

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Postgrados

Efecto antimicrobiano del látex de *Jatropha curcas* frente a *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA).

Ana Cristina Chávez Peña

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención de Magister en Microbiología

Quito

Febrero 2013

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Posgrado

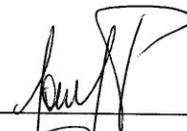
HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Efecto antimicrobiano del látex de *Jatropha curcas* frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA).

ANA CRISTINA CHÁVEZ PEÑA

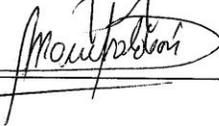
Gabriel Trueba, Ph.D.

Director de Tesis



Manuel Baldeón, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis



Cesar Zambrano, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis



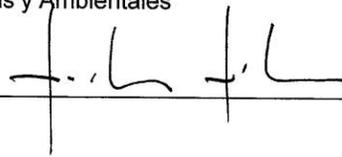
Sttela de Torre, Ph.D.

Directora del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales



Victor Viteri Breedy, Ph.D.

Decano del Colegio de Posgrados



Quito, Enero 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:



Nombre: Ana Cristina Chávez Peña

C. I.: 1717059586

Fecha: 23 de enero 2013

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por mantener mi fe y demostrarme con hechos que su amor supera cualquier tipo de obstáculos, barreras y fronteras.

A mi esposo Francisco por todo su apoyo y paciencia y por toda la felicidad y amor que me brinda todos los días.

A mis padres Jorge y Ana Elisa, por su ejemplo de lucha pero sobre todo por su amor y apoyo.

A mis hermanos Marco y Paola por su ejemplo de perseverancia, tenacidad y amor.

AGRADECIMIENTO

A Gabriel Trueba, Manuel Baldeón, Csar Zambrano, Lourdes Orejuela y David Egas, por todo el apoyo científico y técnico y además por ser mis maestros en caminos de ciencia y de vida.

Vlastimir Zac, Estefany Santander, Janeth Zurita y Francisco Iturra por su apoyo técnico.

A Verónica Barragán, Sarita Cifuentes, Carolina Proaño, Paulina Armas y Linda Guamán, por su amistad y apoyo.

A todo el equipo de trabajo del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco.

A Daisy Parrales y Nancy Tayango por su ayuda valiosa con todo el material que se usó en los ensayos de este trabajo de investigación.

RESUMEN

En este estudio se demostró que el látex *Jatropha curcas* tiene un efecto antimicrobiano selectivo importante frente al género de *Staphylococcus* spp., la investigación se centró principalmente en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA). El látex de *Jatropha curcas* no tiene ningún efecto antimicrobiano contra bacterias Gram negativas probadas en este estudio, ensayos físico-químicos demostraron que la temperatura y el pH no afectan la bioactividad del látex contra MRSA, las fracciones cetónica, metanólica y etanólica presentaron bioactividad frente a MRSA, a diferencia de las fracciones no polares (hexano, tolueno y cloroformo). La fracción que se usó para ensayos posteriores fue FM003 (fracción metanólica capa 3). Pruebas fitoquímicas realizadas en el látex evidenció la presencia de taninos catéquicos y alcaloides y fue negativo para heterósidos cianogénicos, heterosidos saponínicos y taninos gálicos. Un ensayo con espectometría de masas demuestran que la fracción FM003, contiene un alcaloide denominado Amodiaquina.

Palabras clave: *Jatropha curcas*; látex; *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA); toxicidad, *Artemia salina*; concentración mínima inhibitoria, fracción FM003 (fracción metanólica capa 3).

ABSTRACT

The latex of *Jatropha curcas* has an important selective antimicrobial effect against *Staphylococcus* spp. This research focused mainly on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The latex of *Jatropha curcas* has no antimicrobial effect against Gram negative bacteria tested in this study. Physical-chemical tests showed that neither the temperature nor pH affect the latex bioactive compounds against MRSA. Ketone, ethanolic and methanolic extracts showed bioactivity against MRSA, unlike nonpolar fractions (hexane, toluene and chloroform). The fraction most employed was FM003 (methanolic fraction layer 3). Phytochemical tests conducted in latex showed the presence of tannins catechic and alkaloids. Mass spectrometry assays demonstrate that FM003 fraction contains a alkaloid called Amodiaquin.

Keywords: *Jatropha curcas*; latex; methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); toxicity; brine shrimp; minimum inhibitory concentration; FM003 fraction (fraction methanolic layer 3).

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Staphylococcus aureus.....	1
1.2	Resistencia a Antibióticos en Staphylococcus.....	2
1.3	Cassette Cromosomal de Staphylococcus aureus mec (SCC-mec).	4
1.4	Staphylococcus aureus meticilino resistente problema de salud pública.....	5
2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
2.1	Recolección del látex de Jatropha curcas y almacenamiento.	8
2.2	Microorganismos analizados.	8
2.3	Identificación de Staphylococcus aureus meticilino resistente.....	8
2.4	Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos	9
2.5	Estabilidad a temperatura y pH.....	10
2.6	Fraccionamiento del látex de J. curcas a través de un extractor Soxhlet	10
2.7	Fraccionamiento con embudo de separación.	10
2.8	Ensayo de toxicidad con Artemia salina.....	11
2.9	Concentración mínima inhibitoria (técnica de macrodilución en caldo)	11
2.10	Ensayos cualitativos para detección de fitoquímicos.....	12
2.11	Análisis de la fracción metanólica a través de un Espectrometro de masas.....	13
2.12	Análisis estadístico.	13
3	RESULTADOS	14
3.1	Actividad antimicrobiana del látex crudo de Jatropha curcas.....	14
3.2	Estabilidad del principio activo de látex de Jatropha curcas.	14
3.3	Fraccionamiento del látex de J. curcas	15
3.4	Látex puro versus fracción FM003:.....	16
3.5	Actividad antimicrobiana de la fracción FM003 en bacterias Gram negativas:	16
3.6	Ensayo de toxicidad en Artemia salina:.....	17
3.7	Espectrometría de masas.....	18
4	DISCUSIÓN.....	19
5	CONCLUSIONES.....	23
6	RECOMENDACIONES.....	24
7	Bibliografía.....	25

8	ANEXOS	41
9	ANEXO1	41
9.1	ANEXO 2	42

LISTA DE FIGURAS:

Tabla 1	Zonas de inhibición expresada en milímetros (mm) de distintos bacilos Gram negativos frente al látex puro de <i>Jatropha curcas</i>	29
Tabla 2	Zonas de inhibición expresada en milímetros (mm) de distintas especies de <i>Staphylococcus</i> frente al látex puro de <i>Jatropha curcas</i>	30
Tabla 3	Zona de inhibición expresa en milímetros (mm) de alícuotas del látex de <i>J. curcas</i> sometidas a distintas temperaturas y pH frente a MRSA.	31
Tabla 4	Zona de inhibición expresada en milímetros (mm) de las diferentes fracciones del látex de <i>Jatropha curcas</i> , obtenidas a través de un separador Soxhlet frente a MRSA.	32
Tabla 5	Efecto antimicrobiano de las fracciones obtenidas mediante Soxhlet y posteriormente tratadas en embudo de separación frente a MRSA.	33
Tabla 6	Comparación de zonas de inhibición expresadas en milímetros (mm) entre la fracción FM003 y el látex de <i>Jatropha curcas</i> frente a MRSA.....	34
Tabla 7	Zonas de inhibición expresada en milímetros (mm), de la fracción FM003 de <i>Jatropha curcas</i> frente a bacterias Gram negativas.....	35
Tabla 8	Efecto citotóxico de la fracción FM003 del látex de <i>J. curcas</i> frente a <i>Artemias salinas</i> a las 72 horas de tratamiento.....	36
Tabla 9	Zona de inhibición expresada en milímetros (mm) de la fracción FM003 frente a MRSA usando iguales concentraciones que el ensayo de toxicidad frente <i>Artemias salinas</i>	37

Gráficos:

Gráfico 1 Efecto citotóxico de la fracción FM003 del látex de <i>Jatropha curcas</i> frente a <i>Artemias salinas</i> , a las 72 horas de tratamiento.	38
Gráfico 2 Concentración mínima inhibitoria de la fracción FM003 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente (MRSA).	39
Gráfico 3 Resultado del análisis con Espectrometría de masas de la fracción FM003 del látex de <i>Jatropha curcas</i> . En el eje de las X, los números representan la carga y masa de cada uno de los fragmentos del compuesto, el pico más alto (283, 147) representa el ión molécula, el eje de las Y representa el porcentaje de abundancia relativa de cada uno de los fragmentos de la molécula. Por lo tanto de acuerdo al tiempo de retención 13.4 minutos, al ión molécula con una masa/carga del pico 283 y al pico fragmento de molécula con una masa/carga de 219.115 el Mass bank Project identificó un flavonoide denominado Amodiaquin.....	40

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Staphylococcus aureus*.

