



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**LIC. QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico  
de *Stevia rebaudiana* frente a bacterias de importancia clínica**

Para obtener el título de Licenciatura en

Químico Farmacobiólogo

**Presenta**

pQ.F.B. Jennifer Rojas Laveaga

**Director**

D. C. Sandra Luz Cabrera Hilerio

**Asesor**

D.C. José Albino Moreno Rodríguez

Octubre, 2020.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ABREVIATURAS.....	III
1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	3
3 ANTECEDENTES .....	5
3.1 Medicina tradicional.....	5
3.1.1 Medicina tradicional y la OMS.....	5
3.1.2 La herbolaria como alternativa.....	5
3.1.3 Los remedios herbales y sus efectos.....	6
3.2 Actividad alelopática.....	6
3.3 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni ( <i>Stevia</i> ).....	7
3.3.1 Propiedades de <i>Stevia</i> .....	8
3.3.2 Componentes con actividad biológica en <i>Stevia</i> .....	8
3.4 Bacterias oportunistas.....	10
3.5 <i>Staphylococcus</i> .....	11
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
3.5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	11
3.5.3 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .....	11
3.6 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina .....	12
3.7 Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) .....	12
3.7.1 Principios de la técnica .....	13
3.8 Espectrofotometría UV-visible.....	13
3.8.1 Principios de la técnica .....	13
3.8.2 Región UV.....	15
3.8.3 Región visible .....	15
4 JUSTIFICACIÓN.....	17
5 OBJETIVOS .....	18
5.1 General .....	18
5.2 Específicos .....	18

5.2.1	Obtener el extracto etanólico de <i>Stevia</i> mediante macerado y sonicación. ...18	18
5.2.2	Evaluar la actividad antibacteriana por el método modificado de difusión en agar con pozos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> y <i>S. saprophyticus</i> . .18	18
5.2.3	Caracterizar el extracto de <i>Stevia</i> por la técnica de FT-IR y UV-vis.....18	18
5.2.4	MIC del extracto vegetal por microdilución en agar frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> salvaje, <i>S. aureus</i> salvaje. ....18	18
6	DIAGRAMA DE FLUJO .....19	19
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....20	20
7.1	Material .....20	20
7.2	Material biológico .....20	20
7.3	Métodos .....20	20
8	METODOLOGÍA .....21	21
8.1	Obtención de material vegetal .....21	21
8.2	Obtención del extracto .....21	21
8.2.1	Obtención del extracto por maceración .....21	21
8.2.2	Obtención del extracto por ultrasonido .....21	21
8.3	Determinación de la concentración de los extractos por diferencia de peso. ....21	21
8.4	Preparación de medios de cultivo y resiembras.....21	21
8.5	Evaluación antibacteriana por el método de difusión en agar con pozos.....22	22
8.5.1	Obtención de la suspensión bacteriana.....22	22
8.6	Bioensayo antibacteriano del extracto etanólico de <i>Stevia</i> frente a bacterias nosocomiales .....22	22
8.7	Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....23	23
8.8	Caracterización de metabolitos secundarios por FT-IR .....23	23
8.9	Caracterización de metabolitos secundarios por UV-Vis .....24	24
9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....25	25
9.1	Determinación de la concentración del extracto por diferencia de peso.....25	25
9.2	Preliminar de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de <i>Stevia</i> frente <i>Staphylococcus</i> .....25	25
9.3	Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Stevia</i> frente a <i>Staphylococcus</i> .....27	27
9.4	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....30	30
9.5	Caracterización del extracto etanólico de <i>Stevia</i> .....31	31

9.5.1	Espectrofotometría de UV-visible .....	31
9.6	Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural del extracto de <i>Stevia</i> .....	32
10	CONCLUSIONES.....	34
11	RECOMENDACIONES.....	35
12	BIBLIOGRAFÍA.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

#	Título	Página
Tabla 1.	<i>Stevia</i> como agente antimicrobiano.	9
Tabla 2.	Longitud de onda de la región visible	15
Tabla 3.	Métodos empleados para cada determinación.	19
Tabla 4.	Concentración de los extractos etanólicos de <i>Stevia rebaudiana</i> .	23
Tabla 5.	Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Stevia</i> por maceración y sonicación frente a <i>Staphylococcus</i> .	25
Tabla 6.	Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Stevia rebaudiana</i> por maceración frente a <i>Staphylococcus</i> .	27
Tabla 7.	Actividad antibacteriana (%) del extracto etanólico de <i>Stevia rebaudiana</i> frente a <i>Staphylococcus</i> a diferentes concentraciones.	27
Tabla 8.	Concentración mínima inhibitoria del extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> frente a <i>Staphylococcus</i> .	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

#	Título	Página
Figura 1.	Tallo y hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	6
Figura 2.	Flor de <i>Stevia</i> .	6
Figura 3.	Evolución de la resistencia antibacteriana.	11
Figura 4.	Diagrama de niveles de energía de una molécula.	13
Figura 5.	Espectro electromagnético	14
Figura 6.	<i>Actividad antibacteriana del extracto de Stevia a diferentes concentraciones frente a S. aureus</i>	28
Figura 7.	<i>Actividad antibacteriana del extracto de Stevia a diferentes concentraciones frente a S. saprophyticus salvaje</i>	28
Figura 8.	<i>Actividad antibacteriana del extracto de Stevia a diferentes concentraciones frente a S. epidermidis</i>	28
Figura 9.	<i>Actividad antibacteriana del extracto de Stevia a diferentes concentraciones frente a S. aureus salvaje</i>	28
Figura 10.	Concentración mínima inhibitoria del extracto de <i>Stevia</i> .	31
Figura 11.	Espectro de UV-Vis del extracto etanólico de <i>Stevia</i> .	32
Figura 12.	Espectro IR del extracto etanólico de <i>Stevia</i> .	33

## ABREVIATURAS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
Nm	Nanómetros
Cm	Centímetros
M	Metros
ATCC	American Type Culture Collection
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
FTIR	Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier
FAR-IR	Infrarrojo lejano
HUP	Hospital Universitario de Puebla
IR	Infrarrojo
KBr	Bromuro de Potasio
KHz	Kilohertzios = 1000 Hz
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> meticilino-resistente
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro difeniltetrazolio
NIR	Infrarrojo cercano
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
TSA	Agar Soya Trypticaseína
UNAM	Universidad Autónoma de México
UV-vis	Ultravioleta-visible
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia intermedia a vancomicina
VSRA	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia total a vancomicina

## 1 RESUMEN

Las enfermedades infectocontagiosas son causa fundamental de morbilidad y mortalidad en el mundo, uno de los motivos de este problema es la emergencia de microorganismos resistentes a los antibióticos como los del género *Staphylococcus*. Lo que se busca es encontrar alternativas viables para el control de dicha resistencia con el uso de plantas capaces de sintetizar sustancias que según sus características tienen la capacidad de repeler o atraer a otros microorganismos. Las plantas han demostrado poseer metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, los cuales pueden ser utilizados como una alternativa verde para el tratamiento de enfermedades. La especie *Stevia* en los últimos años ha mostrado poseer actividad antibacteriana de importancia intrahospitalaria. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* Bertoni frente a bacterias nosocomiales *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *S. aureus* (salvaje), *S. epidermidis* (ATCC 12228) y *S. saprophyticus* (salvaje). Los extractos se obtuvieron mediante maceración a temperatura ambiente y por ultrasonido, utilizando como disolvente etanol absoluto. Para la evaluación antibacteriana se utilizó el método de difusión en agar con pozos. Se determinó la CMI (concentración mínima inhibitoria) por micro dilución en agar en microplaca. Los grupos funcionales se determinaron a partir de espectroscopía FT-IR y UV-vis. El resultado de la actividad antibacteriana evaluada a las 24 horas demostró que existe un mayor porcentaje de inhibición para *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. aureus* (salvaje), ambas de un 60% de inhibición a 40 mg/mL; para *S. aureus* ATCC 29213, una inhibición de 55% a 40 mg/mL; mientras que para *S. saprophyticus* (salvaje) se obtuvo un 40% de inhibición a ésta misma concentración de 40 mg/mL. Los porcentajes de inhibición obtenidos de los extractos antes mencionados fueron similares e incluso superiores a aquellos obtenidos con Vancomicina (utilizada como control positivo). La CMI para *S. epidermidis* ATCC 12228 fue 30 mg/mL, *S. saprophyticus* salvaje y *S. aureus* salvaje de 40 mg/mL y *S. aureus* ATCC 29213 fue 50 mg/mL. A partir de la espectroscopía de FT-IR y UV- visible se observaron picos correspondientes a



grupos oxipolienatos cíclicos del esteviósido, grupos O-H que posiblemente podrían corresponder al grupo funcional de los polifenoles. *S. rebaudiana* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*.

## 2 INTRODUCCIÓN

El incremento de morbilidad y mortalidad en el mundo es un riesgo que se complica a causa de infecciones contraídas durante la asistencia médica. En México, se calcula que 450.000 casos de infección relacionada con el ámbito intrahospitalario causan 32 muertes por cada 100.000 habitantes por año (OMS, 2014). En la actualidad la demanda del uso inadecuado de los antibióticos ha ocasionado que las bacterias causantes de enfermedades nosocomiales se vuelvan resistentes a los mecanismos de acción de los fármacos haciendo más complicado el control de éstas.

