*E. coli*). Esto puede explicarse por la presencia de una barrera de permeabilidad de la membrana externa que limita el acceso de los antimicrobianos a sus objetivos en las células bacterianas *E. coli*.<sup>6,16</sup>

#### 1.4. Diana molecular

Los productos naturales antimicrobianos pueden tener varios objetivos celulares, lo que explica la diversidad de los efectos de los polifenoles, reduciendo el riesgo de resistencia.<sup>17</sup> En la **Figura 3** se pueden ver las principales dianas moleculares.



**Figura 3:** 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 (1).

En algunos casos los microorganismos se protegen formando biopelículas, llamadas también biofilms, donde las células se unen mediante una matriz y producen una serie de factores de patogenicidad, volviéndose aún más resistente contra los antibióticos. El objetivo en este caso es controlar estas biopelículas y suprimir sus miembros patógenos, aplicando polifenoles obtenidos de extractos de plantas como posible estrategia terapéutica. Un ejemplo de este tipo de microorganismos es *Streptococcus pyogenes*, los biofilms que forman se asocian a fracasos del tratamiento con antibióticos.<sup>18,19</sup>

Entre los polifenoles, cabe destacar como los más efectivos para inhibir la actividad de la  $\beta$ -lactamasa son la epicatequina, el ácido tánico, el galato de epialocatequina y la quercetina.<sup>18,20</sup>

También hay polifenoles como la quercetina que poseen diana de acción específica. *E. coli* se une a las células huésped a través de la interacción con la integrina  $\beta 1$  (receptor de glucoproteína transmembrana) del huésped. La quercetina inhibe la expresión de integrina  $\beta 1$  y la formación de FA, evitando así la infección por *E. coli*.<sup>17,21</sup>

## 2. Objetivos

Los objetivos fundamentales de este trabajo son:

1. Conocer la influencia de las condiciones climatológicas en el contenido polifenólico de los extractos de *C. salviifolius*.
2. Conocer la influencia de las condiciones climatológicas en la capacidad antimicrobiana de *C. salviifolius* sobre tres cepas bacterianas.
3. Analizar la relación entre el perfil polifenólico de *C. salviifolius* y su capacidad antimicrobiana.

### 3. Material y métodos

Todos los reactivos empleados fueron obtenidos de la casa comercial Merck-Sigma (España).

#### 3.1. Extracción de las muestras

El Instituto de investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) tiene una plantación en el Campus de Elche de la Universidad Miguel Hernández de *Cistus salviifolius* (**Figura 4**). Semanalmente durante 6 meses se han obtenido muestras de dicha plantación y realizado extracciones para obtener las muestras con las que se ha trabajado en el presente trabajo. Las fechas se detallan en la **Tabla 1**. Una vez recogidas las muestras de la planta, éstas se han lavado y secado con papel de celulosa para evitar pesar una cantidad errónea por exceso de agua. Se han triturado y pesado aproximadamente 2 g en un tubo de plástico. Se han añadido 5 ml/g de agua, y se ha realizado la extracción en las condiciones descritas previamente por el grupo de investigación.<sup>15</sup> Se ha filtrado con objetivo de eliminar las partes sólidas de la muestra. Se ha centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, alicuotado los sobrenadantes y almacenados en eppendorfs a -20°C hasta la realización de los ensayos.



<b>M1</b>	24/04/19	<b>M11</b>	01/07/19	<b>M21</b>	11/09/19
<b>M2</b>	02/05/19	<b>M12</b>	08/07/19	<b>M22</b>	18/09/19
<b>M3</b>	07/05/19	<b>M13</b>	16/07/19	<b>M23</b>	27/09/19
<b>M4</b>	14/05/19	<b>M14</b>	23/07/19	<b>M24</b>	03/10/19
<b>M5</b>	21/05/19	<b>M15</b>	30/07/19	<b>M25</b>	10/10/19
<b>M6</b>	29/05/19	<b>M16</b>	06/08/19	<b>M26</b>	16/10/19
<b>M7</b>	04/06/19	<b>M17</b>	12/08/19	<b>M27</b>	23/10/19
<b>M8</b>	11/06/19	<b>M18</b>	20/08/19	<b>M28</b>	30/10/19
<b>M9</b>	17/06/19	<b>M19</b>	28/08/19		
<b>M10</b>	25/06/19	<b>M20</b>	04/09/19		

**Tabla 1:** Fecha a la que se recogió cada una de las muestras empleadas en el presente trabajo.



**Figura 4:** Plantación de *C. salviifolius* en la Universidad Miguel Hernández de Elche.

### 3.2. Recopilación de datos climatológicos

Con la ayuda de la Estación Meteorológica de Elche se han recogido tanto las temperaturas medias (**Tabla 2**) como las precipitaciones medias (**Tabla 3**) semanalmente.

Temperatura(°C)			
<b>M1</b>	13,26	<b>M15</b>	29,04
<b>M2</b>	17,51	<b>M16</b>	27,93
<b>M3</b>	17,54	<b>M17</b>	30,07
<b>M4</b>	22,31	<b>M18</b>	27,525
<b>M5</b>	19,74	<b>M19</b>	25,7375
<b>M6</b>	20,69	<b>M20</b>	26,43
<b>M7</b>	21,17	<b>M21</b>	24,76
<b>M8</b>	23,23	<b>M22</b>	22,6
<b>M9</b>	22,73	<b>M23</b>	25,18
<b>M10</b>	23,93	<b>M24</b>	24,78
<b>M11</b>	28	<b>M25</b>	23,19
<b>M12</b>	27,24	<b>M26</b>	22,28
<b>M13</b>	28,01	<b>M27</b>	19,34
<b>M14</b>	27,73	<b>M28</b>	18,16

**Tabla 2:** Temperatura media de cada semana.



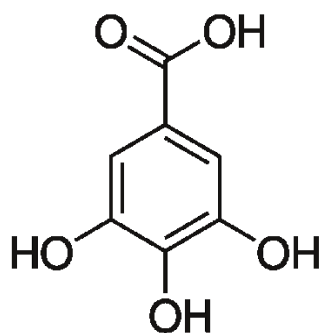
Precipitaciones (mm <sup>3</sup> )			
<b>M1</b>	17,43	<b>M15</b>	0
<b>M2</b>	0	<b>M16</b>	0
<b>M3</b>	0	<b>M17</b>	0,1
<b>M4</b>	0	<b>M18</b>	0
<b>M5</b>	0	<b>M19</b>	4,775
<b>M6</b>	0,1	<b>M20</b>	0,029
<b>M7</b>	0	<b>M21</b>	0,46
<b>M8</b>	0	<b>M22</b>	19,77
<b>M9</b>	0,1	<b>M23</b>	0
<b>M10</b>	0	<b>M24</b>	0
<b>M11</b>	0	<b>M25</b>	0
<b>M12</b>	0	<b>M26</b>	0,6
<b>M13</b>	0	<b>M27</b>	2,029
<b>M14</b>	0	<b>M28</b>	0,029

Tabla 3: Precipitaciones media de cada semana.

### 3.3. Determinación del contenido de fenoles totales

En el ensayo se ha utilizado el reactivo de Folin-Ciocalteu, una mezcla del ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), que se reducen en medio básico por acción de los fenoles del extracto, dando lugar a cromógenos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y de molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), que permiten medir la coloración azul obtenida a una longitud de onda de 700 nm.<sup>22</sup> El valor de absorción es proporcional a la cantidad de fenoles totales de nuestra muestra.

