



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA
ESPECIALIDAD: INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
CURSO 2018-19

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Aislamiento bioguiado de compuestos con
actividad antibacteriana frente a especies
multirresistentes a partir de organismos
marinos**

María Lourdes Novoa Olmedo

24 de junio de 2019

Directores: Dra. Margarita Poza Dominguez y Dr. Alejandro Beceiro
Casas

ÍNDICE

1. RESUMEN ESTRUCTURADO	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Procedencia y obtención de los extractos crudos evaluados	8
4.2 Selección de los extractos activos	9
4.3 Obtención de las fracciones: partición líquido-líquido de los extractos crudos	10
4.4 Obtención de las sub-fracciones: separación cromatográfica de las fracciones activas	10
4.4.1 Separación cromatográfica en fase reversa con cartuchos C-18	10
4.4.2 Separación cromatográfica por HPLC	12
4.5 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	13
4.6 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos, fracciones, sub-fracciones y compuestos	14
4.6.1 Método de la dilución en caldo: determinación de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento	15
4.6.1.1 Preparación de la solución madre del analito	15
4.6.1.2 Preparación de la dilución del analito	16
4.6.1.3 Preparación de placas de dilución	16
4.6.1.4 Preparación del inóculo	17
4.6.1.5 Inoculación	17
4.6.1.6 Incubación	17
4.6.1.7 Interpretación y registro de los resultados	18
4.6.2 Ensayo de Kirby-Bauer (halos de inhibición del crecimiento)	18
5. RESULTADOS	19
5.1 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos	19
5.2 Obtención de las fracciones de los extractos activos	26
5.3 Obtención de las sub-fracciones de los extractos activos	31
5.4 Obtención de los compuestos puros responsables de la actividad antibacteriana	34
6. DISCUSIONES	37
6.1 Selección de los extractos activos	37

6.2 Obtención de las fracciones: partición líquido-líquido de los extractos crudos	37
6.3 Obtención de las sub-fracciones: separación cromatográfica de las fracciones activas	38
6.3.1 Separación cromatográfica en fase reversa con cartuchos C-18	38
6.3.2 Separación por HPLC	39
6.4 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos, fracciones, sub-fracciones y compuestos	40
6.4.1 Método de la dilución en caldo: determinación de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento	40
6.4.1.1 Extracto CZE56	40
6.4.1.2 Extracto E25-1	41
6.4.1.3 Extracto EY18-4	42
6.4.1.4 Extracto EY18-12	43
6.5.2 Ensayo de Kirby-Bauer (halos de inhibición del crecimiento)	44
7. CONCLUSIONES	45
8. AGRADECIMIENTOS	45
9. BIBLIOGRAFÍA REFERENCIADA	46

1. RESUMEN ESTRUCTURADO

Castellano:

En el presente trabajo se estudió la posible actividad de 65 extractos de organismos marinos en la inhibición del crecimiento bacteriano de cuatro especies de interés clínico: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, empleando una cepa de referencia y un aislado clínico en cada caso, mediante ensayos con microdilución en caldo. Diez de los extractos evaluados presentaron actividad, por lo que se realizó su consecuente purificación por medio de partición líquido-líquido y técnicas cromatográficas, encontrándose que la actividad inicial se mantuvo hasta en las fracciones más puras con valores de CMI en torno a: 16 µg/mL frente a *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* PAO1; 8 µg/mL frente a *K. pneumoniae* ST15 y *P. aeruginosa* ATCC 27823; 4 µg/mL frente a *A. baumannii* ATCC 17978; 2 µg/mL frente a *A. baumannii* ABRIM; 1 µg/mL frente a *S. aureus* USA 300 LAC y 0,5 µg/mL frente a *S. aureus* ATCC 29213.

English:

In this work we studied the potential activity of 65 extracts of marine organisms in the inhibition of the bacterial growth of four species with clinical interest: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, against a reference strain and a clinical isolate in each case, using broth microdilution assays. Ten of the evaluated extracts showed activity, which undergone the consequent purification by liquid-liquid partition and chromatography, showing that even in the purest fractions the initial activity was maintained with MIC values around: 16 µg/mL against *K. pneumoniae* ATCC 700603 and *P. aeruginosa* PAO1; 8 µg/mL against *K. pneumoniae* ST15 and *P. aeruginosa* ATCC 27823; 4 µg/mL against *A. baumannii* ATCC 17978; 2 µg/mL against *A. baumannii* ABRIM; 1 µg/mL against *S. aureus* USA 300 LAC and 0.5 µg/mL against *S. aureus* ATCC 29213.