México es conocido como un país megadiverso, ya que presenta al menos el 10% de la diversidad terrestre del planeta (Mittermeier, et al., 1992). Además, ocupa el segundo lugar a nivel mundial con 4500 plantas medicinales documentadas. Nuestros antepasados utilizaban las plantas como remedios medicinales para aliviar los síntomas de la población (Gómez, 2012). Así mismo las plantas poseen actividad alelopática, es decir; la influencia directa de un compuesto químico liberado por una planta sobre el desarrollo y crecimiento de otra planta. Los compuestos alelopáticos pueden ser liberados de las plantas al ambiente por medio de la exudación de las raíces, lixiviación, volatilización y descomposición de los residuos de las plantas en el suelo (Ebana et al., 2001).

El uso de plantas es una alternativa en el control de enfermedades nosocomiales ya que poseen metabolitos secundarios que presentan actividad biológica contra diversos microorganismos como las bacterias.

*Stevia* además de ser un edulcorante natural y 400 veces más dulce que el azúcar común posee diversas propiedades como antiinflamatorio, antitumoral, antidiurético y antimicrobiano.

Existen algunos trabajos reportados de *Stevia rebaudiana* y su actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* causante de la caries (Guevara, 2017). Además, extractos de *Stevia* presentan actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*) (Federico et al., 2017). También de la actividad antimicrobiana de extractos

de hoja y tallo de *Stevia* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *Fusarium oxysporum* (Morales, 2017). Asimismo, extractos de *Stevia rebaudiana* con actividad antibacteriana frente a bacterias ambientales *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa* (Miranda et al., 2017).

Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* frente a bacterias de importancia clínica, así como la determinación de la MIC y la determinación de grupos funcionales por espectroscopía FT-IR y UV-vis.

### **3 ANTECEDENTES**

#### **3.1 Medicina tradicional**

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, es una parte importante de la cosmovisión de los pueblos indígenas y representa el conocimiento milenario sobre la madre tierra y el uso de plantas medicinales que los indígenas han resguardado y que tiene un valor incalculable fortaleciendo y preservando su identidad (Silva, 2017).

##### **3.1.1 Medicina tradicional y la OMS**

Actualmente la medicina tradicional esta usada ampliamente y se está extendiendo rápidamente en muchos países, es por eso que la Organización Mundial de la Salud (OMS) efectuó un análisis general de la situación actual de la medicina tradicional en todo el mundo, colaborando con expertos y definiendo una estrategia sobre la medicina tradicional de 2014-2023 (Perdomo, 2014).

Esto tiene como finalidad ayudar a desarrollar políticas dinámicas con el fin de integrar la medicina tradicional a los sistemas nacionales de salud.

##### **3.1.2 La herbolaria como alternativa**

La medicina herbolaria es el resultado de un producto derivado de una planta el cual es utilizado con fines terapéuticos. Esta incluye a un gran número de sustancias extraídas de hierbas, las cuales comprenden desde el té hecho en casa de plantas recolectadas con fines medicinales hasta productos que tienen que ser aprobados por organismos de regulación gubernamental para su venta (Bauer, 2000).

Al remedio herbolario preparado de plantas medicinales, o sus partes, individuales o combinadas y sus derivados, se le atribuye por conocimiento popular o tradicional, el alivio de la enfermedad o de alguno de sus síntomas (NOM-221, 2002), (Carrillo et al., 2010).

La mayoría de los remedios herbolarios se obtienen por extracción alcohólica, acetónica o acuosa de semillas, hojas, tallo, corteza o raíces de dichas plantas y en ocasiones sin manipulación (Asgari, 2014).

La medicina alternativa o complementaria está muy arraigada en las culturas tradicionales de muchos países y está resurgiendo en prácticamente todo el mundo.

### **3.1.3 Los remedios herbales y sus efectos**

Las plantas, crudas o sus extractos pueden contener mezclas complejas de sustancias químicas orgánicas que incluyen ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos y terpenos. Cualquiera de los componentes mencionados puede tener una actividad biológica en humanos. Además, el procesamiento de estas plantas utilizando medios físicos como calentamiento o hervido puede alterar la actividad farmacológica de los constituyentes orgánicos, que también pueden verse afectados en su concentración dependiendo de factores ambientales de cultivo o localización como características del suelo, humedad y temperatura ambiental, altitud, etc. Así como la parte vegetal utilizada (hojas, tallos, flores, raíces, semillas) (Carrillo et al., 2010).

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios y se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, y muchos desempeñan funciones ecológicas, y se caracterizan por sus diferentes usos como medicamentos, plaguicidas, bactericidas, insecticidas, herbicidas, colorantes o perfumes (Ávalos et al., 2009).

## **3.2 Actividad alelopática**

Es un fenómeno que implica la inhibición directa de una especie por otra ya sea vegetal o animal, usando sustancias tóxicas o disuasivas.

Muchas especies se regulan unas a otras por medio de la producción y liberación de repelentes, atrayentes, estimulantes e inhibidores químicos. La alelopatía se

ocupa de las interacciones químicas: planta-vertebrado, planta-planta, planta-insecto y planta-microorganismo, ya sean estas perjudiciales o benéficas.

En los tejidos vegetales hay ciertas sustancias que constituyen un sistema de defensa. Estas sustancias son llamadas aleloquímicos o alomónicos, son compuestos moleculares que actúan como señales o como mensajeros de disuasión, produciendo efectos repulsivos, anti alimentarios, tóxicos (Rice, 1984).

El efecto alelopático de una planta sobre otro organismo no es total para bien o para mal, sino que está regido por manifestaciones de mayor o menor grado según sean las características de los organismos involucrados. El control orgánico con plantas se ha utilizado desde hace mucho tiempo y su funcionamiento se basa en repeler o atraer insectos, gusanos y agentes vectores de enfermedades (Callaway, 2003).

### 3.3 *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Stevia*).

Es una planta originaria del sureste de Paraguay, miembro de la familia de asteráceas, conocida como “hoja o hierba dulce”. Es un arbusto perenne que puede alcanzar 65-80 cm, pero que cultivadas pueden llegar hasta 1.0 m de altura, sus hojas lanceoladas (figura 1) tienen aproximadamente 5 cm de longitud y 2 cm de ancho y se disponen alternadas enfrentadas de dos en dos, además de sus flores blanquecinas características (figura 2) (Ahmed et al., 2016).



Figura 1. Tallo y hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Figura 2. Flor blanquecina característica de *Stevia rebaudiana*

### **3.3.1 Propiedades de *Stevia***

*S. rebaudiana* es un edulcorante natural usado en bebidas y otros productos alimenticios, energizante, digestiva (Sergio et al., 2011).

La parte vegetal utilizada son las hojas, las cuales son unas 30 veces más dulces que el azúcar y extracto refinado de las mismas llamado esteviósido y unas 200-300 veces más dulce que el azúcar convencional. Al tratarse de cristales de rabaudiósido, es 400 veces más dulce (Duarte, 2008). Sin embargo, el consumo de la hoja deshidratada como infusión está creciendo debido a sus numerosas propiedades funcionales como: antihiperlipidémica, antitumoral (Chen et al., 2005), antiinflamatoria, antihipertensiva (Lee et al., 2001), diurética (Lahlou et al., 2006), inmunomoduladora (Siddique et al., 2014) y antibacteriana (Kujur et al., 2010).

Las hojas de *Stevia* contienen una mezcla compleja de diterpenos, triterpenos, taninos, estigmasterol, aceites volátiles y glucósidos diterpenos “dulces”, no tóxicos, no mutagénicos y de bajo poder calórico (Jackson et al., 2009). Además, que las hojas pueden contener compuestos clorofílicos, carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides así como vitamina A, B2, B6, aminoácidos, carbohidratos, enzimas, ácidos orgánicos, polisacáridos, hormonas vegetales, bacterias fotosintetizadoras, microelementos, etc. (Oue y Ueno, 2003).

### **3.3.2 Componentes con actividad biológica en *Stevia*.**

Los extractos de *Stevia* tienen actividades antibacterianas que en algunos casos han sido asociados con la presencia de lactonas sesquiterpénicas y/o flavonoides (Cerdeira-García 2001). Los flavonoides son un grupo de sustancias fenólicas de origen vegetal que se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado del tipo (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), estas sustancias se encuentran en los tejidos de las plantas superiores e incluyen las flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavononas y las chalconas (Pokorny et al., 2005).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano (heterocíclico). Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del

daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. (Martínez et al., 2005).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Los flavonoides se clasifican en varios grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavononas, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides (Martínez et al., 2002).

Hasta el momento se tienen registrados 225 compuestos con actividad antibacteriana de al menos 75 especies de plantas mexicanas, estos compuestos incluyen una amplia variedad de metabolitos secundarios como terpenos 40%, glicolípidos 16.8%, flavonoides 9.77%, derivados fenólicos 4.8%, y otros compuestos como pironas, cumarinas, ácidos grasos, alcaloides (Sharma et al., 2017). De acuerdo con estos datos la actividad antimicrobiana de las plantas de *Stevia rebaudiana* podrían darse por los fenoles, taninos y flavonoides presentes (Federico et al., 2017).

Adicionalmente, a esta planta se le atribuyen propiedades antibióticas especialmente contra bacterias como *Streptococcus mutans*, microorganismo asociado a la caries dental, (Pérez, 2013) y antifúngicas contra el hongo *Candida albicans* causante frecuente de vaginitis (Parrera et al., 2015).