Para ello, se ha preparado un stock de ácido gálico (compuesto fenólico simple, **Figura 5**) de concentración 5 mg/mL y diferentes diluciones a partir de ese stock, para realizar más tarde una recta de calibrado.



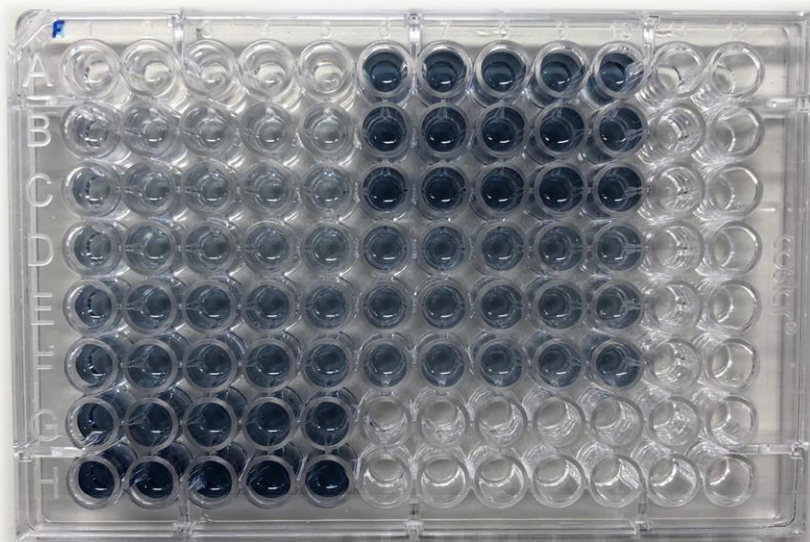
**Figura 5:** Estructura ácido gálico.

Por otro lado, se han diluido las muestras de nuestro extracto de *C.salviifolius*. Debido a los diferentes problemas para la dilución del extracto, ya que los ensayos daban grandes errores, se ha buscado un diluyente que, a determinada proporción, no interfiriera en la actividad del extracto ni pudiera producir ruido ante la medición de la longitud de onda. Tras varias pruebas, finalmente se ha escogido el metanol (MeOH) al 50%. Una vez resuspendida la muestra de extracto con MeOH se ha centrifugado 30 segundos a 3000 rpm para deshacerse de los restos sólidos que hayan podido quedar en la muestra, y finalmente se ha conservado el sobrenadante para realizar este ensayo. Todo esto ha facilitado más tarde unos resultados mejores.

A partir del sobrenadante como muestra inicial, se han diluido en agua en proporción de 1/5 y 1/10 por triplicado.

El siguiente paso ha sido preparar nuevos tubos eppendorfs para cada dilución, tanto del ácido gálico como del extracto con el siguiente contenido: 50  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, 20  $\mu$ L de los tubos de ácido gálico o de las muestras, 100  $\mu$ L de solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhidro al 20% (p/v) y 830  $\mu$ L de agua destilada. Es importante respetar el orden de los reactivos. Una vez preparados los tubos se han mezclado bien con el vórtex y se han incubado 20 minutos a temperatura ambiente, tapados para que no les de la luz ya que el reactivo de Folin-Ciocalteu es fotosensible.

Se ha utilizado una placa de 96 pocillos (p96), como se muestra en la **Figura 6**, y se han añadido 200  $\mu\text{L}$  a cada pocillo de cada tubo preparado por quintuplicado (**Tabla 4**).



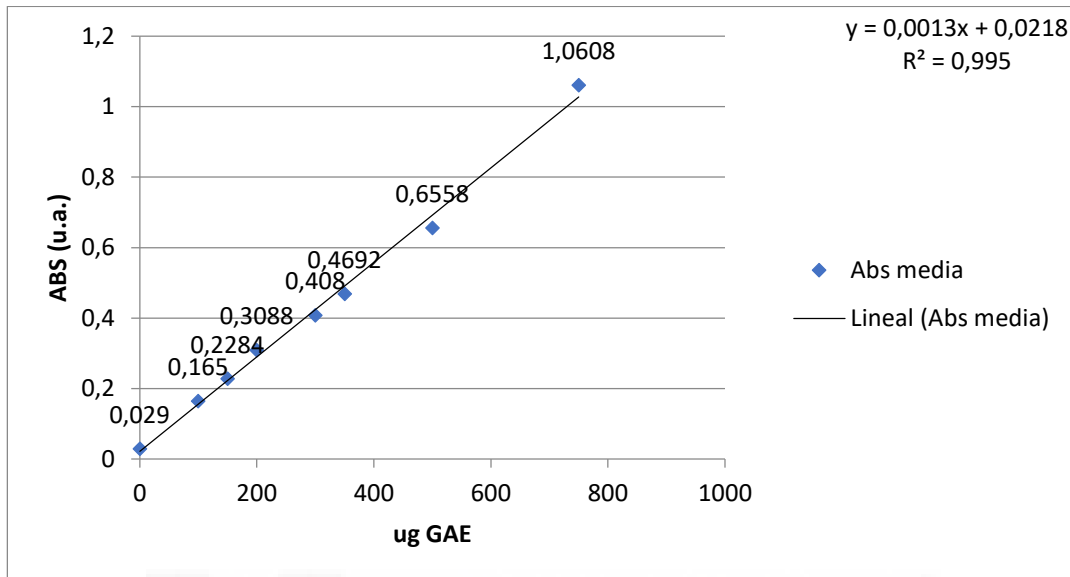
**Figura 6:** Placa p96.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P0	P0	P0	P0	P0	M1.1	M1.1	M1.1	M1.1	M1.1		
B	P1	P1	P1	P1	P1	M1.2	M1.2	M1.2	M1.2	M1.2		
C	P2	P2	P2	P2	P2	M1.3	M1.3	M1.3	M1.3	M1.3		
D	P3	P3	P3	P3	P3	M2.1	M2.1	M2.1	M2.1	M2.1		
E	P4	P4	P4	P4	P4	M2.2	M2.2	M2.2	M2.2	M2.2		
F	P5	P5	P5	P5	P5	M2.3	M2.3	M2.3	M2.3	M2.3		
G	P6	P6	P6	P6	P6							
H	P7	P7	P7	P7	P7							

**Tabla 4:** Esquema de p96, donde P son las diferentes diluciones del ácido gálico, M1 son las diluciones del extracto de muestra 1/5 y M2 son las diluciones del extracto de muestra 1/10.

Con el lector de placas *SpectroStar Omega* se ha medido la absorbancia a 700 nm. Una vez obtenidos los resultados de absorbancia, se ha realizado la recta

de calibrado con los valores de absorbancia de ácido gálico obtenidos respecto a los  $\mu\text{g}$  de ácido gálico que contiene cada tubo (**Gráfica 1**).



**Gráfica 1:** Recta de calibrado de ácido gálico.

El cálculo de la cantidad de fenoles en  $\mu\text{g}$  de nuestra muestra se ha realizado con la absorbancia media de nuestras muestras replicadas y con la ordenada y pendiente de la recta de calibrado, en este caso 0,0218 y 0,0013 respectivamente, de la siguiente forma:

$$GAE (\mu\text{g}) = Abs - \frac{\text{ordenada}}{\text{pendiente}}$$

Donde GAE (del inglés *gallic acid equivalents*) son los  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico.