Galego:

No presente traballo estudouse a posible actividade de 65 extractos de organismos mariños na inhibición do crecemento bacteriano de catro especies de interese clínico: *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, contra unha cepa de referencia e un illado clínico en cada caso, usando ensaios de microdilución en caldo. Dez dos extractos avaliados mostraron actividade, por o que a súa purificación se realizou por medio de partición líquido-líquido e técnicas cromatográficas, atopando que a actividade inicial se mantén ata nas fraccións máis puras con valores de CMI de: 16 µg/mL fronte a *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* PAO1; 8 µg/mL fronte a *K. pneumoniae* ST15 e *P. aeruginosa* ATCC 27823; 4 µg/mL fronte a *A. baumannii* ATCC 17978; 2 µg/mL fronte a *A. baumannii* ABRIM; 1 µg/ml fronte a *S. aureus* USA 300 LAC e 0,5 µg/mL fronte a *S. aureus* ATCC 29213.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la resistencia microbiana a los antibióticos representa un problema mundial de salud pública que involucra a diferentes tipos de antibióticos y a un amplio espectro de microorganismos, incluidas las bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR, del inglés *multi-drug resistant*) (1). A pesar del esfuerzo continuado por encontrar nuevos fármacos activos frente a los patógenos resistentes, en general, estos intentos han fracasado y los antibióticos existentes se están haciendo cada vez menos eficaces (2).

Los microorganismos MDR, responsables de numerosos brotes de epidemias infecciosas, constituyen una amenaza importante para la salud mundial (3). Estos patógenos preocupan especialmente a los equipos médicos porque son responsables de la mayoría de las infecciones hospitalarias y a menudo “escapan” de los efectos de los antimicrobianos tradicionales a través de una resistencia de amplio espectro. Conformado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*,

Acinetobacter baumannii, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter*, y conocido por el acrónimo ESKAPE, este conjunto fue catalogado en 2009 como el grupo de patógenos más desafiante enfrentado por los clínicos, según la *Infectious Disease Society of America* (4).

Un ejemplo alarmante de la magnitud de este problema es que la mayoría de los organismos comúnmente aislados de la piel de pacientes quemados que están en unidades de cuidados intensivos en los hospitales forman parte de este grupo (5).

Otro ejemplo es que *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* son los patógenos más frecuentemente aislados en adultos con neumonía adquirida en el hospital (HAP, del inglés *hospital-acquired pneumonia*) y con neumonía asociada al respirador mecánico (VAP, del inglés *ventilator-associated pneumonia*) en 10 países asiáticos, según un estudio prospectivo multicéntrico (6).

Si bien la definición exacta de lo que constituye un organismo MDR puede variar, con frecuencia se usa para indicar resistencia a tres o más clases de antibióticos (7). Las bacterias resistentes a todas las clases de antibióticos, excepto a una o dos, en general, se las denomina bacterias “ampliamente resistentes a los medicamentos” (XDR, del inglés *extensive drug resistance*) para resaltar las limitadas opciones de tratamiento disponibles para los pacientes infectados con estos organismos (8).

Entre las bacterias Gram-positivas resistentes, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) sigue siendo de las más problemáticas, aunque cada vez están surgiendo más casos de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (3). En los últimos años, la prevalencia de las infecciones por bacterias Gram-positivas está haciéndose cada vez mayor, siendo responsables de aproximadamente el 57% de los casos de sepsis (9), así como una causa común de infecciones nosocomiales (10) y estando asociadas a una alta tasa de mortalidad (11).

En cuanto a las bacterias Gram-negativas altamente resistentes, destacan *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* MDR y

Acinetobacter baumannii productora de carbapenemasas. Estas bacterias, a menudo, son susceptibles únicamente a los agentes antimicrobianos más antiguos, como las polimixinas, que presentan un mayor número de efectos adversos (3).

Debido a esto, existe una necesidad urgente de encontrar antibióticos y combinaciones de medicamentos para combatir a estas bacterias MDR emergentes y superar este problema (12).