*Stevia* ha tenido un auge muy importante y ha sido estudiada por su propiedad antibacteriana.

Existen varios reportes sobre *Stevia* con actividad antibacteriana frente a bacterias ambientales pero muy pocos reportados sobre la actividad antibacteriana sobre bacterias de importancia clínica (Tabla 1). En la siguiente tabla se muestran algunos reportes de actividad antibacteriana de *Stevia*.



**Tabla 1. *Stevia* como agente antimicrobiano**

Titulo	Contenido	Referencia
Extractos etanólicos, hexánicos, acuosos y tetracloruro de hoja.	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> .	Miranda et al., 2017.
Extracto acuoso por macerado de hoja.	Comparación de la efectividad antibacteriana frente <i>S. mutans</i> y <i>S. sanguinis</i> .	Massón et al., 2016.
Extracto acuoso y metanólico de hoja.	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> .	Federico et al., 2017
Extractos de hoja y tallo.	Actividad antioxidante y antimicrobiana <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>F. oxysporum</i> .	Morales, 2017.

Las enfermedades infectocontagiosas continúan siendo una causa fundamental de morbilidad y mortalidad en el mundo, este es uno de los motivos en situación de emergencia de microorganismos resistentes a los antibióticos.

### **3.4 Bacterias oportunistas**

Las bacterias oportunistas normalmente no patógenas y que solo producen una infección cuando las defensas del huésped están disminuidas o como resultado de varios factores nosocomiales. Algunos de este tipo de microorganismos son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* (Coniel et al., 2010).

Dentro de los agentes implicados en la prevalencia de enfermedades se encuentran los bacilos Gram negativos: *Pseudomona aeruginosa*, Enterobacterias: *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *E. coli*, por mencionar algunos. Y el grupo de los cocos Gram positivos: *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y los *Enterococcus* (Pérez et al., 2010).

### **3.5 *Staphylococcus***

Los cocos se asociaron por primera vez a enfermedades humanas cuando fueron observados en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos. En 1800 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston llamó a estos cocos “*Staphylococcus*” derivando el nombre de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokus* (frutilla) (Cervantes et al., 2014).

#### **3.5.1 *Staphylococcus aureus***

Se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piógenas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, prótesis y otras. También causa una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, intoxicación alimentaria y el síndrome de la piel escaldada (Hessen et al., 2000).

#### **3.5.2 *Staphylococcus epidermidis***

Es integrante de la microbiota normal de piel aunque se ha visto incremento de casos en la población a partir de infecciones de piel y anexos, colonizando cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama), y también es causa de infecciones profundas en huéspedes inmunocomprometidos (Bennet et al., 2014). Tiene la capacidad de producir un biofilm que le confiere una adherencia muy eficiente, por lo que se puede unir a superficies, además este biofilm forma una barrera que dificulta el paso de los antibióticos (Pinheiro et al., 2014).

#### **3.5.3 *Staphylococcus saprophyticus***

Es un importante agente causal de infecciones agudas en el tracto urinario en mujeres ambulatorias en edad sexual activa y está considerado como el segundo agente más frecuente de cistitis después de *E. coli* en esta población.

Este se adhiere significativamente mejor a las células uroepiteliales que *S. aureus* y *S. epidermidis* y no se adhiere a otros tipos celulares como piel y células mucosas bucales (Fariña et al., 2005).

### 3.6 *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina

En la actualidad *S. aureus* continua siendo uno de los patógenos más importantes y versátiles de la especie humana, ocupando un lugar preponderante en las infecciones de piel y tejidos, cuyo tratamiento se hace cada vez más complejo debido a la capacidad del microorganismo de desarrollar resistencia a los antibióticos (figura 3) mediante una amplia gama de mecanismos que incluyen la producción de enzimas, la síntesis de blancos moleculares de baja afinidad por los antimicrobianos, las mutaciones o modificación enzimática y las alteraciones en la síntesis o la estructura de la pared celular (Rodríguez, 2005).

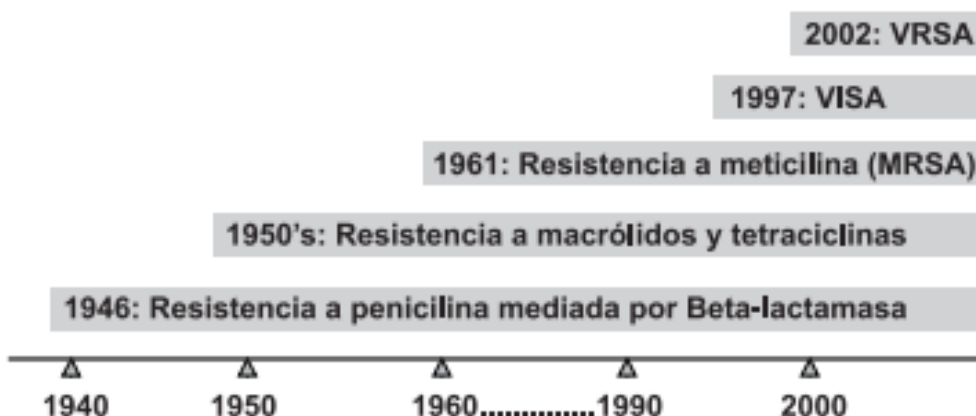


Figura 3. Evolución de la resistencia antibacteriana en *S. aureus*. MRSA: *Staphylococcus aureus* metilino-resistente, VISA: *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia a vancomicina, VSRA: *Staphylococcus aureus* con resistencia total a vancomicina (Rodríguez et al., 2005).

### 3.7 Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los extractos vegetales han demostrado tener un alto potencial en actividad antibacteriana. Existen técnicas analíticas como UV-Vis, HPLC, FTIR entre otras; para determinar compuestos y grupos funcionales que conforman los metabolitos secundarios de la planta.

### **3.7.1 Principios de la técnica**

La espectroscopia de absorción infrarroja (IR) es el método más utilizado para determinar las estructuras de moléculas con características de absorción de la radiación infrarroja según su vibración molecular. La región IR va de 12800 a  $10\text{cm}^{-1}$  y se puede dividir en la región de IR cercano (NIR) ( $12800\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ ), IR medio ( $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ ) e IR lejano o FAR-IR ( $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ ), siendo el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra. Por su parte el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. Es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos y organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales.

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de esta molécula. Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad ya que permite estudiar cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, polímeros, geles, fibras, films, gases o superficies (Stuart, 2004).

La Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales.

## **3.8 Espectrofotometría UV-visible**

### **3.8.1 Principios de la técnica**

Es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna. Esto permite poner en funcionamiento ciclos vitales como la fotosíntesis en plantas y bacterias. La absorción de un fotón hace saltar un electrón desde un nivel de energía baja hasta un orbital de alta energía. Se produce un pigmento en estado excitado (figura 4), con un nivel de energía más elevado que el pigmento en estado de reposo, pero este estado excitado tiene una vida muy corta, alrededor de una milmillonésima de segundo.

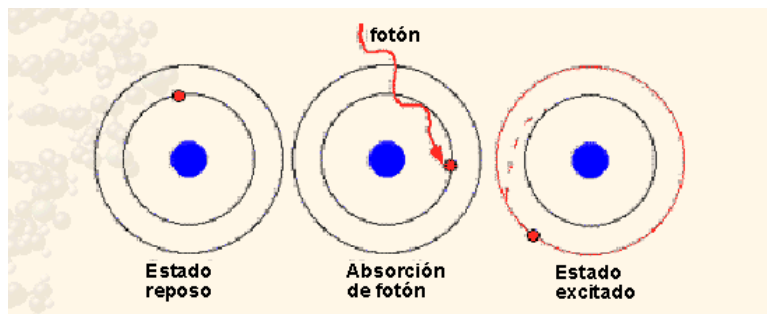


Figura 4. Diagrama de niveles de energía en una molécula. La absorción de energía luminosa hace que la molécula pase desde un estado de reposo a otro excitado. Posteriormente la molécula relaja su energía mediante distintos mecanismos (vibración, rotación, etc.).

En espectroscopía el término luz no solo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan regiones del ultravioleta (UV cercano, de (195-400 nm) y el visible (400-780 nm), (figura 5).

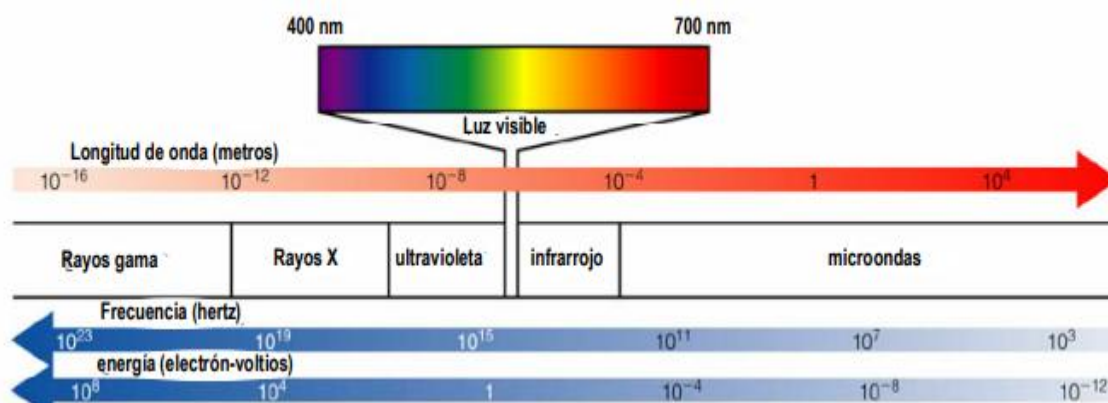


Figura 5. Espectro electromagnético

### 3.8.2 Región UV

Se define como el rango de longitudes de onda de 195-400 nm. Es una región de energía muy alta. Provoca daño al ojo humano, así como quemadura común. Los compuestos con dobles enlaces aislados, triples enlaces, enlaces peptídicos, sistemas aromáticos, grupos carbonilos y otros heteroátomos tienen su máxima absorbancia en la región UV. La fuente de radiación ultravioleta es una lámpara de deuterio.

