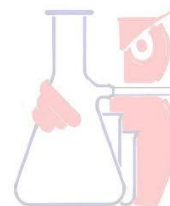




BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS



LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

TESIS PROFESIONAL

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE
Stevia rebaudiana BERTONI SOBRE *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*
epidermidis Y *Pseudomonas aeruginosa*”

PRESENTA

p.QFB. MARICRUZ OLVERA ALVARADO

DIRECTOR DE TESIS

D.C. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO

ASESOR DE TESIS

D.C. ANA MARTA DE LOS ÁNGELES LOBO SÁNCHEZ

AGOSTO 2015.

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
Índice de ecuaciones.....	iv
Índice de figuras.....	v
Índice de tablas	vi
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Bacterias oportunistas.....	5
3.2 Formas de control de enfermedades microbianas	7
3.2.1 Uso de antisépticos y desinfectantes.....	7
3.2.2 Uso de extractos vegetales.....	8
3.3 <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	9
3.4 Steviósido y rebaudiósido A.....	11
3.4.1 Determinación de glucósidos de steviol por HPLC	12
3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares.....	15
6. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1 Material biológico	17
7.2 Métodos	17
8. METODOLOGÍA.....	18

8.1 Acondicionamiento de la materia prima	18
8.2 Obtención de los extractos.....	18
8.3 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos	18
8.4 Bioensayo de la actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	19
8.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	19
8.6 Cuantificación de los glucósidos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni por HPLC	20
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES	21
9.1 Obtención de extractos	21
9.2 Sensibilidad a antibióticos.....	22
9.3 Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	24
9.4 Concentración mínima inhibitoria	26
9.5 Cuantificación de steviósido y rebaudiósido A por HPLC	28
10. CONCLUSIONES.....	29
11. RECOMENDACIONES	30
12. BIBLIOGRAFÍA	31
13. ANEXOS	38
Anexo A. ANOVA unidireccional: Extracto 001, Extracto 002, Extracto 003, Extracto 004. (Minitab 17)	38
Anexo B. Cromatogramas de steviósido y rebaudiósido A de diferentes extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	39

Índice de ecuaciones

No.	Título	Pág.
Ecuación 1.	Fórmula para cálculo de rendimiento	21
Ecuación 2.	Porcentaje de efecto inhibitorio	24
Ecuación 3.	Fórmula para calcular mg/muestra de Steviósido	28
Ecuación 4.	Fórmula para calcular mg/muestra de Rebaudiósido A	28

Índice de figuras

No.	Título	Pág.
Figura 1.	Estructuras químicas de los principales metabolitos de los glicósidos de steviol	12
Figura 2.	Cromatograma de estándar de steviósido (5.443 min) y rebaudiósido A (5.158 min)	39
Figura 3.	Cromatograma de steviósido (5.179 min) y rebaudiósido A (4.915) del extracto acuoso	39
Figura 4.	Cromatograma de steviósido (5.140 min) y rebaudiósido A (4.886) del extracto etanólico	40

Índice de tablas

No.	Título	Pág.
Tabla 1.	Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> con diversos disolventes (Halos de inhibición en mm)	10
Tabla 2.	Cepas bacterianas	17
Tabla 3.	Métodos y referencias	17
Tabla 4.	Rendimiento obtenido por diversos autores (g %)	21
Tabla 5.	Sensibilidad antibacteriana de las cepas de <i>Staphylococcus</i>	22
Tabla 6.	Sensibilidad antibacteriana de las cepas de <i>Pseudomonas</i>	23
Tabla 7.	Actividad antimicrobiana (%) de los diversos extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni contra cepas bacterianas evaluadas	25
Tabla 8.	Concentración mínima inhibitoria (en mg/mL)	27
Tabla 9.	Concentración de steviósido y rebaudiósido A por HPLC (mg/g de hoja)	28

1. RESUMEN

A través del tiempo, el hombre ha encontrado en los recursos naturales la solución a diversos problemas, por ejemplo, empleando plantas a nivel alimenticio, industrial y medicinal, donde los productos de origen vegetal han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, permitiendo el descubrimiento de compuestos antibacterianos. Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen sólo el 10% de los metabolitos secundarios; de esta manera los extractos vegetales emergen como una fuente potencial para el control de enfermedades. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de cuatro extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni, acuoso, etanólico, tetraclorado y hexánico, frente a bacterias de origen ambiental *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos se obtuvieron mediante equipo soxhlet, utilizando los disolventes: etanol, tetracloruro de carbono y hexano; y el extracto acuoso, por el método de cocción. Se evaluó la actividad antibacteriana sobre cada una de las diferentes cepas utilizando la técnica de difusión en pozo y extendido en superficie; se determinó la CMI por dilución en agar y se determinó por HPLC la concentración de steviósido y rebaudiósido A. Los resultados de los halos de inhibición del extracto hexánico indican que este logró inhibir a todas las cepas con las concentraciones más bajas, siendo 0.011 mg/mL para *Staphylococcus aureus* y 1.06 mg/mL para *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto con mayor concentración de steviósido y rebaudiósido A fue el extracto acuoso, con 9.08 mg/g de hoja y 40.63 mg/g de hoja respectivamente, el cual presenta mayor contenido de steviósido y rebaudiósido A que el extracto etanólico, por lo que no hay relación entre efectividad inhibitoria y concentración de glucósidos. Utilizar extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni para el control del crecimiento bacteriano, podría ser una alternativa viable, ya que se demostró que a pesar de la resistencia a antibióticos con las que cuentan las cepas bacterianas evaluadas, se logró inhibirlas utilizando extractos *Stevia rebaudiana* Bertoni, con un porcentaje de 12 a 84% de inhibición.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infectocontagiosas son causa de la morbilidad y mortalidad en el mundo, originadas por la emergencia de microorganismos resistentes a antibióticos (Vignoli, 2008). La mayoría de los estudios sobre la resistencia a antibióticos se centran en el mal uso de estos debido a la automedicación, a dosis incompletas y al empleo de medicamentos falsos, es por ello que el papel que pueden tener los ecosistemas naturales en la evolución de la resistencia y virulencia ha recibido una menor atención (Martínez *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013). Algunos estudios han demostrado que las bacterias patógenas oportunistas de origen medioambiental tienen la habilidad genética para transferir y adquirir factores de resistencia a diferentes sustancias, además pueden ser dispersadas por el aire siendo fuente de infecciones (Liu *et al.*, 2012; Picao *et al.*, 2009).

El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficacia la acción bactericida de algunos de estos agentes químicos. Un factor importante a tener en cuenta para establecer una política de uso de desinfectantes y antisépticos es la estandarización de métodos de control de calidad de estos productos de acuerdo con la naturaleza, el estado físico de las sustancias y el uso al que están destinadas (Casellas *et al.*, 1994; Rodríguez, 2006; Cabrera *et al.*, 2007).

Dentro de los agentes implicados en la prevalencia de enfermedades se encuentran *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus sp*, que son las bacterias con mayor frecuencia aisladas del aire (Aydogdu *et al.*, 2010; Fahlgren *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2013). El interés de estudiar a *Staphylococcus aureus* se debe tanto a su elevada frecuencia, como a su rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, que le han concedido la capacidad de resistencia a antibióticos, como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (SARV) (Rojas *et al.*, 2006b; Velasco *et al.*, 2013). Por otra parte, debido a su falta de exigencia de requerimientos *Pseudomonas* se encuentra en suelos, aguas, aguas residuales y hasta en el aire. Las especies de

Pseudomonas son una fuente extremadamente rica en plásmidos catabólicos y de resistencia, algunos de los cuales pueden ser transferidos a otras bacterias (Jacoby, 1986; Sayler *et al.*, 1990; Boronin, 1992a; Boronin, 1992b; Schlegel *et al.*, 1997).

Por todo esto es que en la actualidad existe la problemática de la progresiva ineficacia del tratamiento con antibióticos, lo que ha llevado a conseguir alternativas eficaces para el control de microorganismos en las que se han utilizado compuestos naturales por ejemplo los metabolitos secundarios obtenidos de plantas. Se ha demostrado que extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni contienen compuestos que presentan actividad antimicrobiana frente a un amplio número de bacterias de origen intrahospitalario o clínico, como: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* (Manish, 2006; Jayaraman, 2008; Kuntal, 2009; Singh, 2012); mientras que hay pocos estudios con bacterias ambientales, sin que se mencione el porcentaje de glucósidos de steviol presentes en los extractos evaluados.