En este sentido, las compañías farmacéuticas han dado un golpe de timón en su enfoque habitual en torno a la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, volcando nuevamente el interés de su investigación en el campo de los productos naturales. Un número creciente de evidencia científica sugiere que algunas formulaciones de la medicina tradicional, productos naturales purificados y extractos de especies marinas y fúngicas, serían activos frente a bacterias MDR específicas y, por lo tanto, podrían investigarse más a fondo y posiblemente desarrollarse como agentes clínicos (3).

Hoy en día se sabe que la utilización de compuestos naturales bioactivos en farmacología es un procedimiento eficaz (13). De hecho, los extractos de organismos (plantas y animales) y microorganismos (bacterias, algas, hongos) son fuentes bien conocidas de compuestos provistos de interesantes propiedades biológicas y terapéuticas (14). Por ejemplo, más del 75% de los medicamentos utilizados para tratar enfermedades infecciosas se derivan de fuentes naturales (15).

Nuestros océanos, que cubren el 70% de superficie del planeta, muestran características fabulosas como laboratorios de síntesis de materiales útiles para entornos humanos, animales y sanitarios, incluyendo un gran potencial biológico y farmacológico al producir metabolitos secundarios biológicamente activos que desempeñan un papel destacado frente a las enfermedades infecciosas (16).

En particular, los organismos marinos constituyen una fuente importante de estos metabolitos secundarios estructuralmente diversos y biológicamente activos con actividades prometedoras (17). La mayoría de

estas moléculas tienen blancos terapéuticos de amplio espectro lo que justifica la búsqueda e identificación de nuevas biomoléculas eficaces para la prevención y el tratamiento de enfermedades (18).

Dentro de los organismos marinos más frecuentemente estudiados y que han dado resultados prometedores en este campo, se encuentran las esponjas marinas. Una de las funciones más importantes de las esponjas en el ecosistema marino es que funcionan como ingenieros de ecosistemas u “hoteles vivos”, proporcionando un micro hábitat a diversos organismos. Este papel ecológico de las esponjas ha ganado un interés creciente en la investigación durante las últimas décadas, con fines tanto de conservación como científicos (19).

Muestra de ello, es la gran cantidad de literatura científica reciente en el campo de la obtención de metabolitos bioactivos a partir de esponjas marinas (20), empleando el ensayo bioguiado como metodología preferente (21).

En base a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se planteó realizar un estudio bioguiado de varios extractos de tunicados y esponjas marinas con el propósito de aislar compuestos potencialmente bioactivos frente a cepas de varios patógenos bacterianos multirresistentes.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue realizar el aislamiento bioguiado de compuestos químicos activos frente a las especies bacterianas multirresistentes *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a partir de los extractos de varias especies de organismos marinos recogidos en la Península de Yucatán (México).

Este objetivo principal se puede dividir en los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar la actividad de los extractos crudos de los organismos marinos frente a las cuatro especies bacterianas mencionadas.

- Obtener fracciones químicamente más sencillas mediante la partición líquido-líquido de los extractos bioactivos empleando el método Kupchan.

- Evaluar la actividad de las fracciones obtenidas por el método Kupchan y fraccionar aquellas bioactivas empleando técnicas cromatográficas.

- Re-evaluar sucesivamente la actividad de las sub-fracciones y purificarlas hasta obtener los compuestos puros responsables de la actividad antibacteriana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Procedencia y obtención de los extractos crudos evaluados

En este trabajo se estudiaron los extractos crudos de 65 tunicados y esponjas marinas del género *Agelas* (Tabla I) recogidos en la Península de Yucatán en México.

Los extractos fueron obtenidos antes de la realización de este trabajo por los Licenciados Dawrin Jesús Pech Puch y Mar Anabel Pérez Povedano del grupo de Química Molecular y de Materiales (QUIMOLMAT) del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) realizando 3 extracciones del organismo con metanol y eliminando luego el solvente en el rotavapor a una temperatura máxima de 40°C.

Al momento de la redacción de este manuscrito, la mayor parte de estos organismos aún estaban siendo identificados taxonómicamente, por lo que sólo se dispone de esta información para los extractos CZE56 (*Agelas citrina*), E25-1 (*Agelas dilatata*) y E26-2 (*Agelas sceptrum*).