### 3.8.3 Región visible

Se denomina espectro visible a la región del espectro electromagnético que el ojo humano es capaz de percibir. A la radiación electromagnética en este rango de longitudes de onda se le llama luz visible o simplemente luz. No hay límites exactos en el espectro visible; el ojo humano responderá a longitudes de onda desde 400 a 700 nm aunque algunas personas pueden ser capaces de percibir longitudes de onda desde 380 a 780 nm (Díaz et al., 2000).

**Tabla 2. Longitud de onda de la región visible**

<b>Longitud de onda aproximada (nm)</b>	<b>Color de luz que se absorbe</b>	<b>Color de luz que se refleja o ve</b>
390-435	Violeta	Amarillo verdoso
435-490	Azul	Amarillo
490-580	Verde	Rojo
580-595	Amarillo	Azul
595-650	Naranja	Azul verdoso
650-780	Rojo	Verde azulado

#### 4 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad es de suma importancia la resistencia bacteriana a los antibióticos, por el mal uso que se les da, el uso indiscriminado de ellos en tratamiento incompletos o la automedicación han llevado a que los fármacos destinados para el control de enfermedades ya no sean efectivos. Por lo que se buscan alternativas verdes o naturales para combatir este problema mayor de salud pública. El uso de plantas medicinales o con principios bioactivos es una de las alternativas viables para el control de distintas enfermedades ya que poseen actividad alelopática, es decir que contienen compuestos secundarios que son expresados en mayor cantidad cuando se sienten amenazadas por el cambio climático, las plagas, la competencia de crecimiento de otras plantas cercanas y/o insectos. Estos compuestos son llamados metabolitos secundarios y poseen propiedades curativas. *Stevia*, es una de las alternativas para combatir enfermedades, posee diversas propiedades funcionales como: antidiurético, antiinflamatorio, antitumoral, antihiperglicémica y antimicrobiano. El uso de extractos vegetales aunado a las nuevas tecnologías tiene un auge en nuestros días. La biotecnología en conjunto con la química y otras ciencias han ido creciendo y han contribuido para facilitar la exigencia y existencia humana. El utilizar extractos naturales es una alternativa verde y podemos aplicarla para la innovación de nuevos antibióticos.



## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 General**

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia* frente a bacterias de importancia clínica (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*).

### **5.2 Específicos**

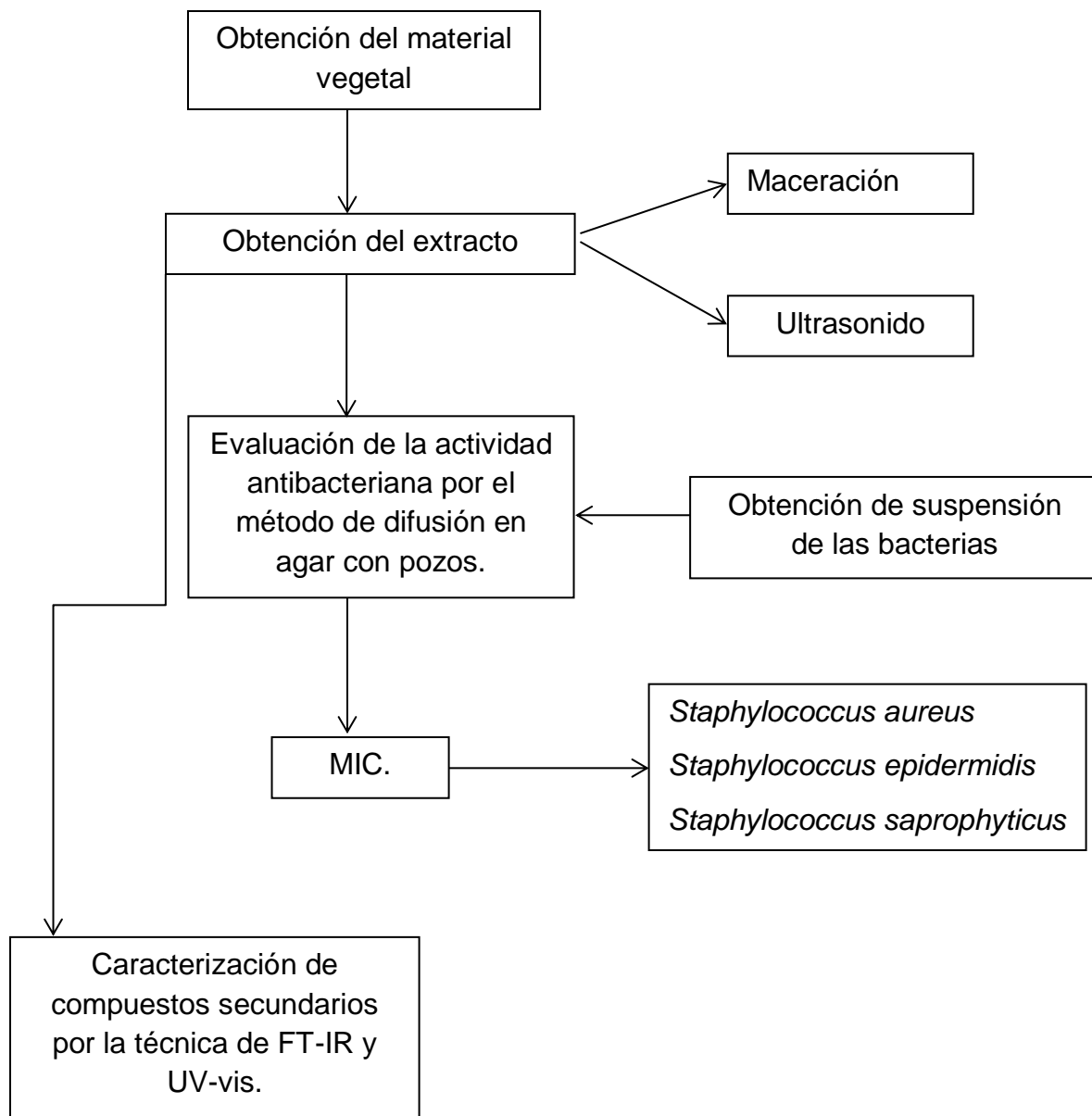
5.2.1 Obtener el extracto etanólico de *Stevia* mediante macerado y sonicación.

5.2.2 Evaluar la actividad antibacteriana por el método modificado de difusión en agar con pozos frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*.

5.2.3 Caracterizar el extracto de *Stevia* por la técnica de FT-IR y UV-vis.

5.2.4 MIC del extracto vegetal por microdilución en agar frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* salvaje, *S. aureus* salvaje.

## 6 DIAGRAMA DE FLUJO



## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material

Material de vidrio y reactivos de grado analítico esencial para cada determinación. Los ensayos se realizaron en el edificio Multilaboratorios (EMA6) y la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

### 7.2 Material biológico

Se obtuvieron muestras de *Stevia* en presentación comercial de hojas secas de la marca Todo natural ®

Las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *S. epidermidis* ATCC12228, *S. saprophyticus* salvaje y *S. aureus* salvaje, las cuales fueron donadas por el Laboratorio de análisis clínicos de la torre medica de especialidades del Hospital Universitario de Puebla (HUP).

### 7.3 Métodos

Los métodos empleados en esta investigación se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Métodos empleados para cada determinación.**

Determinación	Método	Referencia
Obtención de extractos	Maceración	(KUNTAL, 2009)
	Extracción por ultrasonido	(GAO, 2015)
Bioensayo de la actividad antibacteriana	Difusión en agar con pozos	(RAMIREZ, 2009)
Concentración mínima inhibitoria (MIC)	Microdilución por microplaca	(RAMIREZ, 2015)
Caracterización de compuestos secundarios	FT-IR	(STUART, 2004)
	UV-vis	(DÍAZ et al., 2000)

## **8 METODOLOGÍA**

### **8.1 Obtención de material vegetal**

El material vegetal se obtuvo de una marca comercial “TODO NATURAL” ®

### **8.2 Obtención del extracto**

#### **8.2.1 Obtención del extracto por maceración**

El extracto etanólico se realizó por macerado utilizando una relación de 1:10 m/v con hojas secas y pulverizadas de *Stevia rebaudiana* y etanol absoluto. Se colocó en agitación constante por 40 minutos a 1100 rpm a 30°C. Se filtró con papel Whatman No.5 y se concentró por rotavapor. Se almacenó en frasco ámbar a una temperatura de 4°C.