Por otro lado, durante la extracción de muestra podría variar el valor de C. *salviifolius* pesado, lo que se calcularía de la siguiente forma:

$$GAE (\mu\text{g corregidos}) = \frac{GAE (\mu\text{g}) \times \text{dilución}}{g \text{ planta}}$$

### **3.4. Preparación de los inóculos**

Para realizar el césped del siguiente ensayo de disco-placa descrito en el siguiente apartado, se ha preparado anteriormente el inóculo de la bacteria. Teniendo en cuenta que todo lo que conlleve estos ensayos debe realizarse en un ambiente estéril con mechero Bunsen. Las bacterias escogidas son dos grampositivas (*Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*) y una gramnegativa (*Escherichia coli*), debido a que eran de interés para el grupo de investigación y además eran de nivel de bioseguridad, microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano.<sup>23</sup>

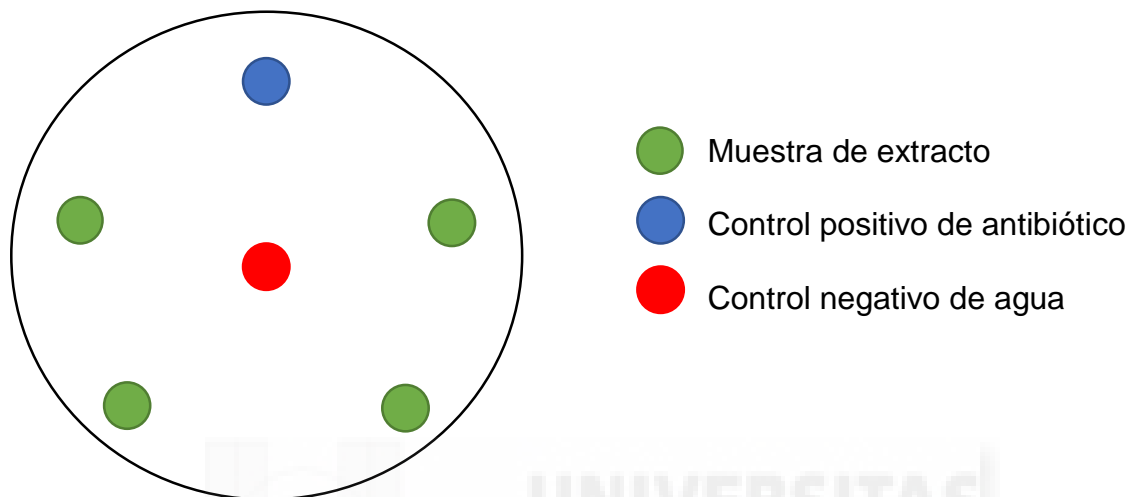
Para comenzar, hemos preparado el medio sólido en una placa de Petri (Müller Hinton Agar es un medio de crecimiento general), se ha sembrado la bacteria deseada en cuadrantes para poder obtener colonias aisladas y se ha incubado a 37°C *E. coli* o 30°C *B. subtilis* y *M. luteus* durante 24 horas.

A partir de esta placa se ha obtenido el inóculo. Para ello, en un tubo de plástico se han añadido 5 ml de medio líquido (en este caso se ha utilizado Nutrient Broth No 1 que es un medio de crecimiento general), se ha cogido una colonia aislada del cultivo madre con la punta de una pipeta (asegurándose que está bien esterilizada) y se ha suspendido en el medio. Se ha dejado crecer en agitador orbital, a 37°C *E. coli* o 30°C *B. subtilis* y *M. luteus*, y 100 rpm el tiempo suficiente para que crezca, unas 24 horas. Una vez se observe que el cultivo ha crecido, se centrifuga a 1000 rpm durante 10 minutos para tener el inóculo más concentrado y finalmente se descarta el sobrenadante.

### **3.5. Ensayo disco-placa (Método Kirby-Bauer)**

Para evaluar la sensibilidad antimicrobiana de nuestro extracto hacia las diferentes cepas se ha empleado el método Kirby-Bauer.<sup>24</sup>

Para dicho ensayo, primero se ha preparado el medio sólido (Müller Hinton Agar), se ha sembrado el inóculo ya preparado de la bacteria correspondiente (tal y como se describe en el apartado anterior) se han adicionado los discos de papel de filtro en la disposición mostrada de la **Figura 7**.



**Figura 7:** Diseño de la placa para el Método Kirby-Bauer.

Finalmente, en cada disco se han añadido 20  $\mu$ L de volumen, que es lo máximo que puede retener un disco. En el control negativo hemos utilizado agua destilada. En el control positivo hemos utilizado un antibiótico que pueda inhibir bien cada bacteria, en el caso de *E. coli* es neomicina a 0,25 mg/mL, en el caso de *M. luteus* es cloxacilina a 0,25 mg/ml, y en el caso de *B. subtilis* es cloxacilina pero le hemos bajado la concentración a 0,145 mg/ml y solo hemos añadido 10  $\mu$ L ya que formaba un halo demasiado grande en la placa. Además, las muestras de extracto en los ensayos de *B. subtilis* están concentradas a vacío debido a la menor actividad de los extractos frente a este organismo.

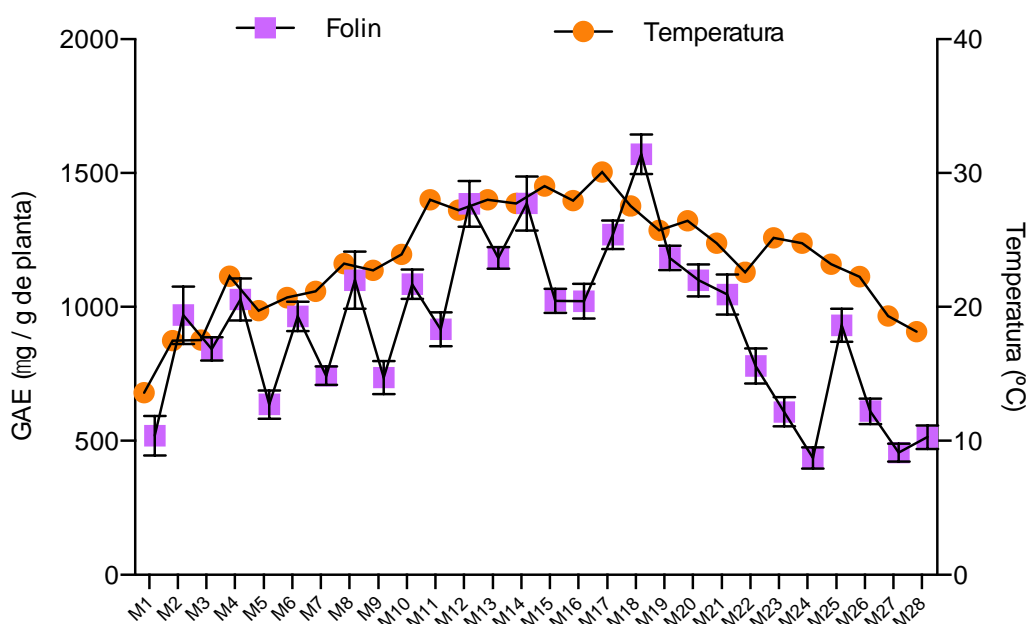
El periodo de incubación para poder visualizar halos de inhibición bien definidos es de 16, 24 y 48 horas en *E. coli*, *B. subtilis* y *M. luteus*, respectivamente. Al igual que para los inóculos, *E. coli* ha incubado a 37°C y *B. subtilis* y *M. luteus* a 30°C.