Tabla I. Listado de los extractos de los organismos marinos estudiados

Extractos				
BA-3	E11-2	E38	EY18-5	MA18-11
CZE-18	E15	E41	EY18-7	MA18-12
CZE56	E16	E42	EY18-8	MA18-13
DYN	E18-MI	E46	EY18-10	MA18-M4
E01	E20	E47	EY18-11	RIO18-1
E03	E24-2	E49	EY18-12	RIO18-T1
E2-2	E25-1	E50	MA18-1	T18-M1
E2-29	E26-2	E52	MA18-2	T18-M2
E4	E27-2	E53	MA18-5	T18-M4
E7-2	E28	EP	MA18-6	T18-M5
E7-3	E31	EY18-1	MA18-7	T18-M6
E8-2	E35	EY18-3	MA18-9	TY18-1
E9-2	E36	EY18-4	MA18-10	TY18-2

4.2 Selección de los extractos activos

Para la elección de los extractos crudos que se purificarían en la etapa de partición líquido-líquido, se hizo en un rastreo inicial para evaluar sus actividades frente a las cepas tipo de las especies estudiadas. En la sección 4.6 se explica detalladamente cómo se realizó esta evaluación.

4.3 Obtención de las fracciones: partición líquido-líquido de los extractos crudos

A los extractos que resultaron activos en el rastreo inicial se les hizo una partición líquido-líquido empleando el método de Kupchan modificado (22). Dicho método consiste en separar el extracto inicial en cinco fracciones químicamente más sencillas basándose en los coeficientes de reparto de los compuestos en los distintos sistemas bifásicos que van estableciéndose a lo largo del proceso, constituidos éstos por volúmenes iguales de dos solventes inmiscibles en todos los casos. Las fracciones que se obtienen de esta partición líquido-líquido son: fracción acuosa (WW), fracción butanólica (WB), fracción hexánica (FH), fracción diclorometánica (FD) y fracción metanólica (FM) (ver Figura 1). El volumen empleado del solvente inicial (agua) osciló entre los 100 y 200 mL por cada 50 g de extracto crudo. Los volúmenes de los demás solventes fueron empleados proporcionalmente al volumen inicial de agua usado para disolver el extracto.

La actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de todas estas fracciones fue reevaluada empleado la metodología descrita en la sección 4.6.1.

4.4 Obtención de las sub-fracciones: separación cromatográfica de las fracciones activas

4.4.1 Separación cromatográfica en fase reversa con cartuchos C-18

Las fracciones que mostraron bioactividad en los ensayos de dilución en caldo (sección 4.6.1) se sometieron al proceso de purificación por cromatografía en fase reversa, que permite separar los compuestos en base a su polaridad. Los cartuchos pre-empacados con C-18 fueron acondicionados con agua. La fracción a separar fue disuelta en agua o en una mezcla formada por agua y la mínima cantidad de metanol necesaria para lograr su disolución completa. Luego, la fracción fue sembrada en la cabeza del cartucho y eluida a presión media con volúmenes de 100 mL de