#### **8.2.2 Obtención del extracto por ultrasonido**

El extracto etanólico se realizó por ultrasonido utilizando una relación 1:10 m/v con hojas secas y pulverizadas de *Stevia* y etanol absoluto. Se colocó dentro del baño ultrasónico (Branson 3510) de una sola frecuencia (47kHz) por 40 minutos a 40°C. Posteriormente se filtró con papel Whatman No.5 y se concentró por rotavapor. Se almacenó en frasco ámbar a 4°C.

### **8.3 Determinación de la concentración de los extractos por diferencia de peso.**

Tanto al extracto obtenido por maceración como el obtenido por ultrasonido, se les determinó la concentración por diferencia de peso en mg/mL; esto se realizó por triplicado, se utilizó papel aluminio, rotulados y se pesaron. Posteriormente se le adicionó muestra a cada papel aluminio y se dejó evaporar hasta tener la muestra en sólido, se volvió a pesar. Se sacó la diferencia de peso y se le hizo un promedio.

### **8.4 Preparación de medios de cultivo y resiembras**

Se utilizó medio agar Mueller-Hinton para el método de difusión en agar con pozos modificado. Se emplearon puntas cortadas para la elaboración de pozos en las

placas de agar. Una vez gelificadas las placas se pusieron a prueba esterilidad incubándolas a 37°C por 18-24 horas.

Se preparó solución salina isotónica al 0.9% y se vertieron 5 mL en tubos de cristal con tapa. Se esterizaron y posteriormente se utilizaron para la obtención de la suspensión bacteriana por cepa. La resiembra bacteriana se realizó en agar TSA, por estriado. Para el montaje de bioensayos se necesitaron resiembras de 24 horas.

## **8.5 Evaluación antibacteriana por el método de difusión en agar con pozos**

### **8.5.1 Obtención de la suspensión bacteriana**

Para la obtención de la suspensión bacteriana, se utilizaron resiembras de 24 horas de cada una de las bacterias evaluar y se obtuvo a una densidad celular equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland ( $10^8$  UFC/L).

## **8.6 Bioensayo antibacteriano del extracto etanólico de *Stevia* frente a bacterias nosocomiales**

Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *S. rebaudiana*, tanto el obtenido por maceración como el ultrasónico, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. saprophyticus* salvaje.

Se realizó una suspensión bacteriana por cepa respectivamente, con una resiembra previa de 24 horas. Se sembró masivamente en la placa de agar Mueller-Hinton y posteriormente se colocaron 20 µL de extracto en cada pozo, como control negativo se utilizó el disolvente y como control positivo vancomicina (Va 30 µg). Se incubaron a 37°C de 18 a 24 horas. Los bioensayos se realizaron por triplicado. Cumpliendo las 24 horas se observaron y se midieron con ayuda de un vernier los halos de inhibición. Se tomó en cuenta el tamaño del halo (en cm) de inhibición del antibiótico comercial (Va) en comparación al halo (en cm) del extracto de *Stevia*. De esta manera se calcula el % inhibición de crecimiento del extracto frente a las bacterias. Se utilizó la fórmula empleada por Martínez (1996), ecuación 1.

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{media diámetro halo de inhibición}}{\text{diámetro halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de efecto inhibitorio

### **8.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

La CMI se refiere a la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubarlo por 24 horas (McDermott, et al., 2005).

Para esta determinación se utilizaron 4 cepas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. saprophyticus* salvaje y *S. aureus* salvaje). Se utilizó una microplaca con 96 pozos. Se manejaron diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Stevia* (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 mg/mL).

Se colocaron 20  $\mu$ L de extracto etanólico de *Stevia*, posteriormente se le añadieron 180  $\mu$ L de agar Mueller-Hinton se homogenizó y por último se le añadieron 2  $\mu$ L de suspensión bacteriana. Se colocó como control negativo etanol absoluto 20  $\mu$ L (disolvente con el que se obtuvo el extracto) y como control positivo se colocaron 20  $\mu$ L de una suspensión de antibiótico comercial (Vancomicina 30  $\mu$ g). Se incubó por 24 horas y en las primeras 20 horas se sacó para leer la turbidez que presentó en la superficie del pozo, se observó un botón opaco, posteriormente se les añadió a todos los pozos 20  $\mu$ L de revelador MTT y se colocó nuevamente en la estufa por 10-15 minutos. Después de ese tiempo se observó un cambio de coloración en la superficie de los pozos que presentaron crecimiento, de amarillo a violeta.

### **8.8 Caracterización de metabolitos secundarios por FT-IR**

La espectroscopía de IR es una técnica que se utiliza para la identificación de ciertos grupos funcionales presentes en un compuesto, se basa en la producción de vibraciones en la zona del infrarrojo del espectro electromagnético, en donde cada grupo funcional tiene un rango de absorbancia que lo caracteriza (Vásquez, 2000). Para la caracterización de compuestos se realizó en el equipo (Digilab de Agilent Technologies, modelo Scimitar), se utilizó una muestra sólida y seca del

extracto etanólico de *Stevia*, se tomó una muestra y se colocó en el mortero con KBr, y se trituro hasta obtener una muestra homogénea, posteriormente se formó una pastilla y se colocó dentro del infrarrojo para su lectura, se obtuvo la gráfica de *Stevia*.

### **8.9 Caracterización de metabolitos secundarios por UV-Vis**

La espectrofotometría UV-Visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración.

Para la caracterización de los compuestos se utilizaron muestras líquidas en celdas de cuarzo. Se utilizó el equipo (Varian, modelo Cary 50). Primero se corrió el control o blanco, se utilizó etanol, disolvente utilizado para obtención del extracto. Posteriormente se colocaron 20  $\mu\text{L}$  del extracto de 10 mg/mL en la celda y se aforo con etanol. Finalmente se obtuvo una gráfica.

## 9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Determinación de la concentración del extracto por diferencia de peso.

En la tabla 4 se muestra que el extracto obtenido por macerado tiene una concentración de 130 mg/ml, mientras que por ultrasonido presentó una concentración de 350 mg/ml, tomando en cuenta que para ambos se utilizaron únicamente 15 g de hoja seca. Actualmente se utilizan diferentes técnicas de extracción para la obtención de metabolitos secundarios, la extracción con disolventes orgánicos es el método más empleado; sin embargo, la calidad y cantidad que se puede conseguir de un extracto depende de la técnica de extracción, el tipo de disolvente y las condiciones de la materia prima usada en el proceso. En la actualidad los métodos convencionales (basados principalmente en infusiones, macerados) generan un problema como la degradación de compuestos, elevado gasto de disolventes y largos periodos de extracción (Oliveira et al., 2016). La aplicación de ultrasonido en un proceso conlleva a un incremento en su eficiencia, velocidad, reduciendo los tiempos y temperaturas de operación. Esta tecnología presenta diversas ventajas entre las cuales, una mejor transferencia de masa, alta reproducibilidad, menor consumo de disolventes y un menor impacto ambiental (Zlabur et al. 2015).

**Tabla 4. Concentración de los extractos etanólicos de *Stevia*.**

<b>Extractos</b>	<b>Concentración mg/ml</b>
Maceración	130
Sonicación	350

### 9.2 Preliminar de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Stevia* frente *Staphylococcus*.

Los resultados mostraron que el extracto obtenido por maceración presentó menor actividad antibacteriana en comparación al obtenido por sonicación. Se mostró que aun siendo extractos crudos en ambos casos, el extracto obtenido por sonicación presentó un halo de 1.8 cm frente a *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*



mientras que para *S. aureus* 1.3 cm. (Tabla 4.1). El % de inhibición que mostró el extracto etanólico de *Stevia* por sonicación presentó mayor actividad antibacteriana frente a *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* con un 90% y *S. aureus* con un 76% en comparación con el control comercial (Va), (Tabla 4.2).

Estudios recientes han demostrado que la aplicación de la técnica de extracción por ultrasonido es prometedora para la obtención de mayor cantidad de componentes secundarios así como un mayor rendimiento para algunas actividades incluidas la extracción de proteínas, componentes medicinales, entre otras (Gasmalla et al., 2017). Es importante destacar la correcta elección del disolvente adecuado para la mayor obtención de metabolitos secundarios a partir de la técnica de sonicación.

Es por esto que se eligió el extracto etanólico de *Stevia* obtenido por sonicación para las siguientes determinaciones.

**Tabla 5. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia* por maceración y sonicación frente a *Staphylococcus*.**

Extracto etanólico	CEPAS						Control positivo Vancomicina (30µg) 2 cm
	Halos de inhibición en cm y en %						
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. saprophyticus</i>		
Crudo maceración	1	50	1.6	80	1.6	80	
Crudo sonicación	1.3	76	1.8	90	1.8	90	

### **9.3 Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia* frente a *Staphylococcus*.**

Los resultados obtenidos indican que el extracto de *S. rebaudiana* presentó inhibición de la actividad bacteriana en *S. aureus*, *S. epidermidis* el cuál mostró un halo de inhibición de 1.1 y 1.2 cm, respectivamente, en las concentraciones de 100 a 40 mg/mL mientras que *S. saprophyticus* muestra un halo mínimo de 0.8 cm a 40 mg/mL; sin embargo *S. aureus* salvaje presenta efecto inhibitorio de 1.1 cm a 20 mg/mL (Tabla 5). El extracto en ninguna de las concentraciones supera el halo de inhibición de 2 cm que presenta el antibiótico comercial (Va 30 µg) (Figura 6, 7, 8 y 9).