Los *Staphylococcus sp.* son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 micrómetros de diámetro (Murray P. B., 1999). La palabra *Staphylococcus* se origina del griego *staphylé*, que significa “racimo de uvas” esta disposición adoptan cuando se los observan al microscopio, aunque en ocasiones se encuentra en pares, cadenas o en cocos individuales (Murray, 1999; Murray P. R., 2006) (Ryan K, 2005). Estas bacterias se caracteriza por no tener flagelo, no forman esporas y a diferencia de los *Streptococcus sp.* produce catalasa (Murray, 1999; Ryan K, 2005). Existen alrededor de 35 especies y 17 subespecies (Murray P. R., 2006). Las especies de mayor interés clínico son: *Staphylococcus aureus*, *epidermidis* y *saprophyticus*. Las especies patógenas se destacan por formar coágulos a partir del plasma, generar hemólisis y poseer una gran variedad de toxinas extracelulares (Brooks G., 2011). El péptidoglucano de *Staphylococcus aureus* está asociado a moléculas involucradas en adhesión tal como el factor de aglutinación (Clf), la fibronectina (FnBP) y la proteína A (Murray P. B., 1999).

Dentro de los factores de virulencia más importante encontrados en *Staphylococcus sp.* son la toxina alfa y toxina beta involucradas en la formación de abscesos y daño tisular, toxina delta relaciona a lisis eritrocitaria, toxinas exfoliativas (ETA y ETB) responsables del síndrome de la piel escaldada estafilocócica, enterotoxinas (A, B y C) que actúan como superantígenos que generan liberación de citocinas, toxina TSST-1 responsable del síndrome del shock térmico, toxina Leucocidina de Panton-Valentine (PVL), se encuentra principalmente en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad, la cual provoca poros

principalmente en los polimorfonucleares generando lisis e inflamación (Murray P. R., 2006; Labandeira, 2007).

El *Staphylococcus aureus* además es responsable de bacteremia, endocarditis, neumonía, empiema osteomielitis y artritis séptica (Murray P. R., 2006).

1.2 Resistencia a Antibióticos en Staphylococcus.

Los *Staphylococcus* tienen la capacidad de adquirir resistencia a antibióticos de forma rápida y eficiente. En 1940 Alexander Fleming descubrió la penicilina, que combatió infecciones severas causadas por *Staphylococcus* sin embargo para 1950 esta bacteria ya adquirió resistencia a esta droga, en la actualidad menos del 10 % de *Staphylococcus* sp. son susceptibles a la penicilina (Murray P. R., 2006).

La resistencia a los betalactámicos como penicilina; está dada por las enzimas denominadas penicilasas, las cuales hidrolizan el anillo betalactámico de la penicilina, las enzimas se encuentran en plásmidos transmisibles, el clon de *Staphylococcus aureus* denominado fago 80/81 fue responsable de verdaderas pandemias a nivel hospitalario y comunitario (Murray P. R., 2006; Chambers H D. F., 2009).

Como una alternativa para combatir esta primera línea de resistencia se crearon penicilinas semisintéticas como meticilina, nafcilina, oxacilina y dicloxacina (Murray P. R., 2006). Diez años después (1961) del desarrollo de estos antimicrobianos, en Inglaterra se aisló un *Staphylococcus aureus* meticilino resistente o MRSA del inglés (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) (Chambers H D. F., 2009).

Esta resistencia está dada por una proteína de unión a la penicilina denominada (PBP2) del inglés *penicillin-binding protein*, la cual se codifica a partir del gen *mecA* (Murray P. R., 2006). El PBP2 es responsable del paso final de la síntesis de peptidoglicano en la formación

de la pared celular del *Staphylococcus sp*, además disminuye la afinidad de los beta-lactámicos a la proteína de unión a la penicilina PBP (Matsui H, 2011) (Cuirolo A, 2009). Actualmente 30-50 % de los *Staphylococcus aureus* son meticilino resistentes (Murray P. R., 2006). Por un periodo de tiempo los MRSA se encontraron en centros de salud y hospitales, pero pocos años después se encontró personas de la comunidad portadoras sanas de MRSA, que acaban infectando a pacientes ambulatorios, por lo tanto de acuerdo a la población que infectan los MRSA se dividen en : *Staphylococcus aureus* asociado a hospitales (HA-MRSA) del inglés (*Health care-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus*) y *Staphylococcus aureus* adquirido en la comunidad (CA-MRSA) del inglés (*Community-acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus*) (Chambers H D. F., 2009).

El antibiótico de elección para el tratamiento de los MRSA multiresistentes es la vancomicina, sin embargo 1996 en Japón se aisló el primer VISA (*Staphylococcus aureus* vancomicina intermedio) y finalmente en el 2002 en Estados Unidos el primer VRSA (*Staphylococcus aureus* vancomicina resistente) (Conly, 2002). *S. aureus* adquiere resistencia a la vancomicina a partir de transferencia horizontal de genes con *Enterococcus sp.*, el cual posee un transposón denominado Tn1546, responsable de llevar el operón VanA el cual codifica 9 polipéptidos responsables de remplazar el dipéptido D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac durante la síntesis del peptidoglicano (Perichon, 2009), otro mecanismo para adquirir resistencia a vancomicina es a partir de la biosíntesis del lípido II, que induce el engrosamiento de la pared y así evita la entrada de la vancomicina al *Staphylococcus aureus* (Ikeda S, 2010).

1.3 Cassette Cromosomal de Staphylococcus aureus mec (SCC-mec).

La resistencia a meticilinas por parte del *Staphylococcus aureus* está dado por una proteína denominada PBP2 ((IWG-SCC), 2009), esta proteína se forma a partir de un elemento móvil denominado cassette cromosomal del *Staphylococcus aureus mec*, abreviado con las siglas (*SCC-mec*) del inglés (staphylococcal cassette chromosome *mec*), el cual se caracteriza por estar ubicado en el ADN cromosomal de la bacteria, estar delimitado por secuencias repetitivas, contiene un complejo *mec* que lleva el gen de resistencia a las meticilinas (*mec A*) y un complejo *ccr* responsable de la recombinación ((IWG-SCC), 2009) (Chen L, 2010) .

La clasificación de los SCC-mec se basa en una combinación binaria entre el complejo *mec* y el complejo *ccr* ((IWG-SCC), 2009). La adquisición de este elemento móvil se piensa que es análogo a una isla de patogenicidad excepto que en lugar de codificar factores de virulencia codifica genes de resistencia a antibióticos (Katayama Y, 2000) (Chambers H, 2001). La resistencia a este antibiótico se le ha calificado de heterogénea que consiste en que algunas poblaciones de MRSA a pesar de tener el gen *mecA* presentan un fenotipo heterogéneo de resistencia a la oxacilina (algunas células son sensibles y otras células son resistentes), estas poblaciones pueden llegar a presentar una resistencia homogénea a oxacilina cuando están en presencia de antibióticos betalactámicos. El mecanismo para este cambio se presenta cuando las cepas heterogéneas se exponen a dosis de betalactámicos los cuales activan el sistema SOS (reguladores LexA/ RecA), que producen un incremento en la tasa de mutación que permite la selección a una población homogéneamente resistente a oxacilina (Cuirolo A, 2009).

1.4 Staphylococcus aureus meticilino resistente problema de salud pública.

El incremento de resistencia a antibióticos por parte del MRSA es un problema de salud pública (Boucher, 2008), en Estados Unidos y Europa se considera que más del 50% de las cepas de *Staphylococcus sp.* son resistentes a la meticilina. El número de muertes en EEUU ocasionadas por infecciones por MRSA es de aproximadamente 19.000 muertes/año (Guzmán M, 2009), según estudios realizados en América Latina desde 1997 al 2006 ha incrementado la resistencia por parte de los MRSA de un 33.8% a 40.2% (Guzmán M, 2009), el primer caso de CA-MRSA reportado en América Latina fue en Brasil en el año 2003 (Boucher, 2008). En Ecuador en un estudio realizado en el año 2004 se observó que de 1363 aislados, 25% eran MRSA (Guzmán M, 2009). En un estudio realizado en el 2007 en el Hospital del Seguro Social de Quito, se evidenció la presencia de 7 grupos de *Staphylococcus de aureus* que circulan en la unidad de cuidados intensivos, la variabilidad se debía a la circulación frecuente del personal de la salud en la unidad de cuidado intensivos, mala manipulación de equipos gástricos y respiratorios (Cardenas, 2008).