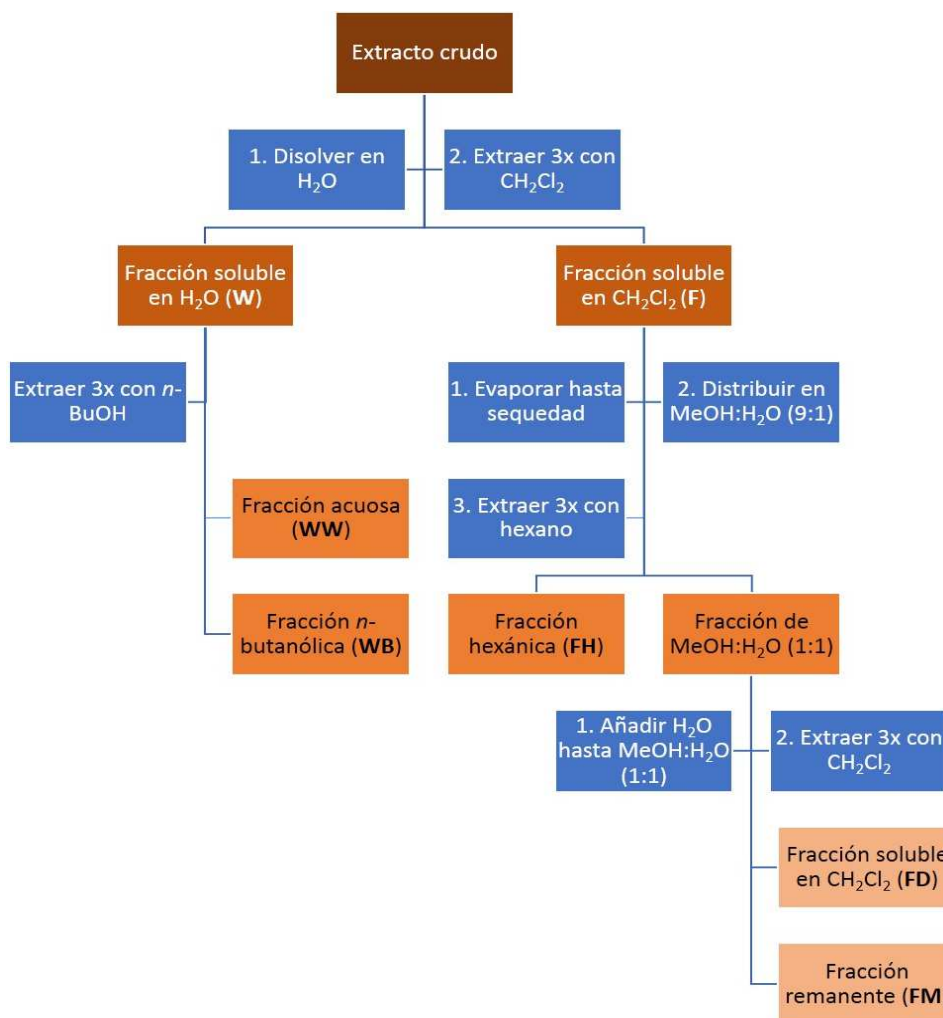


Figura 1. Esquema general de partición de los extractos crudos por el método Kupchan modificado

cada uno de los siguientes solventes, en polaridad decreciente:

- Agua
- Agua:metanol 2:1
- Agua:metanol 1:1
- Agua:metanol 1:2
- Metanol
- Metanol:diclorometano 1:1
- Diclorometano

Este protocolo permite obtener siete fracciones, tal y como se muestra a continuación en la Figura 2. Nuevamente, su actividad en la inhibición del crecimiento bacteriano fue evaluada.

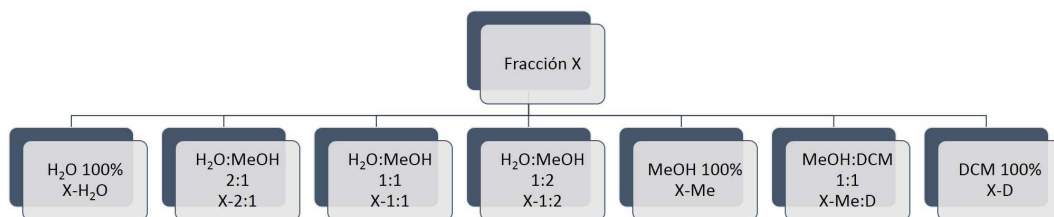


Figura 2. Esquema general de la separación cromatográfica de las fracciones bioactivas en fase reversa

4.4.2 Separación cromatográfica por HPLC

Las sub-fracciones que mostraron ser bioactivas, fueron purificadas empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución o HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*, lo que permite incrementar la versatilidad y eficiencia de la cromatografía de columna, tanto en fase normal como en fase reversa, al utilizar alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación.

Los métodos empleados difirieron ampliamente en función del tipo y complejidad de la muestra. Cuando la cromatografía se desarrolló en sistemas en fase reversa, los solventes empleados fueron agua, metanol y acetonitrilo, mientras que, cuando la fase estacionaria empleada fue normal (hidrofílica), los solventes utilizados fueron hexano, acetato de etilo y acetona.

A continuación, se muestran, a manera de ejemplo, las condiciones del método empleado para separar por HPLC una de las sub-fracciones obtenidas por cromatografía con C-18:

- Columna: Luna C-18 fase reversa, 5 μ , 100 Å, 250 \times 100 mm
- Fase móvil: H₂O y metanol
- Flujo: 2 mL/min
- Longitud de onda: 250 nm

4.5 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En este estudio se emplearon 4 cepas bacterianas de referencia y cuatro cepas clínicas aisladas de pacientes de distintos hospitales. Se encuentran listadas a continuación en la Tabla II.