El interés de evaluar extractos de *Stevia rebaudiana*, se debe a que en últimos años esta planta ha tenido fuerte demanda y en México ya existen grandes plantaciones (Ruiz *et al.*, 2014) y cada vez son más las empresas interesadas en adicionar a sus productos fracciones de esta planta; por eso se propone evaluar la actividad antibacteriana de extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre cepas ambientales de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, para emplearse en el control de contaminación bacteriana.

3. ANTECEDENTES

Las enfermedades infectocontagiosas son causa fundamental de la morbilidad y mortalidad en el mundo. Uno de los motivos de esta situación es la emergencia de microorganismos resistentes a los antibióticos, bien porque hayan adquirido dicha resistencia como consecuencia de la presión selectiva debido al mal uso de antibióticos o bien porque sean intrínsecamente resistentes a los mismos, como es el caso de los micoplasmas, que carecen de pared celular, por lo que no son sensibles a los beta-lactámicos (Vignoli, 2008).

La mayor parte de los estudios sobre la resistencia a los antibióticos se centran en el mal uso de estos debido a la automedicación, a dosis incompletas y al empleo de medicamentos falsos; por ese motivo, el papel que pueden tener los ecosistemas naturales en la evolución de la resistencia y virulencia ha recibido una atención menor. Recientemente las bacterias patógenas oportunistas de origen medioambiental han cobrado importancia debido a que son causantes de un gran número de enfermedades hospitalarias (Martínez *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013). Algunos estudios han demostrado que estas bacterias tienen la habilidad genética para transferir y adquirir factores de resistencia a diferentes sustancias, además pueden ser dispersadas por el aire siendo fuente de infecciones epidémicas y por ende, una seria amenaza para la salud pública mundial (Liu *et al.*, 2012; Picao *et al.*, 2009).

Las bacterias como todos los seres vivos, exhiben mecanismos biológicos, que las facultan para adecuarse a diversas presiones ambientales. Aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente. El incremento en el uso de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana (Ang *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de estos microorganismos a la presión selectiva que ejercen los antisépticos y desinfectantes, así como los compuestos quimio-terapéuticos más utilizados en los brotes de infecciones en los hospitales del mundo. Según estudios epidemiológicos, América

Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos; además de un marcado interés por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos (Cabrera *et al.*, 2007).

3.1 Bacterias oportunistas

Las bacterias oportunistas son aquellas que aprovechan un compromiso de los mecanismos de defensa de un organismo, para entrar en él y provocar enfermedad, la alteración de los citados mecanismos suele deberse a enfermedades crónicas subyacentes, a factores personales especiales, como el estrés o el embarazo y a la acción de ciertos medicamentos, por ejemplo tratamientos de inmunosupresión. Algunos ejemplos de microorganismos oportunistas son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* entre otros (Martínez *et al.*, 2013).

Dentro de los agentes implicados en la prevalencia de enfermedades se encuentran los bacilos Gram-negativos: *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacterias (*Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*); de los bacilos Gram-positivos están: *Clostridium perfringens*, *C. botulinum* y *C. tetani*; y en el grupo de cocos Gram-positivos a *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y los *Enterococcus*. También es relevante mencionar a hongos como *Candida albicans* y *Candida glabrata* y algunos virus, pero las bacterias son las que adquieren mayor importancia clínica debido a que las enfermedades bacterianas se presentan con mayor frecuencia (Pérez *et al.*, 2010).

Entre las bacterias aisladas con mayor frecuencia en el aire se encuentran *Pseudomonas sp* y *Staphylococcus sp* (Aydogdu *et al.*, 2010; Fahlgren *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2013). Se ha demostrado que estas bacterias pueden llegar a transferir y adquirir factores de resistencia, por diversos mecanismos genéticos, a diferentes sustancias, y al ser dispersadas por el aire son fuente de infecciones epidémicas y por

ende, una seria amenaza para la salud pública mundial (Picao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012).

Los *Staphylococcus* son bacterias Gram-positivas, dispuestas en racimos, no móviles y que no forman esporas; tienen la capacidad de causar una gran diversidad de infecciones en el ser humano y en los animales. Tanto *Staphylococcus aureus* como *Staphylococcus epidermidis* son considerados como oportunistas, pues se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; *Staphylococcus aureus* es la especie patógena principal del género, se trata de una bacteria coagulasa positiva, muy resistente en el medio ambiente, que puede encontrarse en el aire, agua, residuos, maquinaria y superficies de la industria alimentaria, pero su principal reservorio son los animales y humanos. El interés del estudio de este patógeno se debe tanto a su elevada frecuencia, como a su rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, que le han concedido la capacidad de resistencia a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) que presenta resistencia a la primera línea de antibióticos como ampicilina y penicilina y *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (SARV) (Rojas *et al.*, 2006b; Velasco *et al.*, 2013). *Staphylococcus epidermidis* tiene la capacidad de producir un biofilm que le confiere una adherencia muy eficiente, por lo tanto se puede unir a superficies, además este biofilm forma una barrera que dificulta el paso de los antibióticos (Pinheiro *et al.*, 2014).

Otra bacteria de gran importancia es *Pseudomonas* un género bacteriano que debido a su amplia distribución, se encuentra en suelos, aguas, aguas residuales y hasta en el aire (dado a su falta de exigencia de requerimientos). Se trata de bacilos rectos o con ligera curvatura, aerobios, Gram-negativos, no forman esporas y con flagelación polar (Schlegel *et al.*, 1997). Las especies de *Pseudomonas* son una fuente extremadamente rica en plásmidos catabólicos y de resistencia, algunos de los cuales pueden ser transferidos a otras bacterias Gram-negativas, por tanto representan un depósito valioso de material genético que puede ser compartido por organismos filogenéticamente distantes (Jacoby, 1986; Saylor *et al.*, 1990; Boronin, 1992a; Boronin, 1992b).

3.2 Formas de control de enfermedades microbianas

El método más utilizado para controlar las enfermedades microbianas es por medio de antibióticos debido a su rápida acción, pues en la práctica es necesario dar un tratamiento tan pronto sea posible, muchas veces sin identificar el agente causal de la enfermedad, esto ha llevado a la evolución de las resistencias a estas sustancias. Hay que recordar que la farmacología moderna tiene sus raíces en la herbolaria médica tradicional; y aun cuando la medicina herbolaria estuvo en declive cuando los fármacos estuvieron disponibles, en una tercera parte del mundo la herbolaria permanece en uso (García, 2006).

En la actualidad, uno de los retos más importantes que enfrenta la salud pública mundial a ciertos padecimientos es la progresiva ineficacia del tratamiento con antibióticos (Neu, 1992; Brown, 2004). Esto debido a la emergencia y reemergencia de enfermedades infecciosas producidas por patógenos, que a través de variados mecanismos han desarrollado resistencia a múltiples fármacos; situación ocasionada principalmente por el mal uso terapéutico de los mismos (PAHO, 1995; Jones *et al.*, 2006; WHO, 2011); tal es el caso de las bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus spp* y las bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas spp*, entre otras (Zaborina *et al.*, 2006; Boucher *et al.*, 2009; Wright, 2012).

3.2.1 Uso de antisépticos y desinfectantes

Los antisépticos y desinfectantes son una parte esencial de las prácticas de control y prevención de infecciones, son usados ampliamente con una variedad de aplicaciones tópicas y de superficie dura. Una amplia variedad de agentes químicos activos (biocidas) se encuentran en estos productos, muchos de los que se han utilizado durante cientos de años, incluyendo alcoholes, fenoles, yodo y cloro. La mayoría de estos agentes activos demuestran amplio espectro de actividad antimicrobiana.

Como se ha visto en los antibióticos y en los agentes quimioterapéuticos, la resistencia adquirida a los antisépticos y desinfectantes surge por mutación o por la adquisición de material genético en forma de plásmidos o transposones; estas configuraciones

permiten grandes arreglos de genes de resistencia para la mayoría de los antibióticos y desinfectantes al ser transferidos juntos (McDonnell y Russell, 1999; Cabrera et al., 2007).

En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces para el control de las infecciones bacterianas, se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacología, logrando encontrar nuevas moléculas (Ávila *et al.*, 2006). Las plantas son una valiosa fuente de sustancias activas; ya que se ha reportado que producen más de 100.000 metabolitos secundarios, muchos de los cuales pueden tener efectos antibacterianos (Domingo y López, 2003; Nascimento *et al.*, 2000).

Por lo que se está probando la implementación de terapias alternativas a la medicina alopática (Tomlinson *et al.*, 2000). Por ejemplo el uso de agentes antimicrobianos naturales utilizando extractos vegetales como alternativa efectiva o una estrategia complementaria para el control de microorganismos patógenos (Knowles *et al.*, 2005).