Es importante resaltar que el mayor porcentaje de inhibición fue para *S. aureus* salvaje con un 65% de inhibición (Tabla 6). En el ámbito intrahospitalario *S. aureus* es un patógeno importante que tiene la capacidad de desarrollar resistencia a varios antibióticos (Chambers et al., 2009). Varios estudios coinciden en que las cepas con alta tasa de mutación constituyen ≈1% de las poblaciones naturales, tanto en las bacterias aisladas en diferentes procesos patológicos como en bacterias comensales. En estudios reportados, el uso continuo de bacterias en un medio a ciertas condiciones específicas genera adaptación y mutación, esto puede incrementarse drásticamente en *S. aureus* (Prunier et al., 2003). Es por eso que se utilizó un *S. aureus* salvaje como control de adaptación, es decir si el extracto tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de un salvaje y no del ATCC se deducía que el *S. aureus* ATCC ya se había adaptado a la acción de *Stevia*. Se propone que, a pesar de su rápida adaptación a las condiciones, podemos destacar que la combinación y diferentes proporciones de los compuestos secundarios de *Stevia* reflejan que el extracto es un buen antibiótico natural.

**Tabla 6. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* frente a *Staphylococcus*.**

Extracto etanólico (mg/ml)	Halo de inhibición (cm)				Control positivo Vancomicina (30 µg) 2 cm
	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. saprophyticus</i> Salvaje	<i>S. aureus</i> Salvaje	
100	1.1	1.2	1	1.3	
80	1.1	1.2	1	1.3	
60	1.1	1.2	1	1.3	
40	1.1	1.2	0.8	1.2	
20	//	//	//	1.1	

// No presenta actividad antibacteriana.

**Tabla 7. Actividad antibacteriana (%) del extracto etanólico de *Stevia* frente a *Staphylococcus* a diferentes concentraciones.**

Extracto etanólico (mg/ml)	% de inhibición				Control positivo Vancomicina (30 µg) 2 cm
	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. saprophyticus</i> Salvaje	<i>S. aureus</i> Salvaje	
100	55	60	50	65	
80	55	60	50	65	
60	55	60	50	65	
40	55	60	40	60	
20	//	//	//	55	

// No presenta actividad antibacteriana.

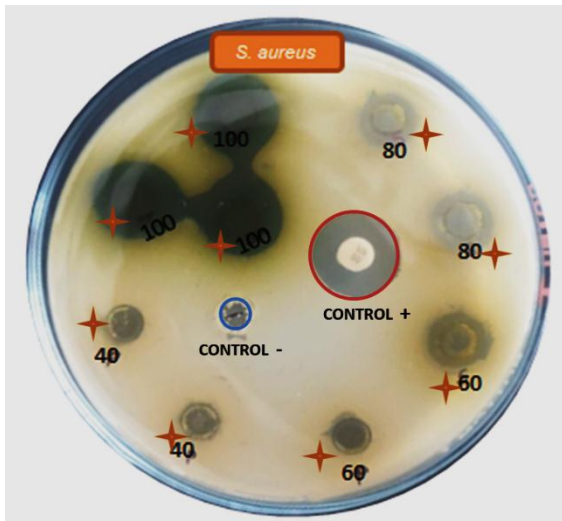


Figura 6. Actividad antibacteriana del extracto de *Stevia* a diferentes concentraciones en mg/mL ✦ frente a *S. aureus* ATCC 29213, control positivo en rojo y control negativo en azul.

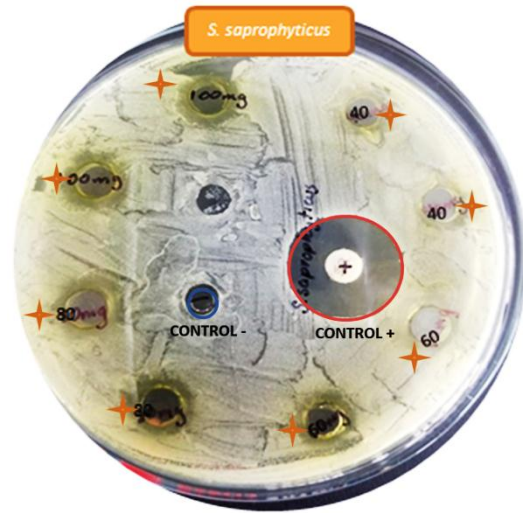


Figura 7. Actividad antibacteriana del extracto de *Stevia* a diferentes concentraciones en mg/mL ✦ frente a *S. saprophyticus* salvaje, control positivo en rojo y control negativo en azul.



Figura 8. Actividad antibacteriana del extracto de *Stevia* a diferentes concentraciones en mg/mL ✦ frente a *S. epidermidis* ATCC 12228, control positivo en rojo y control negativo en azul.

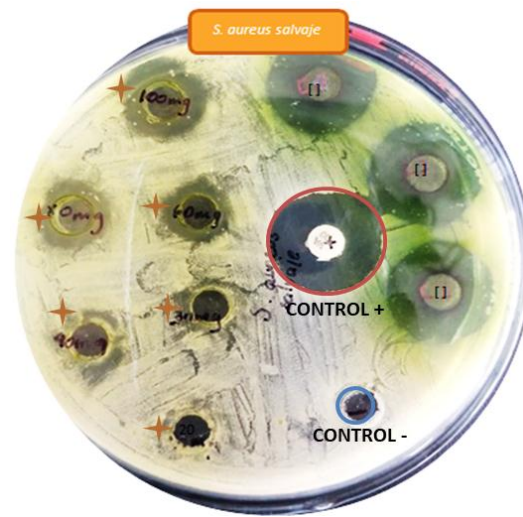


Figura 9. Actividad antibacteriana del extracto de *Stevia* a diferentes concentraciones en mg/mL ✦ frente a *S. aureus* salvaje, control positivo en rojo y control negativo en azul.

#### 9.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos de la CMI, donde se encontró que para *S. aureus* ATCC 29213 la CMI es de 50 mg/mL, *S. saprophyticus* salvaje y *S. aureus* salvaje la CMI es de 40 mg/mL y *S. epidermidis* ATCC 12228 es de 30 mg/mL. Los estudios fitoquímicos han demostrado que *S. rebaudiana* posee una gran diversidad de componentes químicos; algunos autores han señalado la presencia, en extractos de hojas de *Stevia*, de alcaloides, flavonoides, fenoles, esteroides, aceites esenciales y en menor concentración, taninos (Preethi et al., 2011; Lemus-Mondaca et al., 2012). Estos compuestos flavonoides, ácidos aromáticos y terpenoides se han descrito en varios trabajos, mencionados como responsables de la actividad antibacteriana (Choi et al., 2006; Abou-Arab y Abu-Salem, 2010). La tabla 7 refleja que a pesar de que las cuatro bacterias son del mismo género, pero diferente especie, el extracto de *Stevia* presenta un efecto inhibitorio superior en *S. epidermidis* ATCC 12228. El MTT muestra una tinción morada en todos los pozos donde hay crecimiento y viabilidad de la célula bacteriana. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de cristal reducido (formazán) (Garfias et al., 2000).

**Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Stevia* frente *Staphylococcus*.**

Extracto etanólico (mg/mL)	CEPAS			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. saprophyticus</i> salvaje	<i>S. aureus</i> salvaje
100	+	+	+	+
90	+	+	+	+
80	+	+	+	+
70	+	+	+	+
60	+	+	+	+
50	+	+	+	+
40	//	+	+	+
30	//	+	//	//
20	//	//	//	//
10	//	//	//	//

+ Efecto inhibitorio de crecimiento.

// No presenta actividad antibacteriana

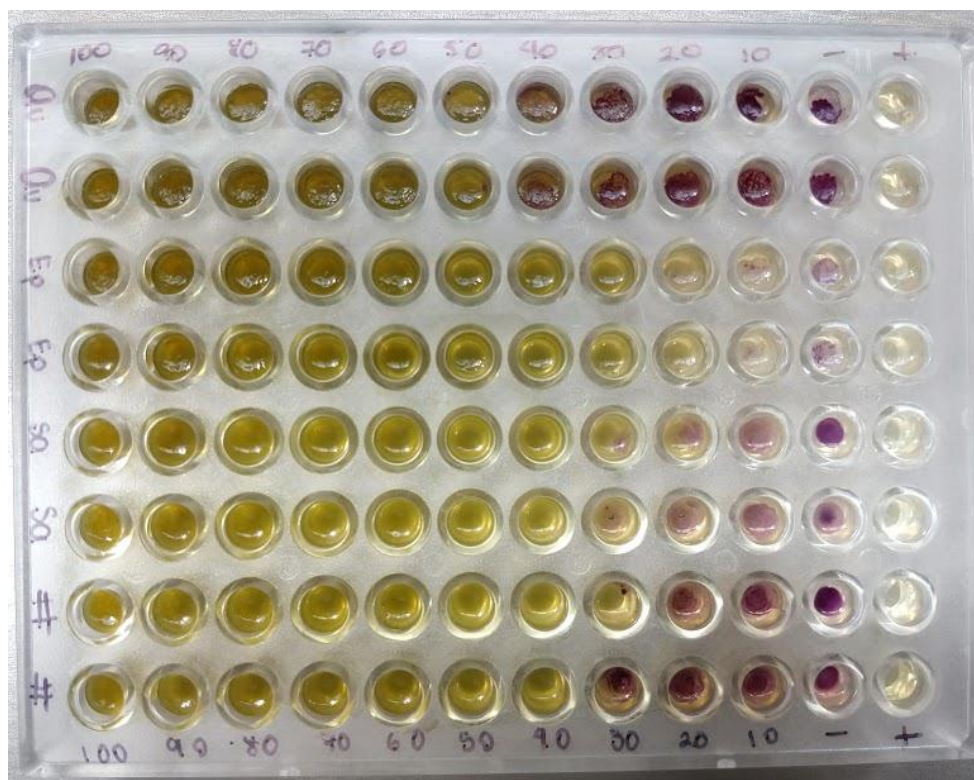


Figura 10. Concentración mínima inhibitoria por microdilución en micro placa en agar Mueller Hinton con revelador MTT. Au: *S. aureus* de 50mg/mL, Ep: *S. epidermidis* de 30mg/mL, Sa: *S. saprophyticus* salvaje de 40 mg/mL y #: *S. aureus* salvaje 40 mg/mL Todos los pocillos donde muestra una coloración morada corresponde al crecimiento bacteriano.