Las cepas de las distintas especies se cultivaron a 37°C con agitación (180 rpm) en caldo Luria-Bertani (LB) (Difco) y se almacenaron a -80°C en caldo LB que contenía glicerol al 10%. Para los ensayos de inhibición del crecimiento, las cepas de bacterias Gram-negativas se cultivaron en placas comercialmente disponibles de medio Mueller Hinton II (Deltalab) y las de Gram-positivas en placas de medio soya triptona (TSA) con 2% de agar (Bimeteck) preparadas en el laboratorio, durante 24 h a 37°C. Las bacterias se repicaron al menos una vez antes de enfrentarlas a los extractos, fracciones o compuestos. Las placas con cultivo se almacenaron a 4°C por un máximo de 72 horas. Antes de ser descartadas, se hicieron repiques a placas nuevas con idénticas condiciones. No se emplearon bacterias repicadas en más de tres ocasiones.

Tabla II. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Nombre de la cepa	Descripción	Fuente
<i>Acinetobacter baumannii</i>		
ATCC 17978	Cepa de referencia	Microbiología, CHUAC
ABRIM	Cepa clínica	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
ATCC 700603	Cepa de referencia	Microbiología, CHUAC
ST15	Cepa clínica	

Tabla II. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Nombre de la cepa	Descripción	Fuente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
ATCC 27823	Cepa de referencia	Microbiología, CHUAC
PAO1	Cepa clínica	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
ATCC 29213	Cepa de referencia	Microbiología, CHUAC
USA 300 LAC	Cepa clínica	

4.6 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos, fracciones, sub-fracciones y compuestos

Se estudió la actividad frente a las especies más relevantes y con mayores problemas de tratamiento en la experiencia clínica, tres Gram-negativas y una Gram-positiva:

- *Acinetobacter baumannii*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

Se usaron dos cepas de cada especie: una cepa ATCC (o cepa de referencia) y una cepa clínica. Se realizaron réplicas del experimento en función de las cantidades disponibles de los extractos, fracciones y compuestos.

Se empleó dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los extractos crudos y metanol para disolver las fracciones, sub-fracciones y compuestos puros, a una concentración máxima del 5% v/v en el pocillo de mayor concentración de la placa [256, 128 o 64 µg/mL, (ver sección 4.6.1.2)]. Se realizaron controles de ambos solventes para determinar si tales

concentraciones interferían en el crecimiento bacteriano, encontrándose un crecimiento comparable al de los pocillos sin DMSO o metanol.

4.6.1 Método de la dilución en caldo: determinación de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento

Los ensayos de dilución en caldo permiten obtener resultados cuantitativos, es decir, la concentración mínima inhibitoria (CMI) y cualitativos y pueden realizarse de dos maneras:

- Dilución macro: se emplea un volumen de caldo de **1 ml** en tubos de ensayo estándar.
- Microdilución: se emplea alrededor de **0,05 a 0,1 ml** de volumen total de caldo y puede realizarse en una placa de microtitulación.

En este trabajo se hicieron ensayos por microdilución, de acuerdo con el protocolo estándar descrito por el CLSI (del inglés, *Clinical Laboratory Standard Institute*) (23). El procedimiento, tanto para macro como para microdilución, es el mismo, sólo cambia el volumen de caldo y contempla los siguientes pasos:

- Preparación de la solución madre del analito (extracto, fracción, sub-fracción o compuesto, según corresponda)
- Preparación de la dilución del analito
- Preparación de placas de dilución
- Preparación de inóculo
- Inoculación
- Incubación
- Lectura e interpretación de los resultados

4.6.1.1 Preparación de la solución madre del analito

Se preparó una solución madre del analito, o solución *stock*, a una concentración de 10.000 µg/mL o 10 veces la concentración más alta a analizar, la que sea mayor, añadiendo el volumen correspondiente de solvente (DMSO o metanol), calculado según la masa de analito recibida.

Debido a que la contaminación microbiana es extremadamente rara en presencia de tales concentraciones de compuestos químicos, las soluciones preparadas de manera aséptica, sin ser esterilizadas por filtración en membranas, se consideraron aceptables.

4.6.1.2 Preparación de la dilución del analito

Se prepararon las diluciones finales de cada analito (las de mayor concentración de la placa) en uno o dos tubos Eppendorf estériles, tomando un volumen dado de la solución *stock* y añadiéndolo al volumen correspondiente de caldo de cultivo. Además, se tomó en consideración que se necesita aproximadamente un 5% más de los 200 μL de disolución para cada uno de los pocillos de la última hilera de las placas de 96 pocillos.