3.2.2 Uso de extractos vegetales

Se han aislado alrededor de 12.000 compuestos con actividad antimicrobiana procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen sólo el 10 % de los metabolitos secundarios (Schultes, 1978). Ejemplos de inhibición antibacteriana utilizando extractos vegetales son el reportado por Corzo en 2012, donde utilizó extractos etanólicos, de tallos y frutos, de *Cestrum buxifolium* Kunt (conocida como tinto o uvito morado), para la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*; Dávila *et al.*, 2013, usaron extractos de poro, *Allium amepoprasum*, para inhibir a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

La utilización de terapias alternativas para el tratamiento de enfermedades está incrementándose en los países occidentales incluyendo Estados Unidos; uno de los principales atractivos de estos tratamientos es su aparente falta de efectos secundarios comparada con la de las terapias con antibióticos (García, 2006).

Entre los mecanismos que tienen las bacterias para inducir resistencia esta la presión selectiva a la que son sometidas con los tratamientos de antibióticos, por ello es que

los extractos vegetales son una alternativa de tratamiento, pues el uso de estos ha sido muy limitado (García, 2006). Por otra parte estudios recientes muestran el potencial que ha tenido el uso de extractos de *Stevia rebaudiana*, la cual ha mostrado eficacia en el control de algunas bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y levaduras.

3.3 *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia rebaudiana Bertoni es un pequeño arbusto del norte de Paraguay, que ha sido utilizado por los nativos como edulcorante y con propósitos medicinales; fue descrito botánicamente por el naturalista Moisés Santiago Bertoni en 1905 como una planta herbácea de 40 a 80 cm de altura, de la familia de las compuestas (Gamboa and Chaves, 2012; Contreras, 2013).

S. rebaudiana se ha utilizado como endulzante en alimentos y bebidas, como hipoglucemiante en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 y como anti-caries en pastas y gomas de mascar (Gregersen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de extractos de *S. rebaudiana* Bertoni frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Aspergillus niger*, *Epidermophyton*, *Rhizopus oligosporus* y *Candida albicans* usando disolventes como agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo y hexano (Manish *et al.*, 2006; Jayaraman *et al.*, 2008; Gamboa and Chavez, 2012).

Estos estudios muestran una gran variedad de efectos biológicos contra diversos microorganismos patógenos cuando son evaluados con extractos de distintas polaridades como se muestra en la Tabla 1, donde se presentan las medidas de los halos de inhibición de extractos de *S. rebaudiana* Bertoni frente a un amplio número de especies de hongos y bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, sin que se mencione el porcentaje de glucósidos presentes en cada extracto probado (Manish *et al.*, 2006; Jayaraman *et al.*, 2008; Gamboa and Chaves, 2012).

Kuntal *et al.*, 2009 reportaron que cultivar *S. rebaudiana* Bertoni en suelo ácido, que contiene mayor carbono orgánico, hace que la planta tenga mayor acumulación

Tabla 1. Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos de *Stevia rebaudiana* con diversos disolventes (Halos de inhibición en mm)

Microorganismo	Agua	Metanol	Etanol	Acetona	Cloroformo	Hexano	Referencia
<i>Bacillus megaterium</i>		10.67				16.33	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Bacillus subtilis</i>	8.33 0 10 10	9.8 9.96 26	9.9 9.68	18	8	15.33	Manish <i>et al.</i> , 2006; Jayaraman <i>et al.</i> , 2006; Kuntal <i>et al.</i> , 2009; Singh <i>et al.</i> , 2012.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	9	12				15.5	Vitery <i>et al.</i> , 2010.
<i>Micrococcus luteus</i>		8.67				11	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Staphylococcus aureus</i>	9.33 0 11.5 11.23	8.33 10.5 10.06	10.2 9.49	19	0		Manish <i>et al.</i> , 2006; Jayaraman <i>et al.</i> , 2006; Kuntal <i>et al.</i> , 2009;
<i>Streptococcus mutans</i>	9	11.5				14.5	Vitery <i>et al.</i> , 2010.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0			14	0	16.67	Manish <i>et al.</i> , 2006; Jayaraman <i>et al.</i> , 2006.
<i>Escherichia coli</i>	0 0	8.67 0 16	0	10	6		Manish <i>et al.</i> , 2006; Jayaraman <i>et al.</i> , 2006; Kuntal <i>et al.</i> , 2009; Singh <i>et al.</i> , 2012.
<i>Proteus vulgaris</i>		9.33				12	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		13.67				19.67	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Salmonella typhi</i>	0 0 10.03	0	0 9.43	13	7		Jayaraman <i>et al.</i> , 2006; Kuntal <i>et al.</i> , 2009;
<i>Serratia marcescens</i>		8.67				12	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Vibrio cholerae</i>	0			10	6		Jayaraman <i>et al.</i> , 2006.
<i>Aspergillus niger</i>		10				16.33	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6			4	3		Jayaraman <i>et al.</i> , 2006.
<i>Epidermophyton</i>	7			7	10		Jayaraman <i>et al.</i> , 2006.
<i>Rhizopus oligosporus</i>		8.67				22	Manish <i>et al.</i> , 2006.
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	11			11	11		Jayaraman <i>et al.</i> , 2006.
<i>Candida albicans</i>	4	8.33		4	3	35.33	Manish <i>et al.</i> , 2006; Jayaraman <i>et al.</i> , 2006.

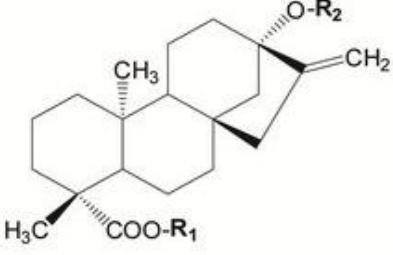
de glucósidos en las hojas y esto puede ayudar a la actividad antimicrobiana. Sin embargo no hay estudios que indiquen el porcentaje de glucósidos de los extractos evaluados; los componentes principales de los glucósidos son el steviósido y el rebaudiósido A, por ello la importancia de cuantificarlos.

3.4 Steviósido y rebaudiósido A

Los glucósidos de steviol o steviósidos, son endulzantes naturales encontrados en las hojas de *S. rebaudiana* y sus principales componentes son el steviósido y el rebaudiósido A. El steviósido es un glucósido diterpénico, comprendiendo de una aglicona de steviol y tres moléculas de glucosa. Además del steviósido, varios compuestos dulces, como el steviobiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y el dulcósido A, han sido aislados de la hoja *Stevia rebaudiana*. Todos éstos glucósidos diterpénicos, tienen la misma estructura vertebradora (steviol) pero se diferencian en las cadenas de hidrato de carbono en las posiciones C13 y C19, como se muestra en la figura 1 (Chatsudthipong *et al.*, 2009).

Los componentes principales de la hoja son el steviósido (que es aproximadamente el 5-10 % del peso seco total), el rebaudiósido A (2-4 %), el rebaudiósido C (1-2 %) y dulcósido A (0.4-0.7 %) (Chatsudthipong *et al.*, 2009).

Diversos autores señalan que la concentración de estos en la planta aumenta o disminuye, dependiendo de factores que la alteran, por ejemplo cuando la planta está en floración la concentración de los steviósidos disminuye (Kuntal *et al.*, 2009), es por ello la importancia de coleccionar las hojas, dado que en ellas se encuentra la mayor parte de glucósidos y deben ser recolectadas antes de la floración. La variedad de la planta es otro factor influyente, en estudios previos sobre las variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni, se determinó que la variedad *Stevia rebaudiana* Bertoni morita posee mayor concentración de glucósidos (Singh *et al.*, 2012). Por lo anterior, es importante determinar la concentración de glucósidos en la planta.