## 9.5 Caracterización del extracto etanólico de *Stevia*.

### 9.5.1 Espectrofotometría de UV-visible

La figura 11, muestra el espectro de UV-VIS del extracto *S. rebaudiana*. El espectro de UV-VIS muestra dos bandas de absorción, la de mayor intensidad se ubica en la región UV mediano en 328.0 nm, corresponde a las transiciones electrónicas:  $n \rightarrow \pi^*$  de los carbonilos  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturados y la presencia de grupos oxipolienatos cíclicos del esteviosido.

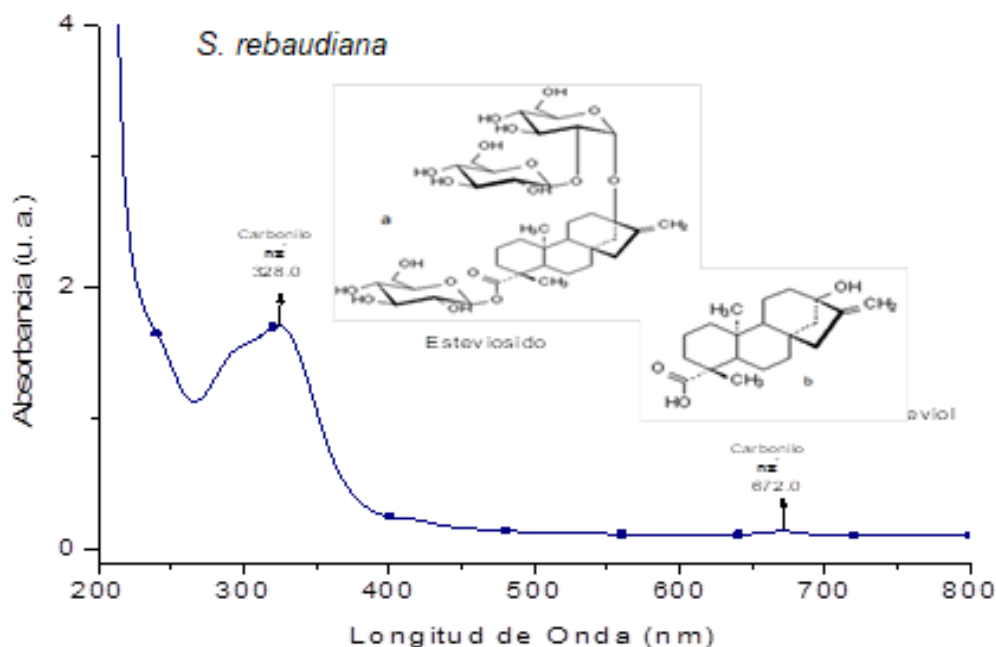


Figura 11. Espectros de UV-VIS de la *Stevia rebaudiana* Bertoni

La banda de absorción de menor intensidad ubicada en la región visible en 672 nm correspondiente a la absorción de color roja con una frecuencia de  $4.46 \times 10^{14}$  Hz. Las transiciones electrónicas son del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  de la molécula del esteviol.

## 9.6 Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural del extracto de *Stevia*.

El espectro de FT-IR del extracto de *S. rebaudiana* se presenta en la figura 12. La banda de absorción ubicada en  $3402.8 \text{ cm}^{-1}$  correspondiente al modo de vibración de alargamiento  $\nu \text{O-H}$ , que identifica los grupos hidroxilos (OH), agua (H-OH) y alcohol (etanol, R-OH). En  $2923.4 \text{ cm}^{-1}$  se ubican los modos de vibración de alargamiento  $\nu \text{C-H}$  de las especies químicas C-H. El modo de vibración de alargamiento  $\nu \text{C-H}$  asimétricos se localiza en  $2900 \text{ cm}^{-1}$ , mientras la absorción en  $2352.1 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a las interacciones de las especies C-O simétricas en  $1950 \text{ cm}^{-1}$ , la banda de vibración correspondiente a las interacciones de tipo flexión  $\nu \text{OH}$  de los grupos OH-, las cuales se deben a la humedad y a grupos hidroxilos de la superficie del material, del disolvente y a la deformación  $\nu \text{HOH}$  del

agua coordinada se encuentra en  $1636.3\text{ cm}^{-1}$ . Los valores de  $1445.8\text{ cm}^{-1}$  y  $1410\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de alargamiento simétricas  $\nu\text{COO}^-$  y deformación  $\nu\text{CH}_3$ . Las bandas de vibración correspondientes a las vibraciones tipo alargamiento asimétricas  $\nu\text{COO}^-$  de iones carboxilato se ubican en  $1593.0\text{ cm}^{-1}$ . De acuerdo con estudios fitoquímicos la actividad antimicrobiana de las hojas de *Stevia rebaudiana* podría darse por los compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos (Tadhani et al., 2007).

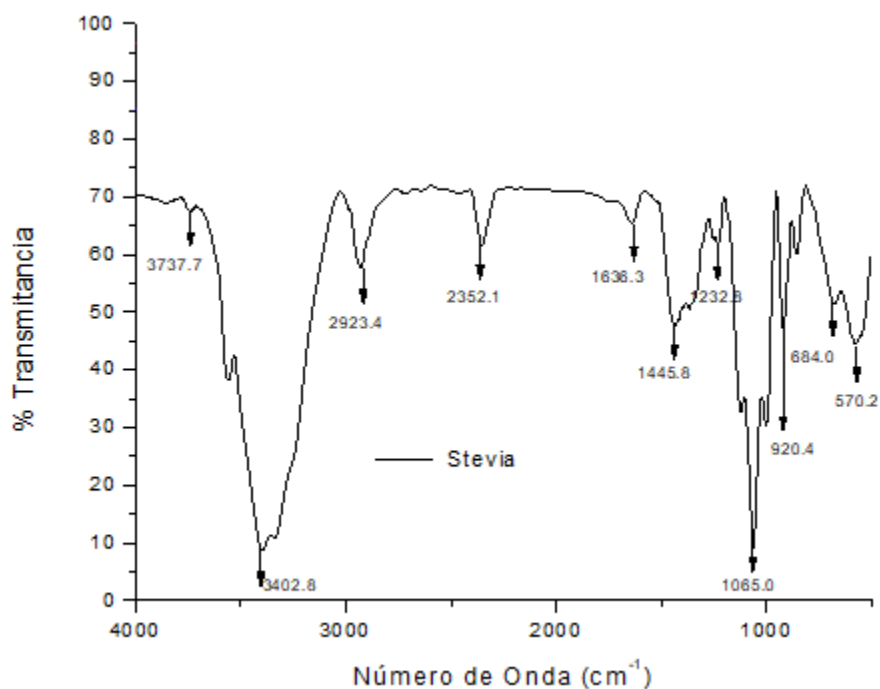


Figura 12. Espectro IR del extracto de *S. rebaudiana*.



## 10 CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Stevia* obtenido por sonicación resultó más eficaz en la evaluación de la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* salvaje, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. saprophyticus* salvaje y *S. aureus* ATCC 29213.
- La CMI para *S. epidermidis* ATCC 12228 de 30 mg/ml, *S. saprophyticus* salvaje y *S. aureus* salvaje de 40 mg/ml y *S. aureus* ATCC 29213 de 50 mg/ml.
- Se determinaron los grupos funcionales del extracto de *Stevia* por FT-IR obteniendo compuestos fenólicos, flavonoides, antocianinas y taninos. Y en el espectro de UV-vis obteniendo esteviósido y grupos carbonilos.

## **11 RECOMENDACIONES**

- Realizar cromatografía en capa fina para el análisis de compuestos
- Realizar cromatografía en columna para la obtención de diferentes fracciones de los compuestos.
- Realizar cromatografía de gases (HPLC) para la obtención de fracciones a diferentes proporciones de compuesto y para su caracterización.
- Caracterizar los metabolitos secundarios encargados de la actividad antimicrobiana.