Dependiendo de la cantidad de analito disponible, de su estabilidad en el tiempo una vez disuelto y del número de ensayos a realizar, se prepararon diluciones finales a concentraciones de 256, o 128, o 64 $\mu\text{g/mL}$, obteniéndose las siguientes concentraciones en las 11 últimas hileras de las placas de microtitulación: 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 y 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (o hasta 0,125 y 0,0625 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

4.6.1.3 Preparación de placas de dilución

Se sirvieron 100 μL de caldo de cultivo Mueller Hinton II (Sigma) en cada uno de los 88 pocillos de la placa, correspondientes a las hileras 1-11, empleando para ello una micropipeta multicanal (Eppendorf).

Se añadieron 200 μL de cada analito a evaluar en cada uno de los 8 pocillos de la 12^a hilera de la placa.

Empleando la micropipeta multicanal, se tomaron 100 μL de las soluciones de los 8 pocillos de la 12^a hilera y se vertieron en los 8 pocillos de la 11^a hilera, se mezclaron varias veces, haciendo subir y bajar el volumen con la micropipeta. Seguidamente, se tomaron 100 μL de los 8 pocillos de la 11^a hilera y se vertieron en los 8 pocillos de la 10^a hilera, repitiendo el proceso sucesivamente hasta llegar a la 2^a hilera, y culminándolo con el descarte de los 100 μL excedentes tomados de esos

8 pocillos, de forma de que el volumen final en cada uno de los 96 pocillos de la placa fuese 100 μL .

4.6.1.4 Preparación del inóculo

Los inóculos se prepararon haciendo una suspensión, en tubos de 5 mL de agua estéril (BD BBL), de colonias aisladas seleccionadas con una torunda (Deltalab) de una placa de agar de 18 a 24 horas de antigüedad del cultivo. Las suspensiones se ajustaron hasta lograr una turbidez equivalente a un estándar de 0,5 McFarland, lo que dio como resultado suspensiones que contenían entre 1 y 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL de cada especie bacteriana a evaluar.

Dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación de la suspensión del inóculo, ésta se diluyó en agua estéril, de modo que, después de la inoculación, cada pocillo contuviese aproximadamente 5×10^5 UFC/mL. Para ello, se diluyó la suspensión 0,5 McFarland 1:20, dando como resultado que el tubo contendría aproximadamente 5×10^6 UFC/mL. La posterior dilución 1:20 en el paso 4.6.1.5 lleva el inóculo a una concentración final de 5×10^5 UFC/mL.

4.6.1.5 Inoculación

Dentro de los 15 minutos posteriores a la estandarización del inóculo descrita anteriormente, se agregaron 5 μL de la suspensión ajustada del inóculo a cada pocillo que contenía 100 μL de la mezcla del analito con el caldo de cultivo en la serie de dilución (hileras 1-11) y en la 1ª hilera (control positivo que solo contenía caldo de cultivo), mezclando cada vez con la micropipeta y descartando las puntas para evitar el arrastre del analito evaluado de un pocillo a otro.

4.6.1.6 Incubación

Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 16 a 20 horas en una incubadora de atmósfera ambiente. Para mantener la misma temperatura de incubación para todos los cultivos, se tomó la previsión de no apilar más de cuatro placas de microdilución.

4.6.1.7 Interpretación y registro de los resultados

Para determinar los pocillos con crecimiento, se compararon los pocillos que contenían el extracto con el crecimiento en los pocillos control (sin extracto). Para que el ensayo se considerase válido, debió producirse un crecimiento aceptable (*spot* ≥ 2 mm o turbidez evidente) en el pocillo de control de crecimiento.

La concentración más baja a la que se inhibe completamente el crecimiento (que se evidencia por la ausencia de crecimiento bacteriano visible) fue registrada como la concentración mínima inhibitoria o CMI.

4.6.2 Ensayo de Kirby-Bauer (halos de inhibición del crecimiento)

Los ensayos de sensibilidad por difusión en disco se realizaron también de acuerdo al protocolo estándar descrito por el CLSI (23). Para ello se emplearon discos blancos estériles de papel de filtro de 6 mm de diámetro (BD), que se impregnaron con 10 μ L de una dilución 1:5 de la solución *stock* de los extractos, fracciones o compuestos a evaluar y se colocaron en placas de agar Mueller Hinton II que previamente habían sido inoculadas con la suspensión bacteriana de cada especie a evaluar, cuya turbidez fue ajustada a la de un estándar de 0,5 McFarland (aprox. entre 1 y 2×10^8 UFC/mL). Las placas se incubaron a 37°C y después de 18 a 24 horas, se midieron los diámetros, en milímetros, de las zonas de inhibición.