Compound	R ₁	R ₂	MW
Stevioside	Glc(β)-	Glc(β1-2)Glc(β)-	804.9
Rebaudioside A	Glc(β)-	Glc(β1-2)Glc(β)- Glc(β1-3) ↓	967.0
Rebaudioside B	H-	Glc(β1-2)Glc(β)- Glc(β1-3) ↓	804.9
Rebaudioside C	Glc(β)-	Rha(α1-2)Glc(β)- Glc(β1-3) ↓	951.0
Rebaudioside D	Glc(β1-2)Glc(β)-	Glc(β1-2)Glc(β)- Glc(β1-3) ↓	1129.2
Rebaudioside F	Glc(β)-	Xyl(β1-2)Glc(β)- Glc(β1-3) ↓	937.0
Steviolbioside	H-	Glc(β1-2)Glc(β)-	642.7
Dulcoside A	Glc(β)-	Rha(α1-2)Glc(β)-	788.9
Rubusoside	Glc(β)-	Glc(β)-	642.7

Glc: D-glucose, Rha: L-rhamnose, Xyl: D-xylose

Figura 1. Estructuras químicas de los principales metabolitos de los glicósidos de steviol (Tada, 2013)

3.4.1 Determinación de glucósidos de steviol por HPLC

Aunque se ha estudiado la propiedad antimicrobiana de *Stevia rebaudiana* Bertoni pocos son los estudios que dan a conocer las concentraciones de glucósidos presentes en sus extractos. Se han reportado muchos métodos de análisis para la separación y cuantificación de los glucósidos de steviol. Sin embargo, el método más simple y más fiable es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La primera separación por HPLC con éxito de steviósido y rebaudiósido A fue reportado por Hashimoto en 1978, donde usaron una columna empaquetada hidrófila Shodex Ohpak M-414 y detectaron sólo steviósido y rebaudiósido A. Ahmed y Dobberstein (1982) desarrollaron un método para la separación y cuantificación de los ocho glucósidos diterpenos conocidos de *Stevia rebaudiana*, el steviósido, steviobiósido, rebaudiósido A-E, y dulcósido A. Donde utilizaron dos columnas I-125 de proteína en serie. En 2010 Woelwer-Rieck realiza la separación en una columna analítica Luna HILIC. Las desventajas significativas que presenta su método son una alta concentración de

acetonitrilo de 85% volumen y el hecho de que sólo los grandes glucósidos de steviol, rebaudiósido A y steviósido, se detectaron en alta resolución (Bergs *et al.*, 2012).

3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para conocer la sensibilidad de una bacteria a determinado agente antibacterial y la concentración de este, se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI), que ha sido uno de los indicadores más utilizados en la terapia antimicrobiana durante décadas. Se define como *“la concentración más baja de droga que inhibe el crecimiento visible de microorganismos entre las 18 y 24 horas de cultivo”* y es expresada en mg/mL (CLSI, 2006).

4. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos en uso es un problema de salud pública; el uso de bactericidas químicos aunque son eficaces llegan a participar en la resistencia bacteriana. Algunos estudios han demostrado que bacterias como *Pseudomona sp* y *Staphylococcus sp* que se aíslan frecuentemente del aire, tienen la habilidad genética para transferir y adquirir factores de resistencia a diferentes sustancias puesto que ambas poseen plásmidos de resistencia, los cuales les confiere la capacidad de adaptarse rápidamente a cambios ambientales. Hoy en día se han propuesto alternativas para el control de microorganismos en las que se han utilizado compuestos naturales por ejemplo los metabolitos secundarios obtenidos de plantas. Se ha demostrado que extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni contienen compuestos que presentan actividad antimicrobiana frente a un amplio número de bacterias de origen intrahospitalario o clínico, mientras que hay pocos estudios de estos extractos sobre bacterias aisladas del ambiente, sin que se mencione el porcentaje de glucósidos de steviol presentes en los extractos evaluados o que se tenga una idea clara del o los componentes responsables de la actividad antimicrobiana.

5. OBJETIVOS

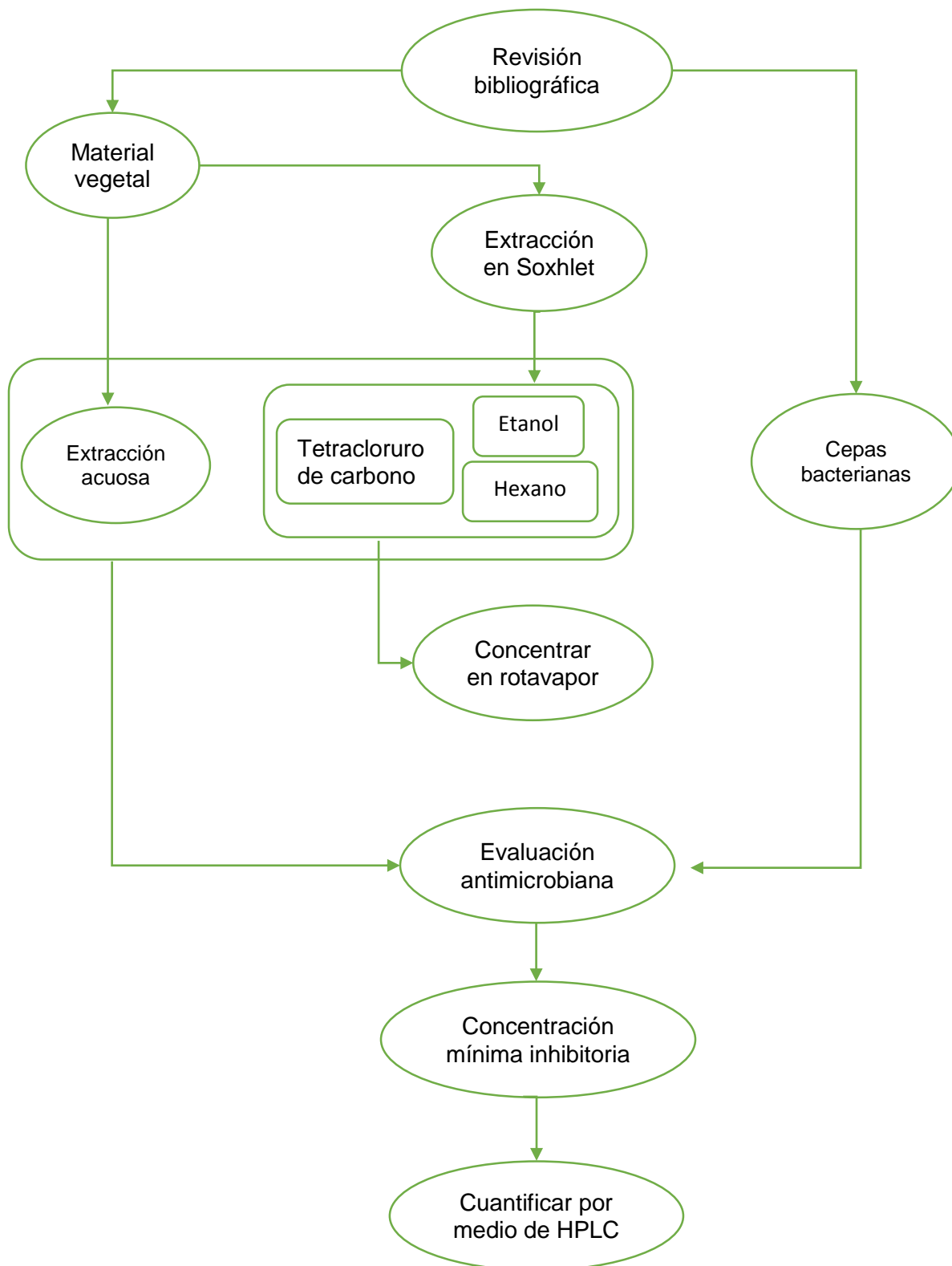
5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre cepas ambientales de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni con diversos disolventes como agua, etanol, tetracloruro de carbono y hexano.
- Evaluar la sensibilidad a antibióticos de las cepas ambientales en estudio, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos sobre las cepas ambientales por el método de difusión en pozo y extendido en superficie.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos más efectivos.
- Cuantificar la concentración de steviósido y rebaudiósido A de los extractos con actividad antimicrobiana mediante HPLC.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y MÉTODOS

Material de vidrio y reactivos de grado analítico, los necesarios para cada determinación.

Para el proceso de HPLC se utilizaron reactivos grado HPLC y estándares de steviósido y rebaudiósido A (TCI®), proporcionados por el CIBA de Tlaxcala.

7.1 Material biológico

Hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni proporcionadas por el CIBA de Tlaxcala.

Cepas bacterianas proporcionadas por el Depto. de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas BUAP, aisladas del aire y *Staphylococcus epidermidis*, resistente a metilicina, donada por el Hospital Ángeles de Puebla (cepa 80299).

Tabla 2. Cepas bacterianas

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ATCC 25923	Cepa 80299	ATCC 27853
Cepa 921	Cepa 965	Cepa RO3
	Cepa 982	Cepa RO4
	Cepa 735	

7.2 Métodos

En la tabla 2 se muestran los métodos empleados.

Tabla 3. Métodos y referencias

Determinación	Técnica	Referencia
Extracción	Método Soxhlet. Método de cocción.	Modificado de Kuntal <i>et al.</i> , 2009.
Bioensayo (evaluación antimicrobiana)	Difusión en pozo y extendido en superficie.	Modificado de Sumit <i>et al.</i> , 2008.
Concentración mínima inhibitoria (MIC)	Método de dilución en agar.	Modificado de Koneman, 2008.
Cuantificación de extractos	Cuantificación por HPLC	Modificado de Bergs <i>et al.</i> , 2012.