Los factores predisponentes para la adquisición de CA-MRSA es la terapia de antibióticos, contacto con personal de la salud, niños que están constantemente llevando sus dedos al aparato respiratorio superior (Rodriguez E, 2010) y los factores predisponentes para la adquisición HA-MRSA son cirugías, diálisis, uso prolongado de catéteres, HIV (Virus de inmunodeficiencia humana) (Guzmán M, 2009; Benoit, 2008; Srinivasan, 2009). Es posible que CA-MRSA este ingresando a los ambientes hospitalario (Chambers H, 2001; Reyes, 2009).

Recientes estudios demuestran que en Estados Unidos personas mueren más por infecciones por MRSA que por HIV (Payne, 2008) actualmente las líneas de investigación usadas para

crear nuevos antibióticos se basa en nuevas versiones de medicamentos ya existentes como B-lactámicos, quinolonas, macrólidos y glicopéptidos que originalmente fueron aislados de hongos y bacterias (Clardy J, 2009; Payne, 2008).

Durante las últimas tres décadas se ha observado un claro descenso en la creación de nuevos antibióticos, esto se debe principalmente al costo de inversión, ya que un agente antimicrobiano aprobado, tiene un costo de alrededor de 400 y 800 millones de dólares, cifra que no se ve recompensada al momento que el producto sale a la venta, ya que el tratamiento con antimicrobianos es de máximo 15 días, las farmacéuticas se han enfocado más a la creación de medicamentos de uso prolongando, por la rentabilidad que esto conlleva por ejemplo medicamentos para pacientes que padecen de diabetes, hipertensión, HIV etc. (Spellberg B, 2008).

Los glicopéptidos como la vancomicina y linezolid se ha convertido en el último recurso para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (Perez, 2008), es necesario contar con nuevas estrategias para combatir, controlar y prevenir la acción de bacterias multiresistentes y crear nuevos antibióticos dirigidos hacia nuevas dianas bacterianas. (Perez, 2008)

Los extractos derivados de plantas han sido valorados enormemente por ser fuente de agentes terapéuticos, tienen diversidad química, especificidad bioquímica y propiedades moleculares que los hacen candidatos idóneos para el descubrimiento de nuevos fármacos (Koehn & Carter, 2005)

En la presente investigación se utilizó la planta *Jatropha curcas* (*J. curcas*) para investigar la presencia de compuestos antibacterianos frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

J. curcas, es una planta que se cultiva en América del Sur y Central, África, India y en el Sureste de Asia (Oskoueian E, 2011) pertenece a la familia de las Euphorbiaceas, tiene aproximadamente 175 especies (Thomas R, 2008). El nombre *Jatropha curcas* deriva del griego *iatros* (médico) y *trophe* (alimentos) por las características derivadas de su uso (Thomas R, 2008). Igual que todos los miembros de la familia Euphorbiaceae, *J. curcas* contiene un látex en su tallo (savia lechosa), que ha sido utilizada desde tiempos inmemorables como medicina ancestral (Debnath M, 2008). En el látex de *J. curcas* se ha identificado la presencia de compuestos como el jatrophine, jatropham en los cuales se ha hallado actividad anti-cancerígena, otro compuesto como curcain, una enzima responsable de efectos cicatrizantes en modelos murinos y además se menciona actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans* (Thomas R, 2008; Debnath M, 2008). Un cribado de actividad antimicrobiana en extractos químicos de plantas representa el punto de inicio para el descubrimiento de nuevas drogas (Briemann, 2006). El uso de plantas en etnofarmacología es bien conocido, pero mucha de la información es empírica y carente de validez científica. Este trabajo busca demostrar, a través de distintos experimentos que el látex de *J. curcas* puede ser un posible candidato antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente bacteria que se ha convertido en un verdadero problema de salud pública.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 *Recolección del látex de *Jatropha curcas* y almacenamiento.*

El látex de *Jatropha curcas* fue recolectado en Manabí-Ecuador, sector El Colorado. Se realizó una incisión a nivel del tallo de cada planta, se recolectó las gotas de látex en recipientes estériles y se almacenó a 8 y -20°C en alícuotas de 10mL. La especie de vegetal fue identificada en el herbario de la Universidad San Francisco de Quito.

2.2 *Microorganismos analizados.*

Las bacterias usadas para los ensayos fueron proporcionadas por Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, cada una de las bacterias fue identificada mediante análisis bioquímicos. Las bacterias analizadas fueron *S. aureus* meticilino resistente (MRSA), *S. aureus* ATCC, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomona aeruginosa* ATCC, *Citrobacter youngae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella sp.* *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* y *Pseudomona flurecens*.

2.3 *Identificación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.*

Pruebas bioquímicas-microbiológicas:

MRSA se identificó a través de las siguientes pruebas: tinción Gram (Merck), pruebas de producción de catalasa a través de peróxido de hidrógeno al 3% (Merck), producción de coagulasa (libre y conjugada), fermentación de manitol salado (BD-Quito), fermentación de urea (BD-Quito), susceptibilidad a la novobiocina (BD-Quito), resistencia a la polimixina B (BD-Quito) y resistencia a la oxacilina a través del disco de cefoxitin (BD-Quito) (Murray P. B., 1999) (Clinical, 2011).

Identificación molecular:

Las pruebas moleculares se realizaron en los Laboratorios Zurita y Zurita, a través de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se identificó la presencia de los genes *mecA* (que codifica para la proteína PBP2), el gen *nuc* (que codifica para una nucleasa termoestable) y el gen *pvl* (que codifica para la toxina leucocidina de Pantón Valentain).

2.4 Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos

Se utilizó la prueba de Kirby-Bauer de acuerdo a las recomendaciones de Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical, 2011) se usó como control, discos de antibiótico de imipenem de 10µg (Becton Dickinson-Quito), vancomicina 30 µg (Becton Dickinson-Quito) y linezolid 30 µg/disco (Becton Dickinson-Quito). Las cajas fueron incubadas por 24 horas a 37°C y la actividad antimicrobiana se demostró mediante medición del diámetro de la zona de inhibición, expresada en milímetros.

Para analizar la actividad antimicrobiana del látex de *Jatropha curcas* se elaboró discos de 6mm de diámetro con papel Watman N° 5, cada disco recibió concentraciones de (1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5 mg/disco) de la fracción a estudiarse, los discos se secaron en una incubadora por 24 horas. El control negativo fue un disco que recibió igual volumen de agua estéril o solución salina y los controles positivos fueron discos con antibióticos para los cuales las bacterias analizadas eran sensibles.

2.5 Estabilidad a temperatura y pH

Se prepararon alícuotas con látex de *J. curcas* y se sometieron a distintas temperaturas (30°C, 45°C, 75°C y 90°C, 100 °C y 121°C durante 30 min) y a distintos rangos de pH (3.5 a 6.5 y 7.0). El pH se subió usando (5ml de látex+15 ml de agua destilada+4 gotas de fenoftaleína) a esta solución, a través de titulación se añadió hidróxido de sodio hasta que se evidencio cambio de pH, el pH se midió con un potenciómetro (inoLab)

2.6 Fraccionamiento del látex de *J. curcas* a través de un extractor Soxhlet

Para el fraccionamiento inicialmente se desengrasó el látex con éter anhidro y agua dentro de embudo de separación, se usó la fase acuosa para el fraccionamiento con extractor Soxhlet, se usaron solventes no polares (hexano y cloroformo) y polares (acetona, etanol y metanol) el tiempo para cada tratamiento fue de 8-24 horas y la temperatura dependió del punto de ebullición de cada solvente (Cseke, 2006), cada fracción se ensayó bioactividad frente a MRSA a través de la prueba de Kirby-Bauer observar (ANEXO 1).

2.7 Fraccionamiento con embudo de separación.

Las fracciones polares obtenidas con el separador Soxhlet se sometieron dentro de un embudo de separación a una mezcla de solventes, la fracción cetónica se mezcló con (hexano, benzeno, agua y cetona), la fracción metalólica con (hexano, benzeno, agua y metanol) y la fracción etanólica con (hexano, benzeno, agua y etanol) todas las soluciones se realizaron en una relación de 20:20:20:20 volumen/volumen, de cada fracción se obtuvo 4 diferentes capas que se designaron con las letras F de (fracción) C, E M de (cetona, etanol y metanol respectivamente) y números (001, 002, 003 y 004) de acuerdo a la capa obtenida en el embudo de separación, 001 inicia en la fase acuosa y 004 termina en fase orgánica, cada una

de las fracciones se probó bioactividad frente MRSA a través de la técnica de KirbyBauer, observar (ANEXO 1).