Una vez incubados se ha realizado una foto y a través del software *AxioVision Rel.4.8* se ha realizado un análisis cuantitativo. Se han medido tanto los halos de inhibición del extracto como la superficie de la placa en píxeles<sup>2</sup> y se ha determinado por lo tanto el porcentaje de halo inhibido respecto a la superficie de la placa.

## 4. Resultados y discusión

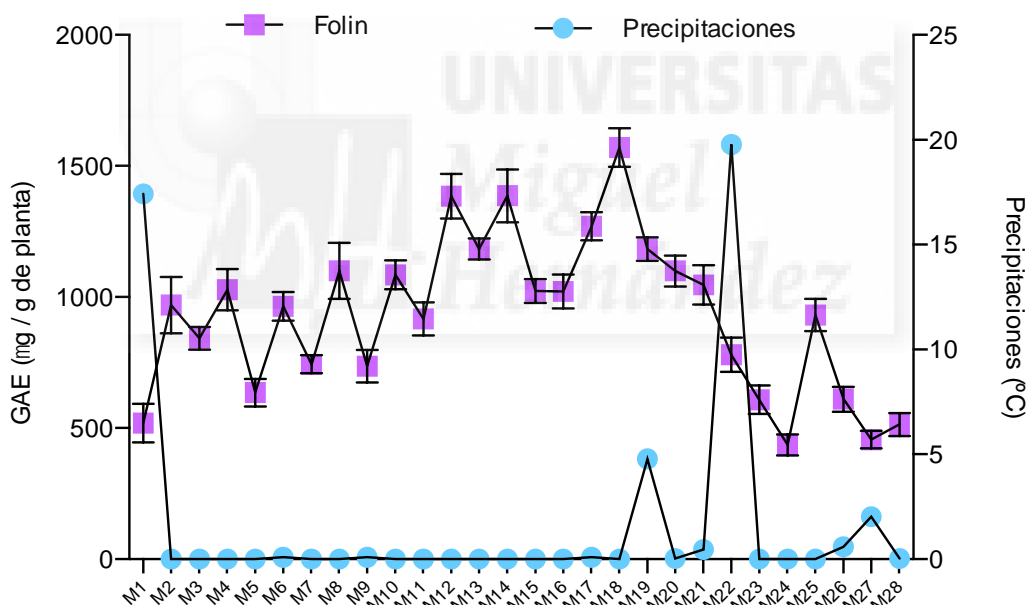
### 4.1. Contenido polifenólico respecto las condiciones climáticas

Los resultados de la correlación entre el contenido polifenólico y la temperatura muestran que a mayor temperatura hay un mayor contenido polifenólico (**Gráfica 2**). Desde la M11 hasta la M18 están los puntos con las semanas más cálidas, entre las cuales se encuentran las de mayor contenido polifenólico. Estos resultados cuadran con estudios previos en los que se relaciona el contenido polifenólico con la protección frente a la radiación solar y el estrés oxidativo que ella provoca.<sup>13</sup>



**Gráfica 2:** Contenido de polifenoles de cada muestra relacionado con la temperatura.

Las primeras y las últimas muestras, las cuales corresponden a los meses de abril y octubre respectivamente, están en los puntos con las semanas menos cálidas, desde la M1 a la M3 hay una diferencia de hasta 3°C menos comparado con la M27 y M28, pero en cambio estas últimas tienen hasta 300 µg de GAE / g de planta menos que las primeras. A partir de la semana 23 la mayoría de la plantación se lignificó, proceso típico de esta especie tras el verano y durante el invierno, perdiendo sus hojas. A este proceso no todos los especímenes sobreviven. Aunque es un proceso natural, esto puede explicar los resultados obtenidos con las últimas muestras, las cuales serían de peor calidad al estar expuestas a peores condiciones, aunque los valores de temperatura no fueran los menores.



**Gráfica 3:** Contenido de polifenoles de cada muestra relacionado con las precipitaciones.

En cuanto a la relación con las precipitaciones, el pasado año 2019 fue un año bastante seco, y sólo han recogido precipitaciones significativas en las semanas 1,19,22 y 27 y muy especialmente en la 22, que coincidió con la DANA sufrida durante el mes de septiembre. En cualquier caso, tal y como se puede apreciar en la **Gráfica 3**, a diferencia de lo que ocurre con la temperatura, no se puede



ver una clara relación entre el contenido polifenólico y las precipitaciones.

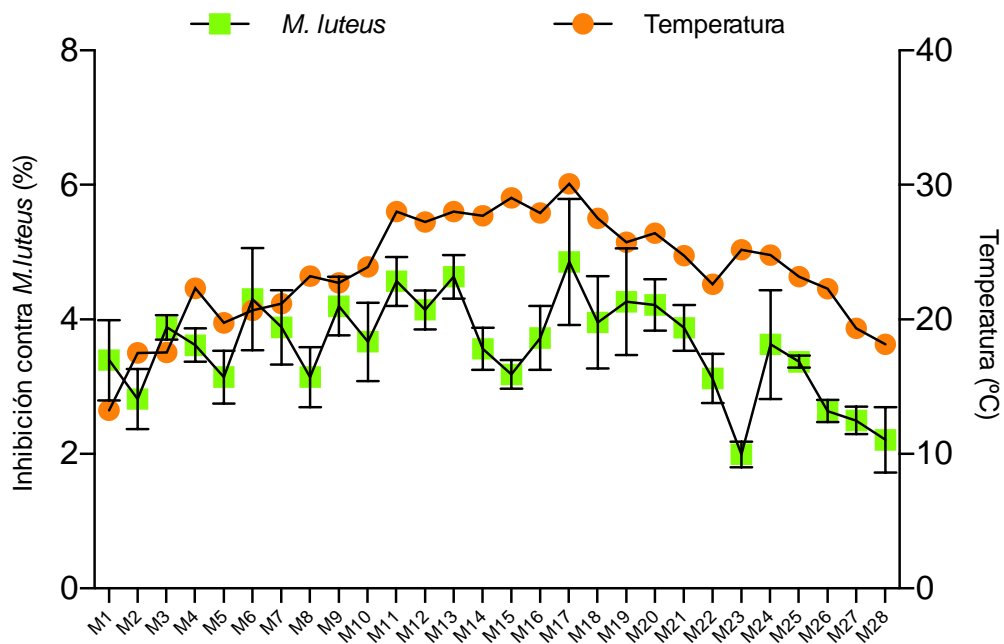
#### 4.2. Capacidad antimicrobiana *M. luteus* respecto las condiciones climáticas

En paralelo a los ensayos de contenido polifenólico, se realizaron los ensayos de actividad antimicrobiana de las diferentes muestras. El primer microorganismo frente al que se probaron los extractos fue *M. luteus* (una bacteria grampositiva). En la **Figura 8** se muestran dos imágenes de las placas de inhibición a modo de ejemplo.