## 12 BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Arab, E. A., & Abu-Salem, F. M. (2010). Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *African Journal of Food Science*, 4(10), 627-634.
- Ahmed, K. M., Bansal, M., & Gupta, B. M. (2016). Comparative Performance of Four Indian Pharmacognosy Journals. *Pharmacology, Toxicology and Biomedical Reports*, 2(2).
- Asgari, A. (2014). Herbal medicines and kidney; friends or foes?. *Journal of nephropharmacology*, 3(1), 5.
- Avalos García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3).
- Bauer, B. A. (2000). Herbal therapy: what a clinician needs to know to counsel patients effectively. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 75, No. 8, pp. 835-841). Elsevier.
- Bennett, J. E., Dolin, R., & Blaser, M. J. (2014). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set* (Vol. 1). Elsevier Health Sciences.
- Callaway, RM (2003). Diseños experimentales para el estudio de la alelopatía. *Planta y suelo*, 256 (1), 1-11.
- Carrillo Esper, R., Caldera, B. L., & Morales, J. M. R. (2010). Hierbas, medicina herbolaria y su impacto en la práctica clínica. *Médica Sur*, 17(3), 124-130.
- Cerda-García-Rojas, C. M., & Pereda-Miranda, R. (2001). The phytochemistry of Stevia: a general survey. In *Stevia* (pp. 100-131). CRC Press.
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629.
- Chen, T. H., Chen, S. C., Chan, P., Chu, Y. L., Yang, H. Y., & Cheng, J. T. (2005). Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Planta medica*, 71(02), 108-113.
- Choi, Y. M., Noh, D. O., Cho, S. Y., Suh, H. J., Kim, K. M., & Kim, J. M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 39(7), 756-761.
- Coniel Linares, E., Acosta Núñez, N., Linares Guerra, M., & Alcalde Pérez, J. C. (2010). Infecciones oportunistas de origen bacteriano más frecuentes en pacientes

- infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 14(1), 72-78.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., ... & Fiñana, I. T. (2000). Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Universidad de Córdoba.[En línea] España.[Fecha de acceso: 15 de mayo de 2014] Disponible en URL: [http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08\\_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETR%C3%8DA.pdf).
- Duarte, R. C. 2008. Análisis de la producción del Ka'a he'ë. Agencia Financiera de Desarrollo (AFD). Asunción, Paraguay.
- Ebana, K., Yan, W., Dilday, RH, Namai, H. y Okuno, K. (2001). Variación en el efecto alelopático del arroz con extractos solubles en agua. *Agronomy Journal*, 93 (1), 12-16.
- Fariña, N., Sanabria, R., Figueredo, L., Ramos, L., & Samudio, M. (2005). *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinario. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 3(1).
- Federico, N. S., Serrano, S. A., de la Cruz, A. G., Jiménez, L. A. F., Contreras, M. D. L. Á. L., Hernández, C. G. M., ... & Magallón, J. A. S. (2017). Evaluación de dos extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre enterobacterias resistentes a antibióticos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 75-80.
- Gao, M., & Liu, C. Z. (2005). Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9), 1461-1463.
- Gasmalla, M. A. A., Yang, R., Musa, A., Hua, X., & Ye, F. (2017). Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(5), 726-731.
- Garfias, C. R. B., García, E. A., & García, I. I. T. (2000). Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación in vitro de linfocitos de bovino, frescos y congelados. *Veterinaria México*, 31(2).
- Guevara Frias, E. L. (2017). Análisis del efecto inhibitorio de stevia en diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans*, estudio in vitro (Bachelor's thesis, Quito: UCE)

- Gómez Madrigal, L. S. (2012). La protección jurídica de los conocimientos tradicionales desarrollados por las comunidades indígenas en México: el caso de la medicina tradicional.
- Hessen, M. T., Kaye, D., & Zuckerman, J. M. (2000). Infections associated with foreign bodies in the urinary tract. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, Third Edition (pp. 325-344). American Society of Microbiology.
- Jackson, A. U., Tata, A., Wu, C., Perry, R. H., Haas, G., West, L., & Cooks, R. G. (2009). Direct analysis of *Stevia* leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 134(5), 867-874.
- Kujur, R. S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H. N., Singh, K. K., Kumari, S., & Roy, B. K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy research*, 2(4), 258.
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- Kuntal, D. (2009). Comparative antimicrobial potential of different extracts of leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 3: 59-62
- Lahlou, S., Tahraoui, A., Israili, Z., & Lyoussi, B. (2007). Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3), 458-463.
- Lee, C. N., Wong, K. L., Liu, J. C., Chen, Y. J., Cheng, J. T., & Chan, P. (2001). Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Medica*, 67(09), 796-799.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., & Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food chemistry*, 132(3), 1121-1132.
- Martínez MJ, (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera (sábila). *Rev. Cubana Plant Med*, 1 (3), 18-20.
- Martínez, A. F., & en Ciencias, D. (2005). Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Septiembre.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278..
- Massón-Palacios, M., & Armas-Vega, A. (2016). Comparación de la efectividad antibacteriana de la *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* y

- Streptococcus sanguinis*. KIRU Revista de la Facultad de Odontología-Universidad de San Martín de Porres, 13(2).
- McDermott, P. F., Bodeis-Jones, S. M., Fritsche, T. R., Jones, R. N., & Walker, R. D. (2005). Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Journal of clinical microbiology*, 43(12), 6136-6138.
- Miranda-Arámbula, M., Olvera-Alvarado, M., Lobo-Sánchez, M., Pérez-Xochipa, I., Ríos-Cortés, A. M. I., & Cabrera-Hilerio, S. L. (2017). Antibacterial activity of extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(25), 414-418.
- Mittermeier, R., & Goettsch, C. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México. México ante los retos de la biodiversidad, 57-62.
- Morales Orjuela, L. T. (2017). Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto vegetal obtenido de un cultivo comercial de *Stevia rebaudiana* ubicado en Olaya (Antioquia).
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Oliveira, D. A., Angonese, M., Gomes, C., & Ferreira, S. R. (2016). Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 111, 55-62.
- Oue, Y., Ueno, S., & Oue, Y. (2003). ¿En qué consiste el "Método de cultivo usando la *Stevia*". Presentación del "Método de cultivo usando la *Stevia*". Traducción Ing. Agr. Tomio Hanano, Profesor de la Universidad Nacional de Asunción. Japón: Agencia Oficial para el Desarrollo. Asunción, Paraguay.
- Parrera, A., Gianfranco, A., & Julca Majo, A. V. R. (2015). Parámetros de calidad del extracto fluido de las hojas de *Stevia rebaudiana* bertoni y efecto antifúngico in vitro frente a *Candida albicans*.
- Perdomo Delgado, J. (2014). Cuba y la OMS actualizan sus estrategias de Medicina Tradicional. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(3), 264-266.
- Pérez Guevara, S. P. (2013). Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- Perez Montoya, L. H., Zurita Villarroel, I. M., Pérez Rojas, N., Patiño Cabrera, N., & Calvimonte, O. R. (2010). Infecciones intrahospitalarias: agentes, manejo actual y prevención. *Revista Científica Ciencia Médica*, 13(2), 90-94.
- Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Camargo CH, Souza MLR. (2014). Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1-8.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). *Antioxidantes de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia. SA.
- Preethi, D., Sridhar, T. M., Josthna, P., & Naidu, C. V. (2011). Studies on antibacterial activity, phytochemical analysis of *Stevia rebaudiana* (Bert.)-An important calorie free biosweetener. *Journal of Ecobiotechnology*.
- Prunier, A. L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J. F., & Leclercq, R. (2003). High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *The Journal of infectious diseases*, 187(11), 1709-1716.
- Ramírez, L. C., Castañeda, A. C., & Vargas, A. M. (2015). Evaluación del potencial antibacteriano in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*, 11(19), 51-63.
- Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Rice, E. L. (1984). *Allelopathy*. Academic Press, Orlando, FL. *Allelopathy*. 2nd ed. Academic Press, Orlando, FL.
- Rodríguez, C. A., & Vesga, O. (2005). *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*, 25(4), 575-587.
- Sergio, G. G., Yolanda, M. O., Genovevo, R. J., César, M. L., & Ildelfonso, A. B. W. (2011). *Estevia (Stevia rebaudiana Bertonii)* un cultivo con potencial productivo en México.
- Sharma, A., del Carmen Flores-Vallejo, R., Cardoso-Taketa, A., & Villarreal, M. L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 264-329.
- Siddique, A. B., Rahman, S. M. M., Hossain, M. A., & Rashid, M. A. (2014). Phytochemical screening and comparative antimicrobial potential of different extracts of *Stevia*

- rebaudiana* Bertoni leaves. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4(4), 275-280.
- Silva, Á. A. J. (2017). Medicina tradicional. BOLETÍN CONAMED, (13).
- Stuart, B. (2004). Spectral analysis. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications, 45-70.
- Sturtevant, A. H. (1937). Essays on evolution. I. On the effects of selection on mutation rate. The Quarterly Review of Biology, 12(4), 464-467.
- Torres, N. C. M. (2017). Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles de limón persa (*Citrus latifolia*).
- Tadhani, M. B., Patel, V. H., & Subhash, R. (2007). In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. Journal of Food Composition and Analysis, 20(3-4), 323-329.
- Vázquez D. (2000). Ciencias Oxford complutense. Pp 397.
- Wagner, H. (2013). Development of new analytical monographs of herbal drugs from TCM for quality proof and development of new phytopharmaceuticals. In Evidence and Rational Based Research on Chinese Drugs (pp. 1-25). Springer, Vienna.
- Žlabur, J. Š., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., & Brnčić, S. R. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. International Agrophysics, 29(2), 231-237.
- Cai, D. J., Qing, S. H. U., XU, B. Q., Peng, L. M., & Yan, H. E. (2011). Orthogonal test design for optimization of the extraction of flavonid from the fructus gardeniae. Biomedical and Environmental Sciences, 24(6), 688-693.