2.8 Ensayo de toxicidad con *Artemia salina*.

El ensayo de citotoxicidad se llevó acabo de acuerdo a las indicaciones de (Carballo, 2002), con algunas modificaciones. En un litro de agua mineral se disolvió 35 gramos de sal marina, a esta solución se añadió 1g de huevos de *Artemia salina* que permanecieron bajo luz y aireación constante. Por otra parte se preparó discos de 1cm de diámetro con papel Watman N° 5 y se añadió la fracción FM003 a concentraciones finales de (1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 3.5mg/disco) los discos se secaron a 55°C por 24 horas y posteriormente se autoclavaron. En una placa de 24 pocillos, se midió 1ml de agua marina y se colocó un disco preparado con la fracción FM003, se contó diez larvas de *Artemia salina* con la ayuda de una pipeta Pasteur y se suspendieron en cada pocillo., se usó como control positivo hipoclorito al 1% y como control negativo (*Artemias* + medio sin tratamiento), todos los ensayos se realizaron por triplicado y se monitoreó las *Artemias* móviles y no móviles a las 24 y 72 horas para determinar el porcentaje de mortalidad.

2.9 Concentración mínima inhibitoria (técnica de macrodilución en caldo)

La concentración mínima inhibitoria se llevó acabo de acuerdo a las recomendaciones de (Cavaliere, 2005) con algunas modificaciones. Se elaboró discos con papel Watman N° 5, de 1cm de diámetro, en cada disco se impregnó, la fracción FM003 a las siguientes concentraciones (1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 y 10mg/disco), los discos se dejaron secar en una estufa a 55°C durante 24 horas, luego se autoclavaron a 121°C por 15minutos. Por otra parte en tubos que contenían 1mL de medio

minimal M9, se realizó un Mcfarland de 0.5 de turbidez con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA), en cada tubo se colocó discos con concentraciones determinadas de la fracción FM003, cada concentración se hizo por duplicado, como blanco o control negativo se usó (M9+Fracción FM003 sin MRSA) control positivo (M9+MRSA sin fracción FM003). Se incubó por 24 horas a 37°C. después se midió la absorbancia de cada tubo en un espectrofotómetro a 560nm.

2.10 Ensayos cualitativos para detección de fitoquímicos

Las pruebas fitoquímicas se realizó de acuerdo a las indicaciones de las referencias (Patil S, 2012) (UCM) con algunas modificaciones.

En una mezcla de 2ml de látex puro más 2ml de agua destilada, se colocó una tirilla de papel que contenía impregnado 3ml de ácido pícrico y 3ml de carbonato sódico, un cambio de color anaranjado en la tirilla, se tomó como un indicador de la presencia de heterósidos cianogénicos (Patil S, 2012) (UCM).

Se preparó un mezcla cromogénica con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.1g de dicromato potásico, a esta mezcla se añadió 2ml de látex puro, la formación de un anillo verde esmeralda se tomó como indicador de presencia de heterósidos saponinicos (Patil S, 2012) (UCM).

Se mezcló 3 ml de látex más 3 ml del reactivo de Stiasny (HCL+Formol 1:1) y se filtró. Al precipitado resultado de la filtración, se le añadió 5 gotas de cloruro férrico al 0.1% mas 5 gotas de amoniaco, un color azul verdoso se tomó como indicador de presencia de taninos catéquicos (Patil S, 2012) (UCM).

Para determinar la presencia de taninos gálicos, al precipitado anterior se le añadió 5 gotas de cloruro férrico y 3 gotas de acetato sódico, un color azul se tomó como indicador de presencia de taninos gálicos.

Se mezcló 25ml de látex más 50ml de éter y 50ml de agua destilada se agito y se recuperó la fase orgánica, a esta fase se le añadió 10mL de éter más 30ml de ácido clorhídrico al 0.1M, se alcalinizó la solución con 3 ml de hidróxido de amonio, a esta solución se añadió 5 gotas del reactivo yodado de Mayer, la formación de un precipitado blanco se tomó como indicador de presencia de alcaloides (Patil S, 2012) (UCM).

2.11 Análisis de la fracción metanólica a través de un Espectometro de masas.

El ensayo se llevó acabo de acuerdo a las indicaciones establecidas en el equipo de Agrocalidad. La muestra fue disuelta en metanol grado HPLC, la tasa de flujo fue de 3 μ l/ml. El tiempo de retención fue al minuto 13,4. Los resultados fueron interpretados mediante un software (Database, 2006). El equipo que se usó para este ensayo fue Acquity Xevo TQ-S

2.12 Análisis estadístico.

Se usó Paired-Samples T Test, para observar diferencias significativas entre tratamientos y un Univariate Analysis of Variance para determinar diferencias significativas entre látex puro y la fracción FM003. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de P fue > 0.05 . Se usó el paquete estadístico SPSS versión 11.5

3 RESULTADOS

3.1 *Actividad antimicrobiana del látex crudo de Jatropha curcas.*

La actividad antimicrobiana del látex de *J. curcas*, se evaluó con la técnica de Kirby Bauer usando discos que contenían concentraciones de 50 y 100 µl de látex puro/disco, las bacterias que se probó fueron Gram positivas y Gram negativas, se escogieron por su importancia clínica y por las diferencias estructurales de cada una. Los resultados demostraron que el látex no tuvo ningún efecto antimicrobiano en el grupo de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Shigella sp.*, *Serratia sp.*, *Salmonella sp.* y *Providencia sp.* (Tabla 1), a diferencia de los Gram positivos donde se observó una clara inhibición del crecimiento en el género de *Staphylococcus spp.* (Tabla 2), por otro lado los discos usados como controles en Gram negativos y Gram positivos (imipenem y vancomicina respectivamente) inhibieron a cada una de las bacterias con halos que de acuerdo a los puntos de corte del CLSI se consideraron susceptibles. Cuando se comparó los halos obtenidos entre tratamientos, 50µl/disco versus 100µl/disco se observó diferencias significativas ($P > 0.05$).

Una vez que se identificó la importante actividad antimicrobiana del látex de *J. curca* frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) la investigación se centró en este microorganismo.

3.2 *Estabilidad del principio activo de látex de Jatropha curcas.*

Se realizó pruebas físico químicas que permitieron observar las condiciones más idóneas para trabajar con el látex de *J. curcas* los compuestos bioactivos fueron estables a temperaturas de 30, 45, 75, 90, 100 y 121°C y a pH de 3.5, 6.5 y 7.0. Los datos demostraron

que ni la temperatura ni el cambio de pH a estas condiciones afectó la actividad antimicrobiana frente a MRSA a través de la técnica de Kirby-Bauer (tabla 3).

3.3 *Fraccionamiento del látex de J. curcas*

Se procedió a fraccionar el látex con el propósito de identificar los potenciales compuestos bioactivos del látex contra el MRSA, como indica la sección de materiales y métodos y el ANEXO 1.

Los extractos polares y no polares separados con el equipo Soxhlet fueron probados contra MRSA, los datos demostraron que los compuestos aislados en las fracciones no polares, no tuvieron actividad antimicrobiana contra el MRSA, mientras que las fracciones polares aisladas mantuvieron actividad antimicrobiana comparable con el control de linezolid (tabla 4).

Una vez que se estableció que las fracciones polares tenían actividad antimicrobiana cada fracción fue procesada dentro de un embudo de separación, de acuerdo a las indicaciones de materiales y métodos.

Las fracciones polares se trataron nuevamente con una mezcla de solventes polares y no polares dentro de un embudo de separación, de la fracción cetónica se obtuvo 4 capas identificadas como (FC001, FC002, FC003, FC004) las capas de la fase acuosa (FC001 y FC002) demostraron tener una mayor actividad antimicrobiana que la fase orgánica, de la fracción metanólica se obtuvo 4 capas identificadas como (FM001, FM002, FM003 y FM004) y de la fracción etanólica se obtuvo 3 capas identificadas como (FE001, FE002 y FE003) igual que la fracción cetónica las fracciones metanólica y etanólica presentaron un patrón similar, capas de la fase acuosa mayor actividad que las capas de la fase orgánica de acuerdo

al diámetro del halo de inhibición, las fracciones FM002 y FM003 no tuvieron bioactividad frente a MRSA, 11 fracciones o capas se recuperaron en todos los ensayos. Cada una de las fracciones se probó frente MRSA a través de la técnica de Kirby Bauer (Tabla 5).

3.4 *Látex puro versus fracción FM003:*

De las fracciones obtenidas en el experimento anterior se observó que la fracción FM003 tuvo mayor solubilidad que el resto de fracciones y presentó actividad antimicrobiana frente a MRSA, por esta razón se usó esta fracción en posteriores experimentos.

Con el fin de observar si a medida que vamos purificando se comprometía la actividad antimicrobiana de la fracción FM003 de látex de *J. curcas* frente a MRSA, se realizó un ensayo que comparó los halos de inhibición de la fracción FM003 versus el látex puro, al comparar los halos de inhibición se observó que no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos ($P > 0.05$) (tabla 6).