**Figura 8:** placas de inhibición contra *M. luteus* en Müller Hinton Agar. La imagen de la izquierda es de la muestra M17, la que presentó un mayor porcentaje de inhibición (4,86 %) y la de la derecha, la de la muestra M23, la que menor % de inhibición del crecimiento mostró (1,99 %).

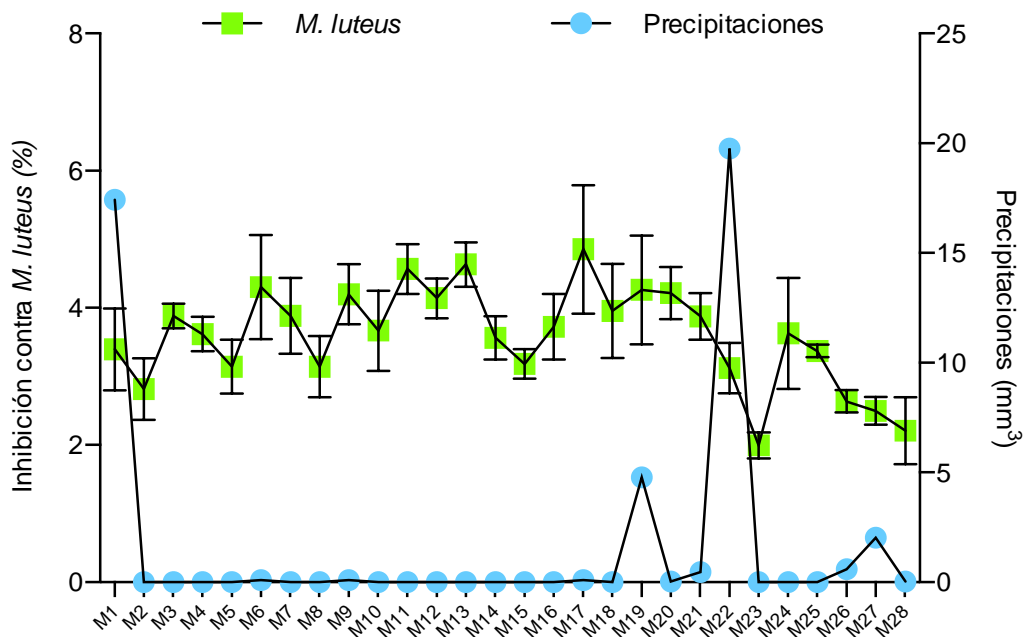
Con los porcentajes de inhibición obtenidos se obtuvo la **Gráfica 4**, en la cual se relaciona el % de inhibición frente la cepa de cada muestra respecto la temperatura media semanal.



**Gráfica 4:** Capacidad antimicrobiana de *B. luteus* respecto la temperatura.

En la inhibición de esta cepa también se ha podido ver que hay una alta correlación con la temperatura, siendo la de mayor inhibición la M17 coincidiendo con la semana más calurosa. Por otro lado, las muestras que actúan con menor inhibición vuelven a ser las primeras y las últimas debido a la diferente época del año con temperaturas más bajas.

Este extracto aún no ha sido estudiado frente esta cepa respecto el contenido polifenólico, por lo tanto, podría ser el inicio de una nueva línea de investigación. *C.salviifolius* actúa de manera eficaz contra *M. luteus*, lo que se puede apoyar en estudios previos sobre la actuación de este extracto contra las bacterias grampositivas.<sup>6</sup>

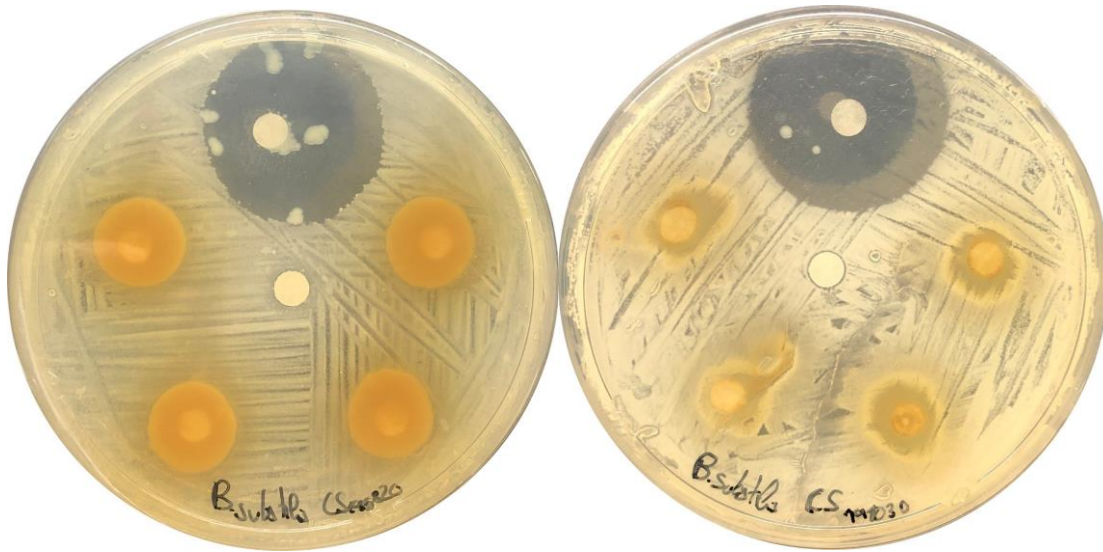


**Gráfica 5:** Capacidad antimicrobiana de *M. luteus* respecto las precipitaciones.

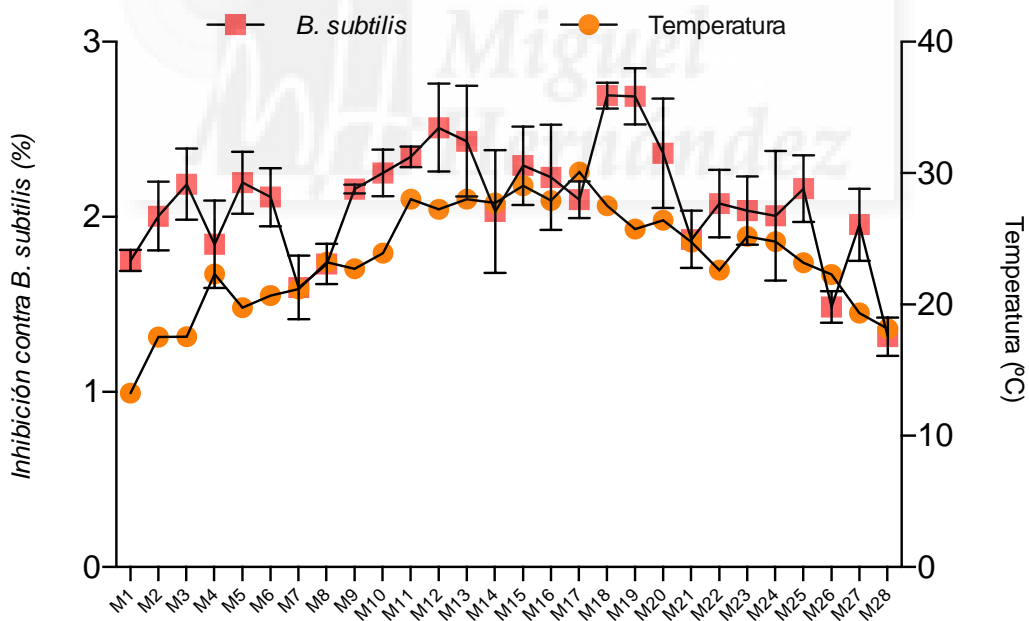
Por lo otro se obtuvo la **Gráfica 5**, donde el porcentaje de inhibición de esta cepa respecto a las precipitaciones tampoco podría concluir con una clara correlación, ya que las altas precipitaciones coinciden tanto con actuaciones de altas y bajas inhibiciones. Cabe destacar que la M22 coincide con el punto de mayor precipitación, la cual actúa con una de las menores inhibiciones.