8. METODOLOGÍA

8.1 Acondicionamiento de la materia prima

A partir de hojas secas de *Stevia rebaudiana*, se seleccionaron las hojas de acuerdo a la presencia o ausencia de fracciones negras, las cuales fueron removidas. Posteriormente las hojas secas se pulverizaron con ayuda de un mortero hasta tener un polvo fino. El pulverizado se almacenó a temperatura ambiente en bolsas con sellado hermético hasta su uso.

8.2 Obtención de los extractos

Se colocaron 25 gramos de hoja seca y pulverizada en 100 ml de cada disolvente por separado: etanol (002), tetracloruro de carbono (003) y hexano (004) en un equipo Soxhlet durante 5 horas. Se realizó la concentración de los extractos por medio de un rotavapor a condiciones de temperatura específicas para cada disolvente, hasta que no quedó residuos aparentes de disolvente. Para el extracto acuoso (001) se utilizó la técnica de cocción en la cual se colocó 25 gramos del pulverizado de hojas en 100 ml de agua destilada y se mantuvo en agitación mecánica aproximadamente a 220 rpm durante 24 horas; el sobrenadante se utilizó como extracto. Cada concentrado se almacenó a temperatura ambiente en frascos herméticos color ámbar.

8.3 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Para conocer las características de resistencia de las cepas utilizadas se realizaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos, por el método de Kirby-Bauer, en placas Petri con agar Mueller Hinton. Los antibióticos utilizados fueron, para las cepas de *Staphylococcus*: Piperacilin-Tazobactam, Cefepime, Gatifloxacina, Vancomicina, Tetraciclina, Ofloxacina, Ampicilina y Dicloxacilina; y para *Pseudomonas* Piperacilin, Cefepime, Meropenem, Ofloxacina, Gatifloxacina, Piperacilin-Tazobactam, Aztreonam, Imipenem y Gentamicina. Las placas se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C. Cada prueba se realizó por duplicado.

8.4 Bioensayo de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni

La actividad antibacteriana de los extractos obtenidos, 001, 002, 003 y 004, se determinó sobre las cepas ambientales de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando el método de difusión en pozo y extendido en superficie. Para lo cual se inoculó la cepa, a una concentración de 1.5×10^8 células/mL, correspondiente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, sobre placas de agar Mueller Hinton con pozos. Dentro de cada pozo se colocó cada extracto a probar y un control negativo (SSI esterilizada), como control positivo se utilizó Vancomicina e Imipenem para *Staphylococcus* y *Pseudomonas* respectivamente. Las placas fueron incubadas a 37°C de 18 a 24 horas, al cabo de este tiempo se midió el tamaño de los halos de inhibición. Cada ensayo se realizó por triplicado.

8.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

Se probaron dos métodos para esta determinación, una por dilución en caldo y otra por dilución en agar. Para la evaluación en caldo, se realizaron varias diluciones del extracto en tubos con caldo nutritivo (1/10, 0.8/10, 0.5/10, 0.3/10 y 0.1/10), después se agregó una suspensión bacteriana estandarizada correspondiente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland. En ese momento se realizó una primera lectura de turbidez de todos los tubos, después 24 horas a 37°C se realizó una segunda lectura, para determinar si hubo crecimiento bacteriano o si la turbidez se había mantenido.

Para la dilución en agar, se inoculó un volumen estandarizado de una suspensión bacteriana con concentración de 1.5×10^8 células/mL, y agua destilada, como control negativo, en una serie de placas de agar Mueller Hinton, cada una de las cuales contenía una concentración diferente de extracto (1/10, 0.8/10, 0.5/10, 0.3/10 y 0.1/10). Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37°C; pasado el tiempo de incubación se interpretó como positivo si no se observó crecimiento en el sitio de inoculación.

Se descartó la técnica de dilución de caldo debido a que los extractos presentan coloración que interfiere en la lectura de turbidez

8.6 Cuantificación de los glucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni por HPLC

Cada extracto se diluyó en una relación de 0.1:1 (w/v) con agua grado HPLC, posteriormente se inyectó en el cromatógrafo siguiendo el método modificado de Bergs 2012, el cual consiste en el uso de software de Chem lab y uso de detector DAD. La columna utilizada fue una Reverse Phase C18 (1800 x 4.0 mm, 5 μ m) con una fase móvil isocrática de agua (agua a 18M Ω acidulada con HCl a pH 2.75) con acetonitrilo desgasificado en una relación de 65:35 con un flujo de 1mL/min a temperatura ambiente y con un tiempo de corrimiento de 15 minutos. Los picos obtenidos se compararon con los estándares de steviósido y rebaudiósido A (TCI®).

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 Obtención de extractos

El rendimiento que se logró para el extracto acuoso fue de 94.8 g %, que es mayor a lo reportado por Manish, 2006, Kuntal, 2009 y Sumit, 2008. Con el extracto hexánico se tuvo un rendimiento de 6.4 g %, que es mayor a lo obtenido por Manish, 2006 (Tabla 4). Sin embargo, el rendimiento del extracto etanólico y del extracto tetraclorado, de 10.8 g % y 9.2 g % respectivamente, fue menor que lo obtenido por Kuntal, 2009 y Sumit, 2008 (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento obtenido por diversos autores (g %)

Agua		Metanol		Etanol		Acetato de etilo		Tetracloruro de carbono		Hexano	
Rto.	Ref.	Rto.	Ref.	Rto.	Ref.	Rto.	Ref.	Rto.	Ref.	Rto.	Ref.
94.8	Autor	30.2	Manish, 2006.	30	Sumit, 2008.	20	Sumit, 2008.	9.2	Autor	6.4	Autor
50	Sumit, 2008.	26.2	Kuntal, 2009.	24.8	Kuntal, 2009.	10.31	Manish, 2006.			1.74	Manish, 2006.
28	Kuntal, 2009.	25.8	Kuntal, 2009.	18.9	Kuntal, 2009.						
26.4	Kuntal, 2009.			10.8	Autor						
22.44	Manish, 2006.										

$$\frac{(1g)(g \text{ obtenidos en la extracción})}{(g \text{ de material vegetal seco})} \times 100 = g \%$$

Ecuación 1. Fórmula para cálculo de rendimiento

9.2 Sensibilidad a antibióticos

A las 24 horas de incubación se midió los halos de inhibición en milímetros y se comparó con los resultados obtenidos por Holt, 1994 (Tabla 5). Se determinó que cuatro cepas de *Staphylococcus* presentan resistencia (R) a Dicloxacilina y que la cepa 735 posee susceptibilidad intermedia (I) a Cefepime y Ampicilina; corroborando que estas bacterias han adquirido factores de resistencia.

Tabla 5. Sensibilidad antibacteriana de las cepas de *Staphylococcus*

Antibiótico	Cepas			
	S. <i>aureus</i> 921	S. <i>epidermidis</i> 965	S. <i>epidermidis</i> 982	S. <i>epidermidis</i> 735
Piperacilin-Tazobactam	S	S	S	S
Cefepime	S	S	S	I
Gatifloxacina	S	S	S	S
Vancomicina	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S
Ofloxacina	S	S	S	S
Ampicilina	S	S	S	I
Dicloxacilina	R	R	R	R

S: Sensible; **I:** Intermedio; **R:** Resistente

Cepas control: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 80299.

En la Tabla 6 se observa que todas las cepas de *Pseudomonas* son sensibles (S) a los antibióticos evaluados, a pesar de ser una especie rica en plásmidos de resistencia.

Tabla 6. Sensibilidad antibacteriana de las cepas de *Pseudomonas*

Antibiótico	Cepas	
	<i>P. aeruginosa</i> RO3	<i>P. aeruginosa</i> RO4
Piperacilin	S	S
Cefepime	S	S
Meropenem	S	S
Ofloxacina	S	S
Gatifloxacina	S	S
Piperacilin-Tazobactam	S	S
Aztreonam	S	S
Imipenem	S	S
Gentamicina	S	S

S: Sensible.

Cepa control: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

9.3 Actividad antimicrobiana de los extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Inicialmente se valoró la susceptibilidad/resistencia de las bacterias en estudio, a los diferentes disolventes utilizados para la extracción con la finalidad de descartar posibles efectos bactericidas. Los resultados indican que las bacterias no presentan inhibición de su crecimiento por la presencia de los disolventes.