3.5 *Actividad antimicrobiana de la fracción FM003 en bacterias Gram negativas:*

En experimentos previos del presente estudio, el látex puro demostró que no tiene actividad frente a bacterias Gram negativas y era efectivo contra Gram positivas (tabla 1 y 2), con el propósito de demostrar si la fracción FM003 mantenía esta misma especificidad antimicrobiana frente a Gram negativas, se realizó un ensayo con la técnica de Kirby Bauer usando concentraciones de 0.75mg/ disco y 1.5 mg/disco. Los datos demuestran que no existió acción antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* ATCC, *Pseudomona aeruginosa* ATCC, *Citrobacter youngae*, *Serratia marcescens*,

Salmonella sp., *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* y *Pseudomonas fluorescens*, estos se contrasta con la inhibición que observa con el control imipenem (tabla 7).

3.6 **Ensayo de toxicidad en *Artemia salina*:**

Con el propósito de determinar el efecto tóxico de la fracción FM003, se usó el ensayo convencional con *Artemias salinas*. Para determinar la toxicidad se contó el número de *Artemias* motiles (vivas) y no motiles (muertas) a las 24 y 72 horas. Los resultados demuestran que a las 24 horas todas las *Artemias* estuvieron vivas independientemente de la concentración de la fracción FM003. Luego de 72 horas de tratamiento se observó que en el control negativo, el porcentaje de mortalidad fue del 40 %, estos resultados fueron comparables con el porcentaje de mortalidad con dosis crecientes de la fracción FM003 (tabla 8 y Gráfico 1). Para determinar si las concentraciones de la fracción FM003 que se usaron en el modelo de *Artemias salinas*, eran igual de eficientes para matar o bloquear el desarrollo de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, se realizó un ensayo de concentración mínima inhibitoria, como se explica en la sección de materiales y métodos, este ensayo falló debido a que la fracción FM003 reaccionó con el medio minimal M9, formando precipitados que interrumpen la lectura al momento leer en un espectrofotómetro, las absorbancias no tuvieron un patrón que permitiera evidenciar inhibición en el desarrollo de MRSA (figura 2). Cuando se hizo un pase del caldo M9 que contenía MRSA y la fracción FM003 a un medio de agar nutritivo, hubo desarrollo de MRSA.

Se realizó un ensayo adicional usando la técnica de Kirby Bauer, con discos que contenían iguales concentraciones de la fracción FM003 usadas en el modelo de *Artemias salinas*, los resultados demostraron claras zonas inhibición (tabla 9).

3.7 *Espectrometría de masas.*

El fraccionamiento que dio lugar a la obtención de la fracción FM003 no permite una discriminación muy fina de los posibles compuestos bioactivos, para determinar la composición de la fracción FM003, se realizó un ensayo de espectrometría de masas con un sistema UPLC, se analizó el pico que se retuvo en el minuto 13.4, cuando se realizó el análisis en el software (Database, 2006), los resultados evidenciaron un alcaloide denominado Amodiaquine. Los ensayos fitoquímicos cualitativos realizados en este estudio, evidenció la presencia de taninos catéquicos y alcaloides y fue negativo para heterósidos cianogénicos, heterosidos saponínicos y taninos gálicos.

4 DISCUSIÓN

Durante esta investigación se analizó el efecto antimicrobiano del látex de *Jatropha curcas* frente a bacterias Gram negativas y positivas, los resultados demostraron que existe un efecto antimicrobiano selectivo importante frente al género de *Staphylococcus* spp., la investigación se centró principalmente en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA), patógeno que se ha convertido en un verdadero problema de salud pública (Boucher, 2008). El látex de *Jatropha curcas* no tuvo ningún efecto antimicrobiano contra bacterias Gram negativas.

Durante ensayos físico-químicos se evidenció que la temperatura y pH no afectan los compuestos bioactivos del látex contra MRSA, el fraccionamiento del látex a través de un equipo Soxhlet evidencio que los compuestos bioactivos tienen afinidad por solventes polares (cetona, metanol y etanol), fraccionamientos adicionales a través de embudos de separación, usando mezclas de solventes, permitió obtener la fracción FM003 (fracción metanólica capa 3) la misma que conservó la actividad antimicrobiana presente en el látex.

Los ensayos de toxicidad, en un modelo básico con *Artemias salinas*, indicaron que a las 24 horas todas las *Artemias* estuvieron vivas y que a las 72 horas comenzó un descenso en el número de *Artemias* vivas, al comparar estos datos con el control, el porcentaje de mortalidad fue similar al control (tabla 8 y figura 1). Cuando se realizó el ensayo de concentración mínima inhibitoria, con iguales concentraciones probadas en el ensayo con *Artemias salinas*, los resultados evidenciaron que no existe un efecto antimicrobiano frente a MRSA, (figura 2) contrastando con los resultados obtenidos con la técnica de Kirby Bauer (tabla 9).

Existe la posibilidad que los compuestos bioactivos que están en la fracción FM003 no se estén liberando de una forma homogénea hacia los medios líquidos (agua marina en el caso de *Artemias salinas* y medio M9 el caso de MRSA), por lo tanto el propósito de estos experimentos fallaron.

Al analizar los resultados que se obtuvieron con la técnica de espectrometría de masas de la fracción FM003 y al correlacionarlos con un software, se determinó que el posible compuesto que se retuvo al minuto 13,4 se trata de un alcaloide denominado Amodiaquina, esta molécula en la actualidad está asociada a efectos antimaláricos, Amodiaquina se creó teniendo como base química a la quinina, este compuesto es un alcaloide propio de la planta llamada *Chinchona*, se ha evidenciado que la quinina tiene efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi* con una concentración mínima inhibitoria de 125g/ml (Kharal, 2009), este ensayo solo se realizó una vez y se realizaron bajo las condiciones establecidas del equipo de Agrocalidad, es necesario que se realice pruebas con las indicaciones específicas para identificación de alcaloides. La molécula encontradas en el ensayo de espectrometría de masas se correlaciona con las pruebas fitoquímicas realizadas con el látex en donde se evidenció la presencia de alcaloides y taninos catéquicos y fue negativo para heterósidos cianogénicos, heterosidos saponínicos y taninos gálicos.

Existe algunos estudios que demuestran que el látex de *J. curcas* tiene actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans* (Debnath M, 2008).

Hay evidencia que las fracciones metanólicas y fracciones con agua caliente obtenidas a partir de semillas procesadas de la planta *Jatropha curcas* tienen actividad frente bacterias Gram positivas y negativas, los ensayos se realizaron a través de una técnica con difusión por disco y se usaron concentraciones de 1 y 1.5 mg/disco, el mayor halo de inhibición que se obtuvo en esta investigación fue de 11mm (Oskoueian E, 2011).

Otros estudios demuestran que las semillas de *Jatropha curcas* contienen esteroides de forbol, que tienen actividad frente a *Pseudomonas putida* y *Streptococcus pyogenes* con zonas de inhibición de 18 y 19 mm respectivamente, zonas de moderada inhibición frente *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 16, 15 y 14mm respectivamente, pruebas adicionales con ésteres de forbol evidenciaron una alta toxicidad en un modelo con *Artemias salinas* (Devappa, 2012).

Nuestro estudio con el látex crudo y la fracción FM003 de *J. curcas* no presentó actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram negativas, la principal diferencia entre estos géneros es que las bacterias Gram positivas carecen de membrana externa y posee una gruesa capa de peptidoglicano a diferencia de las Gram negativas que contienen una delgada capa de peptidoglicano y contiene una membrana externa estudios recientes se enfocan en los componentes de la pared celular como los glicopolímeros que son propios de cada género bacteriano, como posibles blancos para la creación de nuevos antimicrobianos (Weidenmaier, 2008).

A través de PCR se determinó que la cepa de MRSA que sirvió para todos los ensayos de este estudio era portador del gen *mec A* y además no contenía el gen *pvl* el cual está asociado a MRSA de la comunidad (ANEXO 2), la cepa además tenía resistencia a 24 antibióticos y fue

susceptible solo a linezolid, vancomicina y nitrofurantoina, cepas multiresistentes como la que se usó en este estudio, son los blancos idóneos para crear nuevos antimicrobianos.

Dentro de las pruebas fitoquímicas se detectó taninos catéquicos, estas sustancias son compuestos fenólicos poliméricos propios de las plantas (Murphy, 1999), se ha reportado que los taninos tienen actividad bacteriostática y bactericida frente *Staphylococcus aureus* (Akiyama, 2001).