#### 4.3. Capacidad antimicrobiana *B. subtilis* respecto las condiciones climáticas

Otro microorganismo estudiado ante el que se han probado los extractos de *C. salviifolius* ha sido *B. subtilis*. En la **Figura 9** se muestran como ejemplo dos imágenes de las placas de inhibición de este otro microorganismo. Con los porcentajes de inhibición obtenidos se obtuvo la **Gráfica 6**, en la cual se relaciona el porcentaje de inhibición contra la cepa de cada muestra respecto la temperatura semanal.



**Figura 9:** Placas de inhibición contra *B. subtilis* en Müller Hinton Agar. La imagen de la izquierda es la M18, la que presentó un mayor porcentaje de inhibición (2,69 %) y la de la derecha, la de la M28, la que menor % de inhibición de crecimiento mostró (2,01%).



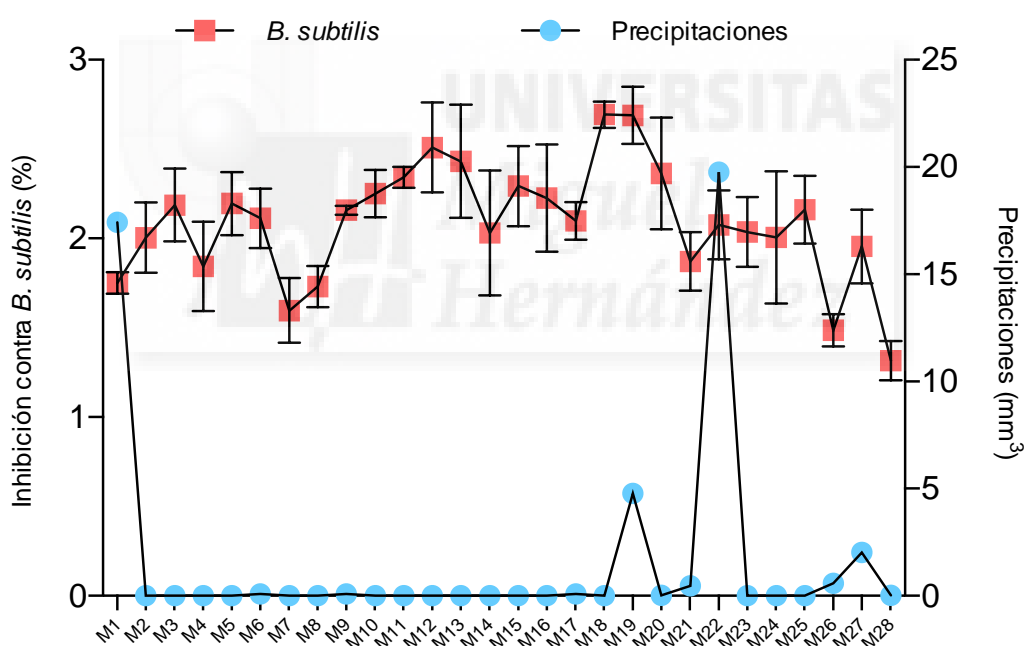
**Gráfica 6:** Capacidad antimicrobiana de *B. subtilis* respecto la temperatura.

Se puede observar cómo desde M11 a M13 que son las que actúan con mayor inhibición ante esta cepa bacteriana, después de las M8 y M9, están dentro del rango de los días más calurosos, mientras que la M1 y M9 presentan la actúan

con menor inhibición correspondiéndose con los días con las temperaturas más bajas. En la **Figura 9** se puede ver el crecimiento de estos halos de inhibición.

Debido a una mala inhibición inicial de *B. subtilis* se ha tomado la decisión de concentrar las muestras a vacío, lo que ha ayudado a ver unos halos de inhibición más definidos. Con este resultado se puede volver a confirmar la actividad antimicrobiana del extracto *C. salviifolius* con las bacterias grampositivas.

Los extractos botánicos han sido poco estudiados contra esta cepa respecto al contenido polifenólico, por lo tanto, se debería seguir con esta línea de investigación.<sup>25,26</sup>

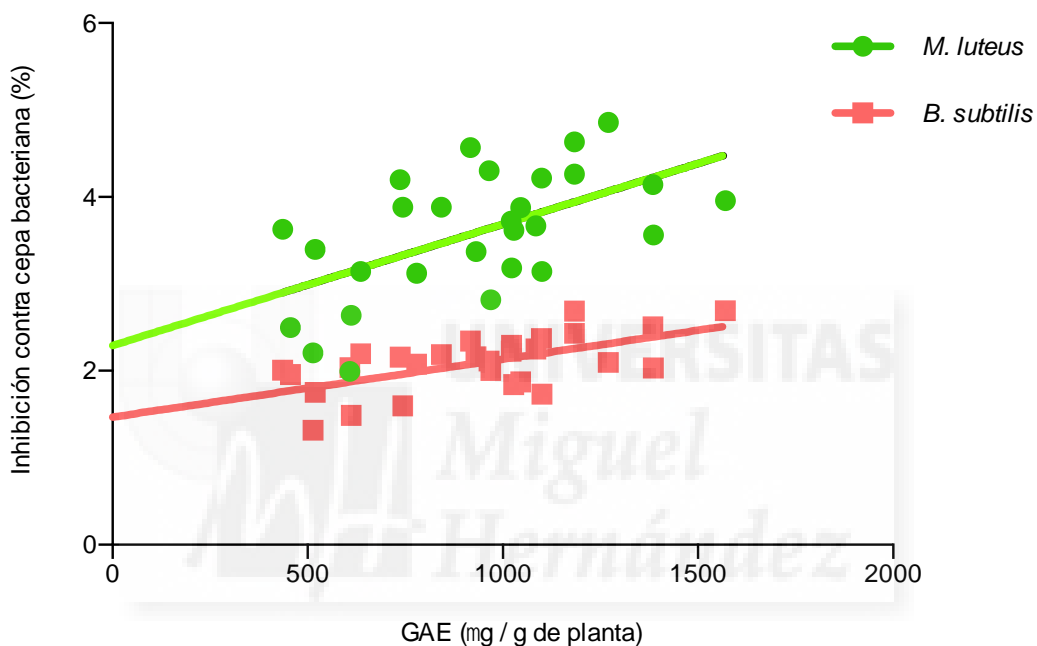


**Gráfico 7:** Capacidad antimicrobiana de *B. subtilis* respecto las precipitaciones.

En cuanto a la relación con las precipitaciones, en esta cepa, tampoco se podría concluir que exista una relación entre la capacidad antimicrobiana de *B. subtilis* y las precipitaciones (**Gráfico 7**), ya que tanto en las muestras con inhibiciones altas (M19 y M20) como en las de menor inhibición (M1 y M28) existen los puntos más altos de precipitación.