Para determinar el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula empleada por Martínez en 1996, Ecuación 2.

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

Ecuación 2. Porcentaje de efecto inhibitorio

El porcentaje de inhibición bacteriano más alto obtenido por el extracto acuoso fue, para una cepa de *Staphylococcus epidermidis* (965), de 84%, mientras que no mostro actividad inhibitoria para *Pseudomonas aeruginosa* (RO 3 y RO 4). El extracto etanólico alcanzó inhibición de 55% y 56% para cepas de *Staphylococcus epidermidis* (965) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) respectivamente, y no tuvo actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus epidermidis* (735) y *Pseudomonas aeruginosa* (RO 4). Los resultados del extracto tetraclorado muestran porcentajes de inhibición cercanos entre *Staphylococcus epidermidis* (965 y 982) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 3) de 31%, 32% y 33% respectivamente, sin embargo no existe actividad inhibitoria frente a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 y RO 3). Cabe resaltar la actividad antibacteriana del extracto hexánico que logró inhibir el crecimiento de todas las cepas evaluadas, siendo 61% el más alto para *Staphylococcus aureus* (921) y 23% el más bajo para *Pseudomonas aeruginosa* (RO 3) (Tabla 7). Las diferencias en la sensibilidad de estas bacterias a los extractos de *S. rebaudiana* puede deberse particularmente a las diferencias entre géneros y especies y a las distinciones entre la organización de la pared celular (Loesche, 1986; Marcotte y Lavoie, 1998).

Tabla 7. Actividad antimicrobiana (%) de los diversos extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni contra cepas bacterianas evaluadas

Cepa	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto tetraclorado	Extracto hexánico
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	58.45	55.71	32.88	51.14
<i>S. aureus</i> 921	37.04	22.79	29.91	61.25
<i>S. epidermis</i> 982	54.63	50.73	32.52	50.73
<i>S. epidermis</i> 735	14.29	0.00	14.29	44.44
<i>S. epidermis</i> 965	84.44	54.81	31.11	42.96
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	29.11	46.58	0.00	45.12
<i>P. aeruginosa</i> RO 3	0.00	16.51	0.00	22.86
<i>P. aeruginosa</i> RO 4	0.00	0.00	12.50	43.75

9.4 Concentración mínima inhibitoria

La CMI del extracto acuoso para *Staphylococcus aureus* (921) es de 4 mg/mL, 1.2 mg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (80299 y 965) y 40 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), menor a lo reportado por Manish, 2006, 50 mg/mL, pero no supera lo obtenido por Kuntal, 2009 que fue de 0.3 mg/mL.

La CMI lograda por el extracto etanólico para *Staphylococcus aureus* (921) es de 0.161 mg/mL, 0.268 mg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (80299) y 5.36 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 y RO3), menor que lo obtenido por Kuntal, 2009 que fue de 0.3 mg/mL.

La CMI del extracto tetraclorado para *Staphylococcus aureus* (921) es de 0.23 mg/mL y 2.3 mg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (80299, 965, 982 y 735) y *Pseudomonas aeruginosa* (RO4).

La CMI del extracto hexánico para *Staphylococcus aureus* (921) fue de 0.011 mg/mL y 1.06 mg/mL para *Staphylococcus epidermidis* (80299, 965, 982 y 735) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853, RO3 y RO4) menor que lo obtenido por Manish, 2006, de 50 mg/mL. Sin embargo se observa que el extracto hexánico fue el que logró inhibir a todas las cepas con las concentraciones más bajas (Tabla 8) demostrando su capacidad de inhibir a las cepas evaluadas.

Una mayor susceptibilidad a los diferentes extractos puede deberse a la estructura celular de la pared o a la presencia de una sustancia o mezcla sinérgica en los extractos que puede penetrar a la bacteria fácilmente y producen un daño mayor (Murphy, 1999; Sparg *et al.*, 2004). Se necesitan estudios adicionales en el aislamiento, caracterización e identificación de sustancias presentes en los extractos.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (en mg/mL)

Cepa	Extracto acuoso	Extracto etanólico	Extracto tetraclorado	Extracto hexánico
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	40	5.36	2.3	1.06
<i>S. aureus</i> 921	4	0.161	0.23	0.011
<i>S. epidermis</i> 80299	1.2	0.268	2.3	1.06
<i>S. epidermis</i> 965	1.2	0.429	2.3	1.06
<i>S. epidermis</i> 982	40	5.36	2.3	1.06
<i>S. epidermis</i> 735	40	*	2.3	1.06
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	40	5.36	*	1.06
<i>P. aeruginosa</i> RO 3	*	5.36	*	1.06
<i>P. aeruginosa</i> RO 4	*	*	2.3	1.06

* No existe actividad antibacteriana

9.5 Cuantificación de steviósido y rebaudiósido A por HPLC

Para determinar la concentración de glucósidos presentes en los extractos analizados se utilizó la fórmula utilizada por Canuas, 2015 Ecuación 3 y 4.

$$\text{Steviósido} = \frac{\text{área bajo la curva} - 48.465}{1399.2}$$

Ecuación 3. Fórmula para calcular mg/muestra de Steviósido

$$\text{Rebaudiósido A} = \frac{\text{área bajo la curva} - 17.015}{1225.2}$$

Ecuación 4. Fórmula para calcular mg/muestra de Rebaudiósido A

En la tabla 9, se observa que el extracto acuoso 001 presenta mayor contenido tanto de steviósido como de rebaudiósido A, 9.08 y 40.63 mg/g de hoja respectivamente, que el extracto etanólico. Sin embargo, la eficacia del extracto 001 es menor a la eficacia de los extractos 002, 003 y 004, que es igual entre si (Anexo A); al contrario de lo que Kuntal *et al.*, reportaron en 2009, que mayor acumulación de glucósidos en las hojas puede ayudar a la actividad antimicrobiana. Por lo que aún es necesario identificar el componente presente en los extractos responsable de la inhibición bacteriana.

Tabla 9. Concentración de steviósido y rebaudiósido A por HPLC (mg/g de hoja)

	Steviósido	Rebaudiósido A
Extracto acuoso	9.08	40.63
Extracto etanólico	0.13	0.68
Extracto tetraclorado	--	--
Extracto hexánico	--	--

-- No determinados

10. CONCLUSIONES

- El mayor rendimiento de extracción se logró con agua obteniendo 94.8 g %, seguido de etanol, tetracloruro de carbono y hexano, con 10.8, 9.2 y 6.4 g %, respectivamente.
- Las cepas de *Staphylococcus* en estudio, presentan resistencia a Dicloxacilina y sensibilidad intermedia a Ampicilina y Cefepime.
- El extracto hexánico mostró el efecto inhibitorio con la menor concentración 1.06 mg/mL, logrando inhibir a todas las cepas evaluadas.
- El extracto acuoso presentó mayor contenido de steviósido y rebaudiósido A, 9.08 y 40.63 mg/g de hoja respectivamente, pero no se relacionó con su actividad antimicrobiana.
- Los extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni presentan un porcentaje de inhibición frente a las cepas bacterianas evaluadas de 12 a 84%.

11. RECOMENDACIONES

- Fraccionar cada extracto mediante cromatografía en columna.
- Analizar los eluatos obtenidos mediante cromatografía de capa fina.
- Realizar pruebas antimicrobianas con cada fracción obtenida.
- Identificar y caracterizar la o las fracciones con actividad antimicrobiana.
- Desarrollar antisépticos elaborados a partir de componentes de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ang JY, Ezike E, Asmar BI. (2004). Antibacterial resistance. *Indian J Pediat*, 71, 229-239.
- Ávila L, Baquero E, Viña A, Murrillo E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Vitae*. 3 (1), 55-60.
- Aydogdu H, Asan A, Tatman Otkun M. (2010). Indoor and outdoor airborne bacteria in child day-care centers in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of meteorological factors. *Environ Monit Assess*, 164 (1-4), 53-66.
- Bergs D, Burghoff B, Joehnck M, Martin G, Schembecker G. (2012). Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 7 (2), 147–154.
- Boronin AM. (1992a). Diversity of *Pseudomonas* plasmids: to what extent? *FEMS Microbiology Letters*, 100 (1), 461-164.
- Boronin AM. (1992b). Diversity and relationships of *Pseudomonas* plasmids. En: *Pseudomonas. Molecular Biology and Biotechnology*. Galli E. Silver S and Wirholt B (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis*, 48 (1), 1-12.
- Brown C. (2004). Emerging zoonoses and pathogens of public health significance-an overview. *Rev Sci Tech Off. Int Epiz*, 23 (2), 435-442.
- Cabrera EC, Gomez FR, Zuñiga AE. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 39 (2), 149- 158.
- Canuas V. (2015). Extracción enzimática asistida por ultrasonido de esteviósido y rebaudiósido A presente en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de