5 CONCLUSIONES

Las fracciones cetónica, metanólica y etanólica del látex de *Jatropha curcas* presentaron una actividad antimicrobiana selectiva importante frente al género de *Staphylococcus* spp., la investigación se centró principalmente a la especie de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, los ensayos de citotoxicidad en un modelo con *Artemia salina* y la concentración mínima inhibitoria no funcionaron debido a que la fracción FM003 precipita con los medios líquidos y la técnica con discos no permite la liberación de los compuestos bioactivos hacia los medios líquidos, efecto que no ocurrió cuando se midió la actividad antimicrobiana (medios sólidos) a través de la técnica de Kirby Bauer. Los ensayos con espectrometría de masas demostraron que la fracción FM003 presenta una estructura denominada Amodiaquina, es necesario repetir este ensayo con todas las condiciones requeridas para la identificación de moléculas específicas. La selectiva antimicrobiana y la robustez de los compuestos bioactivos del látex de *J. curcas* deben ser tomadas en cuenta para considerar a *Jatropha curcas* como un posible candidato para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas frente MRSA.

6 RECOMENDACIONES

Al momento de fraccionar el látex puro se debe trabajar usando mezclas de solventes polares y no polares, dentro de un equipo Soxhlet.

Se debe realizar un ensayo de cromatografía preparativa en columna, para trabajar con fracciones más puras.

Se debe realizar nuevos ensayos de espectrometría de masas, para confirmar la presencia de Amodiaquina.

Buscar moléculas bioactivas que no precipiten con líquidos, para realizar los ensayos de concentración mínima inhibitoria y ensayos de citotoxicidad.

Realizar ensayos de dosis letal 50.

7 Bibliografía

- (IWG-SCC), I. W. (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements. *53*(12).
- Immunochromatographic Strip for Simple Detection of Penicillin-Binding Protein 2. (2011). *18*(2).
- Akiyama, H. F. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 487-491.
- Benoit, S. E. (2008). Community Strains of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* as Potential Cause of Healthcare-associated Infections, Uruguay, 2002–2004. *14*(8).
- Boucher, H. a. (2008). Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *46*.
- Briemann, C. L. (2006). Natural Products from Plants. United States of America.: Second Edition.
- Brooks G., C. K. (2011). *Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica*. México: McGraw Hill interamericana editors.
- C., R. K. (2005). *2005 Sherris MICROBIOLOGÍA MÉDICA, Quinta edición*, . McGraw Hill interamericana editors.
- Carballo, J. H. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *2*(17).
- Cardenas, P. A. (2008). *Staphylococcus aureus outbreak analysis in the Intensive Care Unit of the Social Security Hospital in Ecuador*. Ecuador.
- Cavaliere, S. H. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En M. Coyle (Ed.). Departments of Laboratory Medicine and Microbiology University of Washington. OPS/ASM.
- Chambers H. (2001). The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *7*(2).
- Chambers H, D. F. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *7*(629-641).
- Chen L, M. J. (2010). Identification of a Novel Transposon (Tn6072) and a Truncated Staphylococcal Cassette Chromosome mec Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* ST239. *54*(8).
- Clardy J, F. M. (2009). The natural history of antibiotics. *9*(19(11)).
- Clinical, L. S. (2011). Permormace Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *Manual*, *21*(1). Tenth Edition.

- Colegate, S. M. (2008). *Bioactive natural product: Detection, Isolation and Structural Determination*. Taylor and Francis Group.
- Conly, J. J. (2002). VISA, hetero-VISA and VRSA: The end of the vancomycin era? *13*(5).
- Cseke, L. K. (2006). *Natural Products from Plants*. United States of America.: Second Editio.
- Cuirolo A, P. K. (2009). Development of homogeneous expression of resistance in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains is functionally associated with a b-lactam-mediated SOS response. *64*.
- Database, H. Q. (2006). *Mass bank Project*. Recuperado el 15 de enero de 2013, de <http://www.massbank.jp/en/about.html>
- Debnath M, a. B. (2008). *Jatropha Curcas L., A Multipurpose Stress Resistant Plant with a Potential for Ethnomedicine and Renewable Energy*. *9*.
- Devappa, R. R. (2012). Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *57-62*.
- F, C. H. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *7*(629-641).
- Guzmán M, M. C. (2009). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *34*.
- H, C. (2001). The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *7*(2).
- Ikeda S, H. H.-D. (2010). Identification of the active component that induces vancomycin resistance in MRSA. *63*.
- Katayama Y, I. T. (2000). New Class of Genetic Element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome mec, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *46*(5).
- Kharal, S. H. (2009). Quinine is bactericidal. *J Pak Med Assoc*, *59* (4).
- Koehn, F., & Carter, G. (Mar de 2005). The evolving role of natural products in drug discovery, Mar:4(3):206-20. *Nat Rev Drug Discov*, *4*(3), 206-20.
- L., C. J. (2002). VISA, hetero-VISA and VRSA: The end of the vancomycin era? *13*(5).
- Labandeira, M. C. (2007). *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *315*(1130).
- Matsui H, H. H. (2011). Immunochromatographic Strip for Simple Detection of Penicillin-Binding Protein 2. *18*(2).
- Murphy, M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 564-582.

- Murray, P. B. (1999). *Manual of Clinical Microbiology*. Washintong DC.: American Society for Microbiology.
- Murray, P. R. (2006). *Microbiología Médica*. España: Elsevier.
- Oskoueian E, A. N. (2011). Bioactive Compounds and Biological Activities of *Jatropha curcas* L. Kernel Meal Extract. *12*.
- P., P. B. (2009). VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *53*(11).
- Patil S, B. H. (2012). *Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Latex from Few Euphorbian Plants and Their Antimicrobial Potential*, *167*(4). *Appl Biochem Biotechno I*.
- Payne, D. (2008). Desperately Seeking New Antibiotics. *Science*, *321*, 1644.
- Perez, F. S. (2008). Current and novel antibiotics against resistant Gram-positive bacteria. *Infection and Drug Resistance*, *1*, 27-44.
- Perichon, B. a. (2009). VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *53*(11).
- Reyes J, R. S. (s.f.). Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), USA300 Sequence Type 8 Lineage in.
- Reyes, J. R. (2009). Dissemination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), USA300 Sequence Type 8 Lineage in Latin America. *15*(49 (12)).
- Rodriguez E, a. S. (2010). The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. *14*(2).
- Ryan K, a. R. (2005). *Sherris MICROBIOLOGÍA MÉDICA, Quinta edición*. McGraw Hill interamericana editors.
- Smith. (2010). Proteínas. *11*(13).
- Spellberg B, G. R. (2008). The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin infect Dis.*, *15*(46), 155-64.
- Srinivasan A, S. S. (2009). Short Communication: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Children and Young Adults Infected with HIV. *25*(12).
- Srinivasan, A. S. (2009). Short communication: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children and young adults infected with HIV. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1219-1224.
- Thomas R, S. N. (2008). Therapeutic Biology of *Jatropha curcas*: A Mini Review. . *9*.
- UCM. (s.f.). *universidad complutense de madrid*. Recuperado el 27 de 11 de 2012, de Ensayos fitoquimicos: <http://www.ucm.es/info/ucmp/cont/descargas/documento21900>

Weidenmaier, C. P. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiolog*, 276-287.

Tabla 1 Zonas de inhibición expresada en milímetros (mm) de distintos bacilos Gram negativos frente al látex puro de *Jatropha curcas*.

Bacterias	Control positivo Imipenem	Control negativo Sol. Salina	látex 50 µl/disco	látex 100 µl/disco
<i>Providencia sp.</i>	23	0	15±0.7	16±0.7
<i>Klebsiella sp.</i>	27	0	0	0
<i>Shigella sp.</i>	22	0	13±1.4	15±1.4
<i>Escherichia coli</i>	28	0	0	0
<i>Serratia sp.</i>	27	0	0	0
<i>Salmonella sp.</i>	30	0	0	0

± Desviación estándar, cada ensayo se hizo por duplicado.

Tabla 2 Zonas de inhibición expresada en milímetros (mm) de distintas especies de *Staphylococcus* frente al látex puro de *Jatropha curcas*.

<i>Staphylococcus spp.</i>	Control positivo vancomicina	oxacilina	látex 50 µl/disco	látex 100 µl/disco
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	18	28±0.7	28±0.7
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20	19	28±0.7 [¥]	32±1.4 [¥]
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	22	0	26±0.7 [¥]	35±1.4 [¥]
<i>S. aureus</i> metilino resistente (MRSA)	21	0	26±0.7 [¥]	32±1.4 [¥]

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se hizo por duplicado. [¥] ($P > 0.05$)

Tabla 3 Zona de inhibición expresa en milímetros (mm) de alícuotas del látex de *J. curcas* sometidas a distintas temperaturas y pH frente a MRSA.

Temperatura	Tiempo de tratamiento	látex (100 µl/disco)
30°C	30minutos	26
45°C	30minutos	20
75°C	30minutos	32
90°C	30minutos	31
100°C	30minutos	32
121oC	15 minutos	33
Control positivo		
pH	vancomicina	látex 100 µl/disco
3.5	20	30
6.5	26	38
7	25	33

Tabla 4 Zona de inhibición expresada en milímetros (mm) de las diferentes fracciones del látex de *Jatropha curcas*, obtenidas a través de un separador Soxhlet frente a MRSA.