#### 4.4. Capacidad antimicrobiana respecto el perfil polifenólico

Tanto en *B. subtilis* como *M. luteus* se puede ver que existe una correlación entre la cantidad de polifenoles y la capacidad antimicrobiana en dichas cepas. (Gráfica 8). Pero también podemos confirmar que, en una misma muestra con la misma cantidad de polifenoles, *M. luteus* tiene mayor porcentaje de inhibición que *B. subtilis*.



**Gráfica 8:** Capacidad antimicrobiana de *M. luteus* y *B. subtilis* respecto el contenido polifenólico.

Aunque el extracto *C. salviifolius* inhibe en ambas bacterias grampositivas, tiene mayor actividad en *B. subtilis*. Esto puede explicar que se haya tenido que concentrar las muestras de *B. subtilis* para poder hacer el ensayo.

Aunque en las gráficas se observa un buen ajuste. El valor numérico del coeficiente de  $R^2$  respecto a *M. luteus* es de 0,3308, mientras que  $R^2$  de *B. subtilis* es de 0,3698, ambos muy bajos. Aunque *B. subtilis* ha tenido un mejor resultado, ninguna cepa bacteriana ha tenido un buen ajuste lineal, lo que hace necesario seguir optimizando los ensayos para mejorar los resultados.



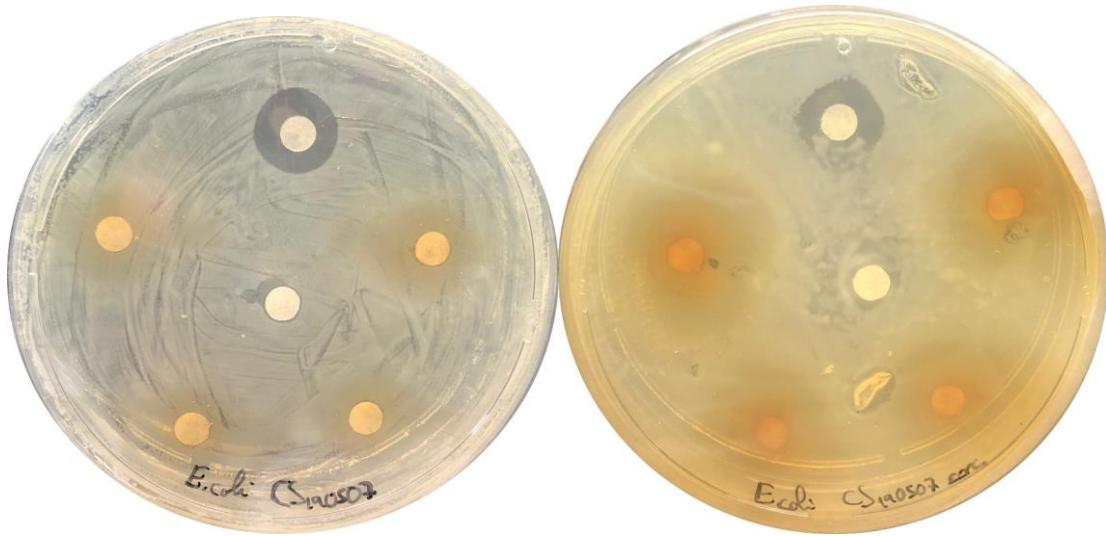
En la **Figura 10** se puede ver visualmente como la misma muestra ante diferentes cepas tiene mayor inhibición contra *M. luteus*.



**Figura 10:** placas de inhibición de M17 en Müller Hinton Agar. La imagen de la izquierda es la muestra contra *M. luteus* (4,85 % de inhibición) y la de la derecha, es la muestra contra *B. subtilis* (2,097% de inhibición).

#### 4.5. Limitaciones de *E. coli*

En un principio, como se ha explicado anteriormente en el apartado de Material y Métodos, en el ensayo de disco-placa se utilizaba dos grampositivas y una gramnegativa. La bacteria gramnegativa escogida ha sido *E. coli*. Tras repetir varias veces el ensayo, con diferentes métodos (**Figura 11**) y medios de cultivo, la escasa actividad del extracto sobre esta bacteria no ha permitido sacar ningún resultado significativo. Estudios previos con extractos similares sí que proporcionan resultados positivos con esta bacteria, pero en todos los casos se trataba de extractos estudiado mediante metodologías diferentes.<sup>15</sup>



**Figura 11:** Placas de inhibición de M3 contra *E. coli* en Müller Hinton Agar. La imagen de la izquierda se ha realizado con el extracto inicial de *C. salviifolius* y la imagen de la derecha se ha realizado con el extracto concentrado.

Este hecho es consistente con otros estudios en los que se explica que la mayor inhibición del extracto ante una bacteria grampositiva que una gramnegativa se debe a la barrera de permeabilidad de la membrana externa de *E. coli*.<sup>26</sup>

## 5. Conclusiones

1. La temperatura ha influido en el contenido polifenólico de los extractos de *C. salviifolius*. Dado que la temperatura está directamente relacionada con las horas de insolación, a mayor insolación las plantas producen más polifenoles para defenderse de los rayos UV.
2. La influencia de las precipitaciones en el contenido polifenólico de los extractos de *C. salviifolius* no ha sido concluyente, ya que no se ha encontrado correlación y además ha sido un año muy seco, lo que no permite obtener una buena estadística.
3. La influencia de las condiciones climatológicas en la capacidad antimicrobiana de *C. salviifolius* contra las bacterias grampositivas (*M. luteus* y *B. subtilis*) ha



sido muy efectiva mientras que contra gramnegativa (*E. coli*) ha sido negativa, lo que puede ser debido a la barrera de permeabilidad de la membrana externa que poseen las bacterias gramnegativas, disminuyendo la entrada de polifenoles y evitando que actúan frente a esta.

4. Hay una clara correlación entre el contenido polifenólico de *C. salviifolius* y la inhibición del crecimiento de las bacterias que se ha conseguido, teniendo mayor actividad *M. luteus* que *B. subtilis*.

## 6. Perspectiva de futuro

- Estudiar la influencia de las precipitaciones con el contenido de polifenoles del extracto de *C. salviifolius* en otro año con mayores precipitaciones.
- Optimizar y repetir el método Kirby-Bauer para el extracto *C. salviifolius* con *M. luteus* y *B. subtilis*.
- Realizar nuevos ensayos de los extractos de *C. salviifolius* contra *E. coli* y nuevas cepas bacterianas de interés clínico.
- Utilización de extractos botánicos en terapias combinadas junto con la acción de otros fármacos para reducir el rápido progreso de la resistencia bacteriana.

## 7. Bibliografía

1. Ponce de León-Rosales S, Arredondo-Hernández R, López-Vidal Yolanda. Resistance to antibiotic: A serious global problem. *Gaceta Médica de México*. Septiembre de 2015; 151(5):681-9.(2).
2. Baquero F, Alvarez-Ortega C, Martinez JL. Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environ Microbiol Rep*. 2009;1(6):469-76.
3. Braga L.C, Leite A.A.M, Xavier K.G.S, Takahashi J.A, Bemquerer M.P, Chartone-Souza E, et al. Synergic interaction between pomegranate extract antibiotics against *Staphylococcus aureus*. Julio de 2015 ;51(7):541-7.
4. M-Mandal S, O-Dias R, L-Franco O. Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. *Journal of Medicinal Food*. Octubre de 2017; 20(10):1031-8.
5. Fazly-Bazzaz B.S, Sarabandi S, Khameneh B, Hosseinzadeh H. Effect of Catechins, Green tea Extract and Methylxanthines in Combination with Gentamicin Against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of haracopuncture*. Diciembre 2016;19(4):312-8.
6. 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.
7. Morales-Soto A, Oruna-Concha MJ, Stephen Elmore J, Barraón-Catalán E, Micol V, Roldán C et al. Volatile profile of Spanish Cistus plants as sources of antimicrobials for industrial applications. *Industrial Crops and Products*. Abril 2015: 425-433.