- Licenciatura en Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP, p 56.
- Casellas JM, Pinto ME, Guzmán Blanco M. (1994). Infectious diseases. *Clin North Am*, 8, 29-45.
- Chatsudthipong V, Muanprasat C. (2009). El esteviósido y sus compuestos relacionados: Los beneficios terapéuticos más allá de la dulzura. *Pharmacology & Therapeutics*, 121, 41-54.
- Chen J, Jeppesen PB, Nordentoft I, Hermansen K. (2006). Stevioside counteracts the glyburide-induced desensitization of the pancreatic beta-cell function in mice: studies in vitro. *Metabolism Clinical and Experimental*, 55 (12), 1674-1680.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th ed. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Contreras MS. (2013). Anticariogénicas propiedades y efectos on periodontal structures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Oral research*, 2 (3), 158-166.
- Corzo D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. *Rev Mex Cienc Farm*, 43 (3), 81-86.
- Dávila RM, Sosa RA, Navarro AR, Téllez V, Lazcano MA. (2013). Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de un extracto oleoso de poro (*Allium ampeloprasum* Var. *porrum*). *Rev Soc Quím Perú*, 79 (1), 21-28.
- Domingo D, López M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Española Quimioterapia*, 16 (4), 385-393.
- Errecalde JO. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. *FAO Producción y sanidad animal*, 162, 1-67.
- Fahlgren C, Hagström A, Nilsson D, Zweifel UL. (2010). Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 76 (9), 3015-3025.

- Gamboa F, Chaves M. (2012). Antimicrobial potential of extracts from *Stevia rebaudiana* leaves against bacteria of importance in dental caries. *Acta Odontológica Latinoamericana*, 25 (2), 171-175.
- García C. (2006) Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 124 p.
- Gregersen S, Jeppesen PB, HHolst JJ, Hermansen K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism Clinical and Experimental*, 53 (1), 73-76.
- Hashimoto Y, Moriyasu M. (1978). Determination of sweet components in *Stevia rebaudiana* by high performance liquid chromatography ultraviolet detection. *Shoyakugaku Zasshi*, 32 (2), 209-11.
- Holt JG, Krieg NR. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9ª edición. Baltimore, USA.
- Jacoby GA. (1986). Resistance plasmids of *Pseudomonas*. En: *The Bacteria*. Vol. X. *The Biology of Pseudomonas*. Sokatch JK (Ed.). Academic Press, New York, 265-292.
- Jayaraman S, Manoharan MS, Illanchezian S. (2008). *In-vitro* Antimicrobial and Antitumor Activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) Leaf Extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7 (4), 1143-1149.
- Jones KE., Patel NO, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Kleven RM, Morrison MA, Fridkin SK, Reingold A, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Fosheim G, McDougal LK, Tenover F C. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. (2006). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and healthcare risk factors. *Emerg Infect Dis*, 12 (12), 1991-1993.
- Knowles JR, Roller S, Murray DB, Naidu AS. (2005). Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus*

- aureus* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Appl Environ Microbiol*, 71 (2), 797-803.
- Koneman. Diagnostico Microbiológico Texto y atlas en color. 6ª edición. Buenos Aires. 2008. Ed. Médica Panamericana. 935-938.
- Kuntal DAS, Raman DANG, Nilesh GUPTA. (2009). Comparative antimicrobial potential of different extracts of leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 3 (1), 65-68.
- Liang R, Xiao P, She R, Han S, Chang L, Zheng L. (2013). Culturable airborne bacteria in outdoor poultry-slaughtering facility. *Microbes Environ*, 28 (2), 251-256.
- Liu D, Chai T, Xia X, Gao Y, Cai Y, Li X, Miao Z, Sun L, Hao H, Roesler U, Wang J. (2012). Formation and transmission of *Staphylococcus aureus* (including MRSA) aerosols carrying antibiotic-resistant genes in a poultry farming environment. *Sci total Environ*, 426, 139-145.
- Loesche W. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50, 353-380.
- Manish B, Subhash R. (2006). *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaves. *Tropical Journal Of Pharmaceutical Research*, 5 (1), 557-560.
- Marcotte H, Lavoie MC. (1998). Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 71-109.
- Martínez JL, Bernardini A, Sánchez MB, García G, Cuesta T, Lira F, Alcalde M, Corona F, Olivares J. (2013). Patógenos oportunistas. *Biología de los microorganismos patógenos*, 55 (1), 57-58.
- Martínez MJ, (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera* (sábila). *Rev. Cubana Plant Med*, 1 (3), 18-20.
- McDonnell G, Russell AD. (1999). Antisépticos y desinfectantes: Actividad, Acción y Resistencia. *Clin Microbiol Rev*, 12 (1), 147-179.
- Murphy M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12, 564-582.

- Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol*, 31, 247-256.
- Neu HC. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257, 1064-1073.
- Pan American Health Organization (PAHO). (1995). *PAHO Regional Plan for Emerging Diseases*. Washington, PAHO.
- Pérez LH, Zurita IM, Pérez N, Patiño N, Calvimonte O. (2010). Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, manejo actual y prevención. *Rev. Cient. Cienc. Med*, 13 (2), 94-98.
- Picao RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. (2009). Diversity of betalactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (9), 3908–3913.
- 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.
- Rodriguez PAU. (2006). Evaluación de la actividad bactericida *in vitro*. *Rev. Mexicana de patología clínica*, 53 (2), 123-125.
- Rojas L, Figueroa J. (2006a). Perfil antimicrobiano por concentración mínima inhibitoria (CMI) de propóleos producido por empresas asociativas en Colombia. *Mem. Conf. Interna med. Aprovech. Fauna silv. Exót. Conv*, 2 (1), 4-9.
- Rojas N, Chávez E, García F. (2006b). Bacteriología diagnóstica. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. 150 p.
- Ruiz JC, Moguel YB, Matus A, Segura MR. (2015). Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutr Hosp*, 31 (3), 1163-1170.

- Sayler GS, Hooper SW, Layton AC and Henry King JM. (1990). Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. *Microbial Ecology*, 19 (1), 1-20.
- Schlegel HG, Zaborosch C. Microbiología General. Séptima edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1997.
- Schultes RE. (1978). The kingdom of plants. En: Thomson, W.A.E. (Ed.) Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Singh S, Garg V and cols. (2012). *In-vitro* antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* (Bertonii). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (3), 468-473.
- Sparg SG, Light ME, Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*, 94, 219-243.
- Tada A, Ishizuki K, Iwamura J, Mikami H, Hirao Y, Fujita I, Yamazaki T, Akiyama H, Kawamura Y. (2013). Improvement of the Assay Method for Steviol Glycosides in the JECFA Specifications. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4 (4), 190-196.
- Tomilinson B, Chan TY, Chan JC, Critchley JA, But PP. (2000). Toxicity of complementary therapies: an eastern perspective. *Journal of Clinical Pharmacology*, 40, 451-456.
- Velasco R, Rangel O, Perea LM. (2013). La importancia clínica actual de *Staphylococcus aureus* en el ambiente intrahospitalario. *Educación Química*, 24 (1), 8-13.
- Vignoli R, Seija V. (2008). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. Instituto de Higiene Uruguay. *Temas de bacteriología y virología médica*. 651-662.
- Vitery SGR, Escribano VS, Gamboa JFO, Chavarria BN, Gomez SRA. (2010). Actividad inhibitoria de la *Stevia rebaudiana* sobre el *Lactobacillus acidophilus* y el *Streptococcus mutans*. *Revista Nacional de Odontología*, 6 (10), 57-64.

- Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M. (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231 (4), 581-588.
- World Health Organization (WHO). (2011). Movilizar la voluntad política para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Bulletin of the World Health Organization*, 89, 168–169.
- Wright GD. (2012). The origins of antibiotic resistance. *Handb Exp Pharmacol*, 211, 13-30.
- Zaborina O, Kohler JE, Wang Y, Bethel C, Shevchenko O, Wu L, Turner JR, Alverdy JC. (2006). Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5 (14), 1-10.