Solvente	Control positivo linezolid 30µg/disco (mm)	látex fraccionado 5mg/disco (mm)
Hexano	19	0
Tolueno	19	0
Cloroformo	19	0
Cetona	19	19±0.7
Etanol	19	21±0.7
Metanol	19	23±0.7

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se hizo por duplicado.

Tabla 5 Efecto antimicrobiano de las fracciones obtenidas mediante Soxhlet y posteriormente tratadas en embudo de separación frente a MRSA.

Fracción 2.5mg/disco	Zona de inhibición expresada en (mm)
FC001	20±0
FC002	18±0
FC003	18±0
FC004	15±0
FM001	15±0.7
FM002	15±0.7
FM003	17±0.7
FM004	17±0.7
FE001	16±2.1
FE002	0
FE003	0

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se hizo por duplicado.

Tabla 6 Comparación de zonas de inhibición expresadas en milímetros (mm) entre la fracción FM003 y el látex de *Jatropha curcas* frente a MRSA.

Concentración (mg/disco)	Control positivo linezolid 30µg/disco	Fracción FM003	látex puro
1	32	17±1.1 [€]	18±1 [€]
1.5	32	20±1.5 [€]	20±1 [€]
2.5	32	21±1.7 [€]	22±2.6 [€]
3	32	18±2.0 [€]	22±2.6 [€]
3.5	32	20±3	22±2.8

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se realizó por triplicado, [€] ($P > 0.05$)

Tabla 7 Zonas de inhibición expresada en milímetros (mm), de la fracción FM003 de *Jatropha curcas* frente a bacterias Gram negativas.

Bacilos Gram negativos	FM003 0.75mg/disco (mm)	FM003 1.5 mg/disco (mm)	Control positivo Imipenem 10µg/disco (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC	0	0	29
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC	0	0	23
<i>Citrobacter youngae</i>	0	0	22
<i>Serratia marcencenses</i>	0	0	23
<i>Salmonella</i> sp.	0	0	29
<i>Shigella soneii</i>	0	0	28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	32
<i>Morganella morganii</i>	11±0.5	13±0.5	20
<i>Pseudomona flurecens</i>	0	0	24

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 8 Efecto citotóxico de la fracción FM003 del látex de *J. curcas* frente a *Artemias salinas* a las 72 horas de tratamiento.

Tratamiento mg/ml	<i>Artemias</i> muertas	<i>Artemias</i> vivas	N° total de <i>Artemias</i>	% Mortalidad	% de sobrevivientes
Control positivo (hipoclorito 1%)	30±0	0±0	30	100	0
Control negativo (Agua marina)	12±1	18±1	30	40	60
1	2±1	28±1.1	30	6.7	93.3
1.5	18±3.6	12±3.6	30	60	40
2.0	13±2.0	17±2.0	30	43	57
2.5	14±4.0	16±3.2	30	46.7	53.3
3.0	20±0.5	10±0.5	30	67	33
3.5	18±1.5	12±1.5	30	60	40

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 9 Zona de inhibición expresada en milímetros (mm) de la fracción FM003 frente a MRSA usando iguales concentraciones que el ensayo de toxicidad frente *Artemias salinas*.

Concentración mg/disco	Control positivo Linezolid 30µg/disco	Fracción FM003
0.5	32	16±0
1	35	21±1.4
1.5	33	26±0.7
2	34	30±0,7
2.5	32	28±2.1
3	33	30±0
3.5	35	34±0.7

± Desviación estándar de la media, cada ensayo se realizó por duplicado

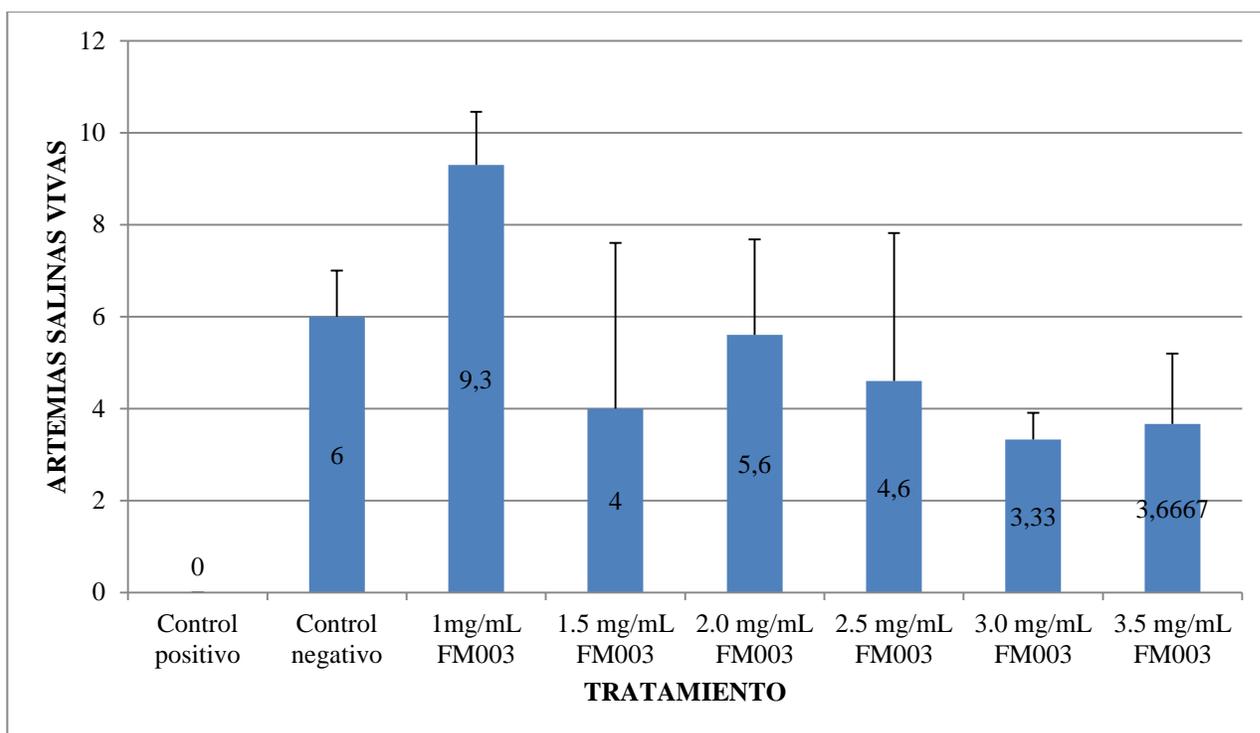


Gráfico 1 Efecto citotóxico de la fracción FM003 del látex de *Jatropha curcas* frente a *Artemias salinas*, a las 72 horas de tratamiento.

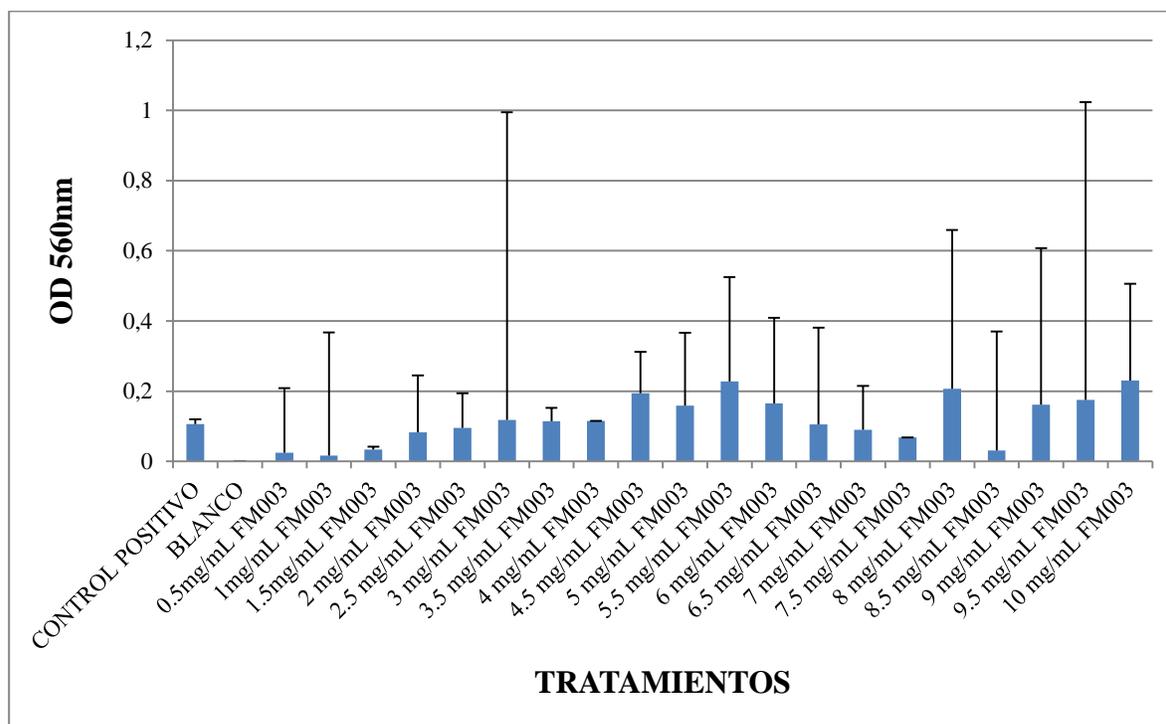


Gráfico 2 Concentración mínima inhibitoria de la fracción FM003 frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA).