8. 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.
9. Barrajon-Catalan E, Fernandez-Arroyo S, Saura D, Guillen E, Fernandez-Gutiérrez 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.
10. Lacombe A, C.H.-Wu V, 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*. Abril de 2010; 139(1-2):102-7.
11. Mokhtar M, Ginestra G, Youcefi F, Filocamo A, Bisignano C, Riazi A. Antimicrobial Activity of Selected Polyphenols and Capsaicinoids Identified in Pepper (*Capsicu annuum L.*) and Their Possible Mode of Interaction. *CrossMark*. Noviembre de 2017;74(11):1253-1260.
12. Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. Septiembre de 2015;66(17):2047-55.
13. Barrajon-Catalan E, Fernandez-Arroyo S, Roldán C, Guillen E, Saura D, Segura-Carretero A, et al. A systemic Study of the Polyphenolic Composition of Aqueous Extracts Deriving from Several *Cistus* Genus Species: Evolutionary Relationship. *Phytochemical Analysis*. 2010; 303-12.
14. Barrajon-Catalan E, Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Martín- Bruña N, Saura-López D, Segura-Carretero Antonio et al. Rockroses (*Cistus sp.*) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*; 2016:649-658.

15. Tomás-Menor L, Morales-Soto A, Barrajon-Catalan 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.
16. Role of membranes on the antibacterial and anti-inflammatory activities of the bioactive compounds from *Hypoxis rooperi* corm extract. *Arch Biochem Biophys*. Noviembre de 2007; 467(1):119-31.
17. Lee Y, Lee Y, Park S. Synergistic Antimicrobial Effect of *Lonicera japonica* and *Magnolia obovata* extracts and Potential as a Plant-Derived Natural 15. Preservative. *J Microbiol Biotechnol*. Noviembre del 2018;28(11):1814-22.
18. 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.
19. 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. *J Biol Chem*. Julio de 2010;285(31):24055-65.
20. Macé S, Truelstrup-Hansen L. y Vasantha-Rupasinghe H.P. Anti-Bacterial Activity of Phenolic Compounds against *Streptococcus pyogenes*. *Medicines (Basel)*. Mayo de 2017;4(2).
21. Xue Y, Du M, Zhu MJ. Quercetin Prevents *Escherichia coli* O157:H7 Adhesion to Epithelial Cells via Suppressing Focal Adhesions. *Front Microbiol*. Enero del 2019;9:3278.

22. Singleton V.L, Rossi J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. American journal of enology and viticulture. Enero de 1965;16:144-58.
23. (OMS) OMDIS. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio 2005.
24. Davis-W.W and Stout-T.R. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. Appl Microbiol. Octubre de 1971; 22(4): 659–665.
25. 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*. Biosci Biotechnol Biochem. 2015; 79(5):845-54.
26. Engels C, Schieber A, Gänzle MG. Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from mango kernels (*Mangifera indica* L.) Appl Environ Microbiol. Abril de 2011;77(7):2215-23.



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a mi tutor Enrique Barraón, por darme la oportunidad de realizar el TFG en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), teniendo la oportunidad de aprender como se trabaja en un grupo de investigación. Tanto a Noelia Sánchez, como a Javier Álvarez, como al resto de mis compañeras de laboratorio por ayudarme y apoyarme en todo momento.



## ANEXO

	DISCO-PLACA		
	FOLIN (GAE / g de planta)	Inhibición contra <i>B. luteus</i> (%)	Inhibición contra <i>B. subtilis</i> (%)
<b>M1</b>	519,54 ± 73,41	3,3958 ± 0,5971	1,7517 ± 0,0604
<b>M2</b>	969,25 ± 107,19	2,8170 ± 0,4445	2,0048 ± 0,1969
<b>M3</b>	843,19 ± 43,42	3,8844 ± 0,1816	2,1874 ± 0,2039
<b>M4</b>	1028,17 ± 78,98	3,6180 ± 0,2506	1,8434 ± 0,2499
<b>M5</b>	635,94 ± 52,42	3,1433 ± 0,3935	2,1952 ± 0,1771
<b>M6</b>	965,16 ± 54,42	4,3041 ± 0,7581	2,1128 ± 0,1657
<b>M7</b>	743,36 ± 34,27	3,8834 ± 0,5559	1,5967 ± 0,1812
<b>M8</b>	1100,02 ± 106,31	3,1409 ± 0,4462	1,7305 ± 0,1152
<b>M9</b>	736,67 ± 62,32	4,1995 ± 0,4367	2,1584 ± 0,0243
<b>M10</b>	1085,42 ± 54,71	3,668 ± 0,5823	2,2510 ± 0,1331
<b>M11</b>	917,14 ± 63,6	4,5667 ± 0,3611	2,3428 ± 0,0585
<b>M12</b>	1385,5 ± 84,8	4,1423 ± 0,2891	2,5098 ± 0,2503
<b>M13</b>	1183,92 ± 40,05	4,6343 ± 0,2891	2,4323 ± 0,3163
<b>M14</b>	1386,53 ± 100,94	3,5620 ± 0,3145	2,0303 ± 0,3501
<b>M15</b>	1023,33 ± 45,19	3,1833 ± 0,2138	2,2926 ± 0,2243
<b>M16</b>	1021,6 ± 64,89	3,7233 ± 0,4766	2,2262 ± 0,2997
<b>M17</b>	1270,41 ± 52,94	4,8555 ± 0,9359	2,0994 ± 0,1053
<b>M18</b>	1570,14 ± 73,37	3,9575 ± 0,6857	2,6927 ± 0,0739
<b>M19</b>	1183,38 ± 44,52	4,2608 ± 0,7931	2,6888 ± 0,1593
<b>M20</b>	1099,31 ± 59,55	4,2181 ± 0,3797	2,3732 ± 0,3129
<b>M21</b>	1046,65 ± 74,75	3,8751 ± 0,341	1,8719 ± 0,1631
<b>M22</b>	779,3 ± 65,05	3,1226 ± 0,3642	2,0767 ± 0,1932
<b>M23</b>	608,73 ± 54,49	1,9934 ± 0,1909	2,0369 ± 0,1955
<b>M24</b>	435,99 ± 40	3,6286 ± 0,8088	2,0062 ± 0,3706
<b>M25</b>	931,85 ± 61,52	3,3723 ± 0,0913	2,1613 ± 0,189
<b>M26</b>	611,17 ± 47,41	2,6391 ± 0,1656	1,4861 ± 0,0906
<b>M27</b>	456,22 ± 32,85	2,4979 ± 0,2026	1,9559 ± 0,2063
<b>M28</b>	513,79 ± 44,95	2,2071 ± 0,4862	1,3173 ± 0,1099