13. ANEXOS

Anexo A. ANOVA unidireccional: Extracto 001, Extracto 002, Extracto 003, Extracto 004. (Minitab 17)

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores
Factor 4 Extracto 001, Extracto 002, Extracto 003, Extracto 004

Análisis de Varianza

	SC				
Fuente	GL	Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1922	640.8	6.01	0.002
Error	32	3413	106.7		
Total	35	5336			

Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.	
S	R-cuad. (ajustado)	(pred)	
10.3277	36.03%	30.03%	19.04%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Extracto 001	9	18.49	20.44	(11.48, 25.50)
Extracto 002	9	2.478	2.738	(-4.535, 9.490)
Extracto 003	9	1.559	1.114	(-5.453, 8.571)
Extracto 004	9	0.943	0.350	(-6.069, 7.956)

Desv.Est. agrupada = 10.3277

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Extracto 001	9	18.49	A
Extracto 002	9	2.478	B
Extracto 003	9	1.559	B
Extracto 004	9	0.943	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo B. Cromatogramas de steviósido y rebaudiósido A de diferentes extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni

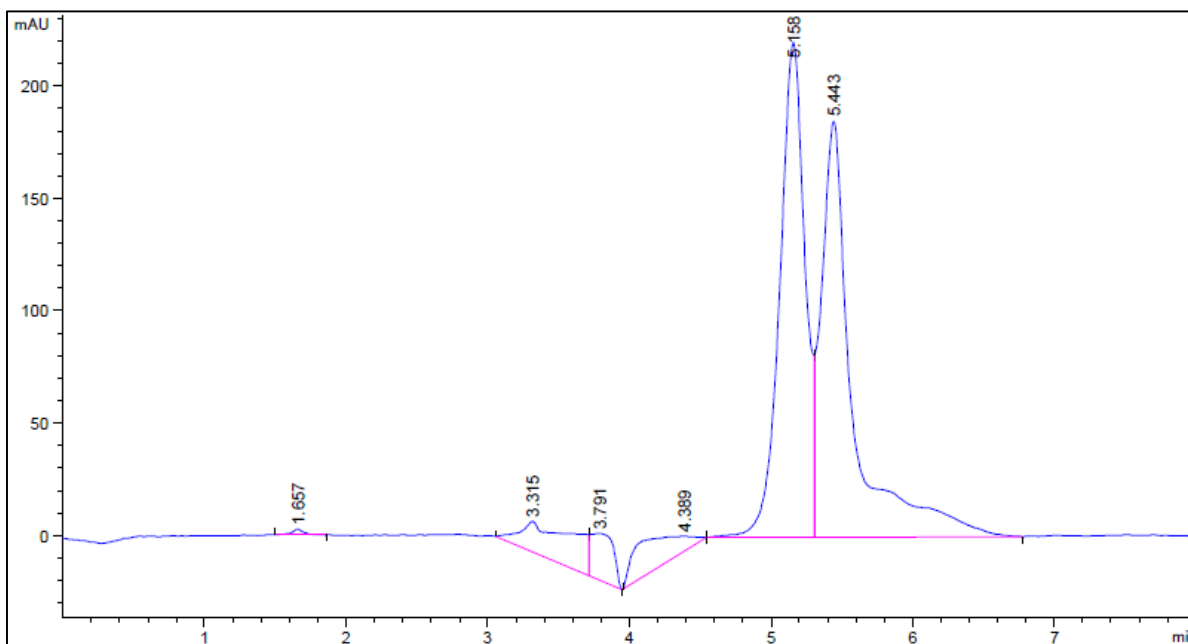


Figura 2. Cromatograma de estándar de steviósido (5.443 min) y rebaudiósido A (5.158 min)

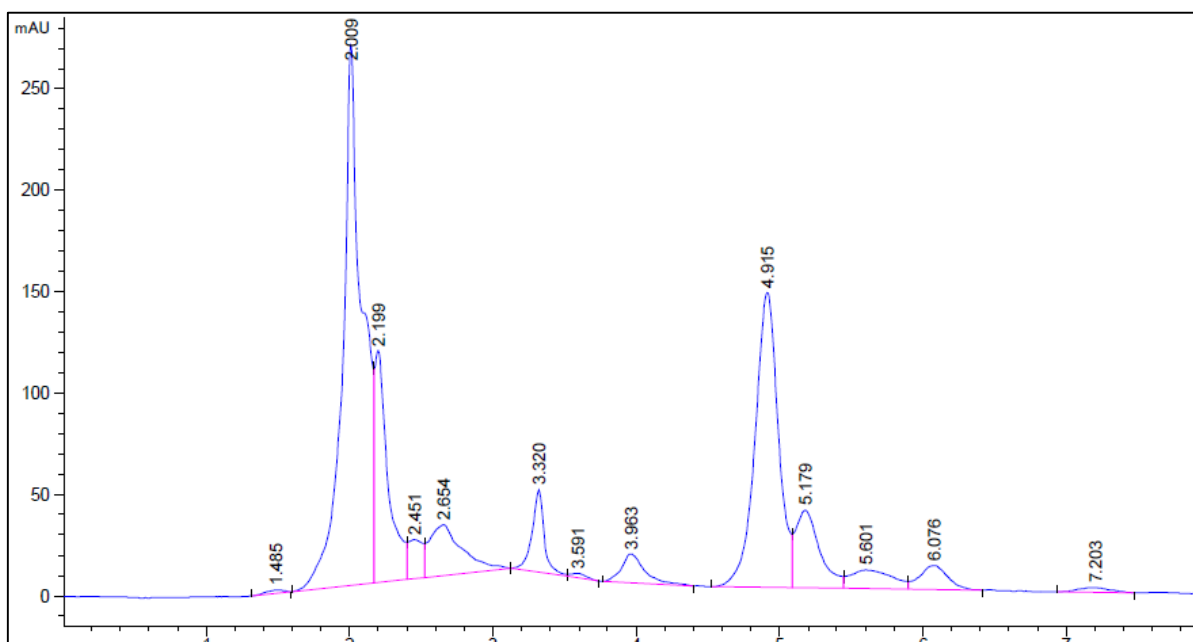


Figura 3. Cromatograma de steviósido (5.179 min) y rebaudiósido A (4.915) del extracto acuoso

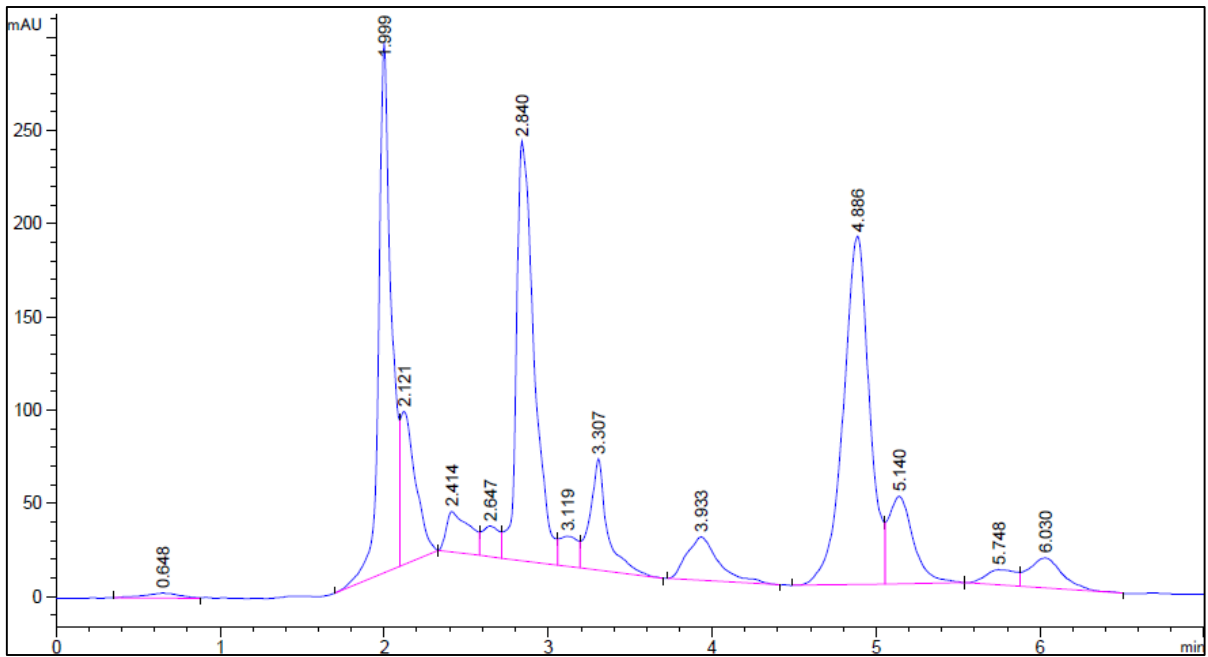


Figura 4. Cromatograma de steviósido (5.140 min) y rebaudiósido A (4.886) del extracto etanólico