



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de un extracto de células de *Buddleja cordata*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Carol Cristina Cejudo González

Asesora académica: Dra. María Elena Estrada Zúñiga

Asesora adjunta: Dra. Cristina Burrola Aguilar

El Cerrillo Piedras Blancas, mayo de 2019

CONTENIDO	Páginas
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO	
INTRODUCCIÓN	
1.1. Importancia de las plantas medicinales	1
1.2. Metabolitos secundarios (MS)	4
1.2.1. Clasificación de los metabolitos secundarios	5
1.2.2. Producción de metabolitos secundarios mediante el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	8
1.3. Enfermedades en la población mexicana	10
1.3.1. Resistencia a antimicrobianos (RAM)	11
1.3.1.1. Mecanismo de acción de los antimicrobianos	12
2. ANTECEDENTES	
2.1. Antecedentes y caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.1. Resistencia a los antibióticos en <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.1.2. Resistencia a la meticilina en <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1.2.1. Mecanismo de acción de la meticilina	16
2.2. <i>Buddleja</i> , género de especies utilizadas en la Medicina Tradicional alrededor del mundo para tratar diferentes enfermedades, incluyendo las infecciosas	17
2.2.1. <i>Buddleja cordata</i>	
2.2.1.1. Clasificación taxonómica	20
2.2.1.2. Descripción de la planta	20
2.2.1.3. Distribución geográfica en México y condiciones de crecimiento	22
2.2.1.4. Usos medicinales y metabolitos secundarios asociados	23

3. JUSTIFICACIÓN	26
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
5. HIPÓTESIS	27
6. OBJETIVOS	27
6.1. Objetivo general	
6.2. Objetivos particulares	
7. MATERIALES Y MÉTODOS	
7.1. Obtención de biomasa	28
7.2. Análisis fitoquímico	
7.2.1. Preparación de extractos para el análisis fitoquímico	28
7.2.1.1. Rastreo fitoquímico de metabolitos secundarios	29
7.2.1.2. Cromatografía en capa fina	29
7.2.1.3. Espectrofotometría	30
7.3. Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	
7.3.1. Preparación de extractos	30
7.3.2. Ensayo Kirby-Bauer	30
7.3.3. Ensayo de microdilución en caldo	31
7.4. Análisis estadístico	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
8.1. Los extractos de células y hojas presentaron similitudes fitoquímicas	32
8.2. El extracto de células inhibió <i>in vitro</i> el crecimiento de SARM	39
9. CONCLUSIONES	47
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
11. ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de algunas plantas medicinales y sus usos en la Medicina Tradicional Mexicana	3
Tabla 2. Ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos producidos mediante CTV	9
Tabla 3. Metabolitos secundarios determinados en extractos de cultivos celulares (CC) y hojas (HM, HJ) de <i>B. cordata</i>	34
Tabla 4. Número de bandas separadas por TLC de extractos de cultivos celulares (CC) y hojas (HM, HJ) <i>B. cordata</i>	36
Tabla 5. Especies del género <i>Buddleja</i> con actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta de biosíntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios y su relación con la fotosíntesis	8
Figura 2. Colonias aisladas y tinción de Gram observada bajo microscopio óptico a 100x de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figura 3. Lesiones cutáneas provocadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 4. Estructura química de la meticilina	17
Figura 5. Estructura química del verbascósido, fenilpropanoide que se ha identificado en varias especies del género <i>Buddleja</i> .	19
Figura 6. Crecimiento de <i>Buddleja cordata</i> como arbusto y árbol	21
Figura 7. Hojas y flores de <i>Buddleja cordata</i>	22
Figura 8. Distribución geográfica de <i>Buddleja cordata</i> en México	23
Figura 9. Hojas, semillas y raíz de <i>Buddleja cordata</i> , órganos vegetales usados en la Medicina Tradicional	24
Figura 10. Estructuras químicas de algunos metabolitos secundarios identificados en <i>Buddleja cordata</i> . Monoterpeno: aucubina; ácidos hidroxicinámicos: cafeíco, ferúlico y sinápico	25
Figura 11. Espectro de absorción UV-Vis (200-800 nm) de extractos de células, hojas jóvenes y maduras de <i>Buddleja cordata</i>	39
Figura 12. Efecto antibacteriano (en % de inhibición) de extractos metanólicos de hoja y un cultivo celular de <i>Buddleja cordata</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	40
Figura 13. Halos de inhibición formados por extractos metanólicos de hojas y un cultivo celular de <i>Buddleja cordata</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figura 14. Porcentaje de inhibición bacteriana de un extracto de hojas y células de <i>Buddleja cordata</i> frente a dos cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923; 43300)	44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. RASTREO FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS	61
ANEXO 2. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE EXTRACTOS DE HOJAS MADURAS, HOJAS JÓVENES Y UN CULTIVO CELULAR DE <i>B. cordata</i>	63
ANEXO 3. TABLA DE ÍNDICES DE POLARIDAD	66

ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance (Análisis de varianza)
AK	Alcaloides
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. cordata</i>	<i>Buddleja cordata</i>
CC	Cultivos Celulares
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
CHCl ₃	Cloroformo
C ₄ H ₈ O ₂	Acetato de etilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
FLA	Flavonoides
HJ	Hojas Jóvenes
HM	Hojas Maduras
IP	Índice de polaridad
LS	Lactonas Sesquiterpénicas
MeOH	Metanol
MH	Mueller Hinton
MS	Metabolitos Secundarios
MTCC	Microbial Type Culture Collection
nm	Nanómetro
N ₂	Nitrógeno
PBP	Penicillin-Binding Protein (Proteína de unión a la penicilina)
RAM	Resistencia a antimicrobianos
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAP	Saponinas
SARM	<i>S. aureus</i> Resistente a Meticilina
TP	Terpenos
TSA	Tripticase Soy Agar (Agar Tripticasa Soya)
VB	Verbascósido

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud estima que el 80 % de la población mundial utiliza plantas medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades médicas, ya sea por tradición cultural o porque no existen otras opciones. En la medicina moderna, las plantas medicinales se pueden emplear como materia prima para la fabricación de medicamentos. Muchos de sus principios activos son metabolitos secundarios (MS), los cuales tienen un papel importante respecto a la interacción planta-entorno. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) constituye una alternativa para aumentar el rendimiento de los MS bioactivos y permite el manejo sustentable de los recursos naturales. *Buddleja cordata* es una planta empleada en la Medicina Tradicional por la población mexicana para tratar algunas enfermedades, se le atribuyen propiedades cicatrizantes, antifúngicas, analgésicas, eupépticas, diuréticas y bactericidas. Un cultivo celular de *B. cordata* produjo verbascósido (VB) en alta concentración (116.36 mg/g), significativamente superior a la determinada en la planta silvestre (10.10 mg/g). Se ha determinado que el MS VB es capaz de inhibir la síntesis proteica de *Staphylococcus aureus*, actuando como antimicrobiano.

En la actualidad la resistencia de las bacterias a los antibióticos se extiende más rápido que nunca, comprometiendo la eficacia de muchos de los medicamentos disponibles e incrementando el riesgo de propagación de la enfermedad y de muerte. *S. aureus*, es una bacteria resistente a meticilina (SARM); se estima que los pacientes con SARM tienen una mayor probabilidad de morir (64 %) en comparación con pacientes sin SARM. Es por ello que existe una búsqueda continua de antimicrobianos contra dicha bacteria. El objetivo del presente proyecto de tesis fue evaluar la actividad antimicrobiana de un extracto vegetal de *B. cordata* frente a una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina y una no resistente de la misma especie bacteriana.

Un extracto metanólico de células y hojas de *B. cordata* fue preparado y empleado a las concentraciones de 0-64 µg/mL para evaluar su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (SARM); se empleó vancomicina como control positivo (32 µg/mL) y la cepa *S. aureus* ATCC 25923 como cepa control (no resistente a meticilina).

Los extractos fueron caracterizados fitoquímicamente. El extracto de células tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de SARM (en porcentaje de inhibición de 11.1-23.3 % a las concentraciones de 0.005-64 µg/ml), mayor al obtenido en hojas (2.4-15.7 % a las concentraciones 0.01-64 µg/mL). Sin embargo, los porcentajes de inhibición obtenidos fueron menores al antibiótico de referencia (vancomicina) (95.1-100 %). El extracto de células inhibió a la cepa control (en porcentajes de inhibición de 4.1-30.1 % a las concentraciones de 0.005-64 µg/ml), así como el extracto de hojas (3.8-29.1 % bajo las concentraciones 0.01-64 µg/mL). Fitoquímicamente, los extractos de células y de hojas fueron similares, por lo que ambos pueden representar una fuente importante de MS que pueden actuar como agentes antibacterianos contra *S. aureus*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia de las plantas medicinales

A través del tiempo, el conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas se ha transmitido entre las comunidades humanas para diversos fines, incluyendo el tratamiento de las enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos. Se estima que el 80 % de la población mundial utiliza plantas medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades médicas, ya sea por tradición cultural o porque no existen otras opciones (OMS, 2004) y que al menos 35 000 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal (Annan y Houghton, 2007).

Hoy en día, muchas personas continúan con esta práctica ancestral obteniendo resultados satisfactorios, ya que los tratamientos curativos y preventivos constituyen la forma más popular del uso de la Medicina Tradicional y han prevalecido a lo largo del tiempo gracias a la transmisión oral (Flores, 2008), históricamente la Medicina Tradicional se ha utilizado para mantener la salud y prevenir y tratar enfermedades, particularmente las enfermedades crónicas (OMS, 2013), sin embargo, en muchos casos sólo se trata de conocimientos empíricos y no se validan científicamente sus propiedades farmacológicas. La Medicina Tradicional de calidad, seguridad y eficacia comprobadas contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de salud, ya que para millones los tratamientos tradicionales representan la principal fuente de atención sanitaria (OMS, 2013).

La forma en la que se definen las propiedades medicinales de las plantas ha cambiado a lo largo del tiempo, tradicionalmente se relacionaba la forma del órgano vegetal con el órgano del cuerpo humano en el que ejercería su acción, actualmente el uso se relaciona no sólo con la morfología, sino también con los olores y sabores, por ejemplo, cuando las especies presentan sabores amargos se emplean para combatir el aumento de la glucosa en la sangre, esto basado en la suposición de que lo amargo se contrapone a lo dulce (Soria, 2018).