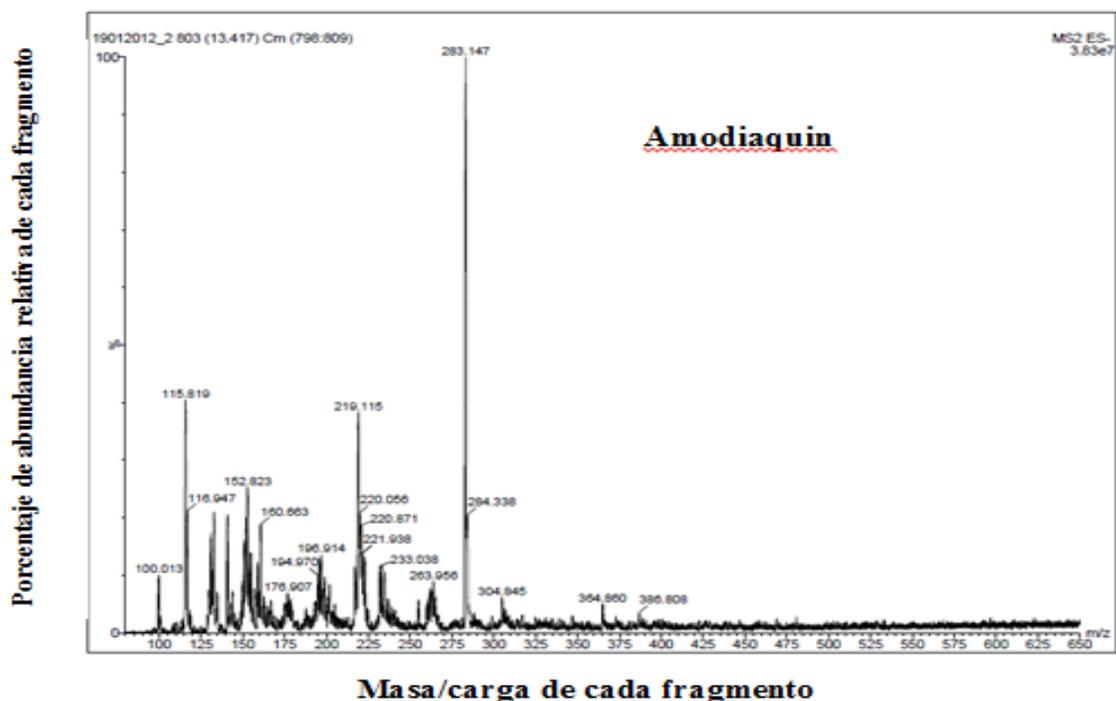
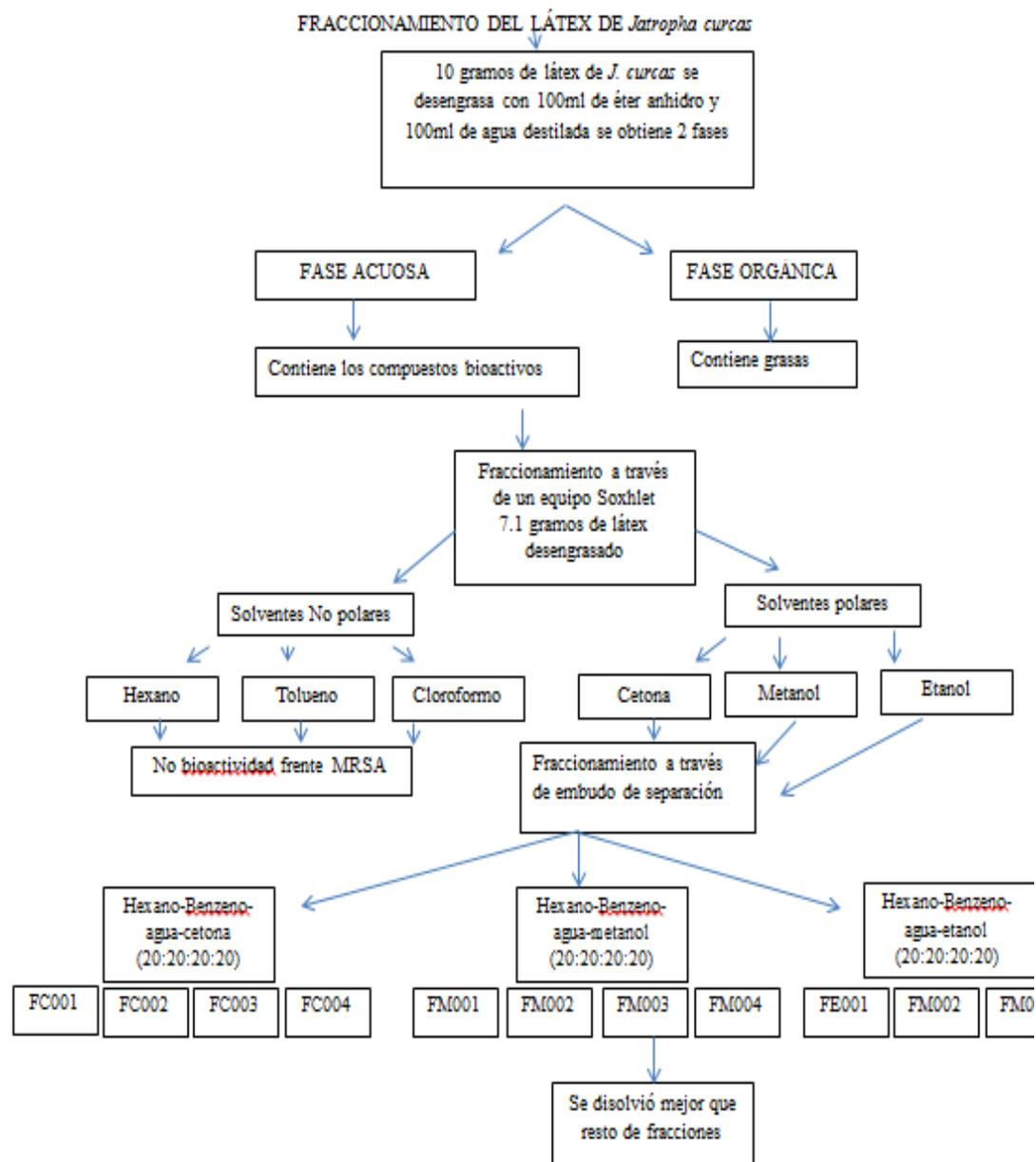


Gráfico 3 Resultado del análisis con Espectrometría de masas de la fracción FM003 del látex de *Jatropha curcas*. En el eje de las X, los números representan la carga y masa de cada uno de los fragmentos del compuesto, el pico más alto (283, 147) representa el ión molécula, el eje de las Y representa el porcentaje de abundancia relativa de cada uno de los fragmentos de la molécula. Por lo tanto de acuerdo al tiempo de retención 13.4 minutos, al ión molécula con una masa/carga del pico 283 y al pico fragmento de molécula con una masa/carga de 219.115 el Mass bank Project identificó un flavonoide denominado Amodiaquin.

8 ANEXOS

9 ANEXO1



9.1 ANEXO 2

MUESTRA ENVIADA: COLONIA
Resultado: **NEGATIVO PARA EL GEN DE LA TOXINA PVL**
Metodología: M-PCR

Se adjunta fotografía de amplificación, donde:

Carril 1: Marcador de Peso Molecular (100-1000pb.)
Carril 2: USFQ CEPA 1 (P6373 cod. Z&Z)
Carril 3: USFQ CEPA 2 (P6637 cod. Z&Z)
Carril 4: Control Positivo
Carril 5: Control Negativo

Gen PVL (1410 pb.)(gen de toxigenicidad) →
Gen mecA (530 pb.)(gen de resistencia) →
Gen nuc (210 pb.) (especifico para *Staphylococcus aureus*) →