En los casos en los que fue posible, el experimento se realizó por duplicado para confirmar estos resultados. Adicionalmente, se impregnaron discos de papel con DMSO sin ninguna muestra para usarlos como control negativo, observándose que no causó inhibición alguna del crecimiento bacteriano.

5. RESULTADOS

5.1 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos

Para la determinación de la actividad de los extractos, se realizaron dos experimentos distintos: 1) la estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante cultivo en caldo y 2) la medición de los halos de inhibición del crecimiento en discos (método de Kirby-Bauer).

Mediante la determinación de las CMIs, se encontró que las cepas tipo de las cuatro especies patógenas ensayadas mostraron resistencia frente a 55 de los 65 extractos probados (CMI >128 µg/mL). Este resultado fue confirmado mediante el ensayo de Kirby-Bauer, al no encontrarse ningún halo de inhibición del crecimiento de la bacteria en torno al disco impregnado con el extracto. Estos resultados se recogen en las Tablas III y IV, respectivamente.

Tabla III. Concentración mínima inhibitoria de los extractos que no mostraron actividad dentro de la serie evaluada

	CMI (µg/mL)			
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
BA-3	N/E	>1024	>1024	>512
C2E-18	>128	>128	>128	>128
E01	>128	>128	>128	>128
E03	>128	>128	>128	>128
E4	>128	>128	>128	>128
E7-2	N/E	>1024	>1024	>512
E7-3	N/E	>1024	>1024	>512
E8-2	N/E	>1024	>1024	>512
E9-2	N/E	>1024	>1024	>512
E11-2	N/E	>1024	>1024	>512
E15	>128	>128	>128	>128
E16	>128	>128	>128	>128

N/E: no evaluado

Tabla III. Concentración mínima inhibitoria de los extractos que no mostraron actividad dentro de la serie evaluada (continuación)

	CMI (µg/mL)			
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
E20	>128	>128	>128	>128
E24-2	N/E	>1024	>1024	>512
E27-2	N/E	>1024	>1024	>512
E36	>128	>128	>128	>128
E38	>128	>128	>128	>128
E41	>128	>128	>128	>128
E42	>128	>128	>128	>128
E46	>128	>128	>128	>128
E47	>128	>128	>128	>128
E49	>128	>128	>128	>128
E52	>128	>128	>128	>128
E53	>128	>128	>128	>128
EY18-7	>128	>128	>128	>128
EY18-8	>128	>128	>128	>128
EY18-11	>128	>128	>128	>128
MA18-1	>128	>128	>128	>128
MA18-2	>128	>128	>128	>128
MA18-5	>128	>128	>128	>128
MA18-6	>128	>128	>128	>128
MA18-7	>128	>128	>128	>128
MA18-9	>128	>128	>128	>128
MA18-10	>128	>128	>128	>128
MA18-11	>128	>128	>128	>128
MA18-12	>128	>128	>128	>128
MA18-13	>128	>128	>128	>128
RIO18-1	>128/>128 >128 (ABRIM)	>128	1/>128 >128 (PAO1)	>128
RIO18-T1	>128	>128	>128	>128

N/E: no evaluado

Tabla III. Concentración mínima inhibitoria de los extractos que no mostraron actividad dentro de la serie evaluada (continuación)

	CMI (µg/mL)			
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
T18-M1	>128	>128	>128	>128
T18-M2	>128	>128	>128	>128
T18-M4	>128	>128	>128	>128
T18-M5	>128	>128	>128	>128
T18-M6	>128	>128	>128	>128
TY18-1	>128/>128 >128 (ABRIM)	>128	2/>128 >128 (PAO1)	>128
TY18-2	>128	>128	>128	>128

N/E: no evaluado

Tabla IV. Medida de los halos de inhibición en disco de los extractos que mostraron resistencia en el cultivo en caldo

	Halo de inhibición del crecimiento			
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
BA-3	N/E	N/E	N/E	N/E
C2E-18	resistente	resistente	resistente	resistente
E01	resistente	resistente	resistente	resistente
E03	resistente	resistente	resistente	resistente
E4	resistente	resistente	resistente	resistente
E7-2	N/E	N/E	N/E	N/E
E7-3	N/E	N/E	N/E	N/E
E8-2	N/E	N/E	N/E	N/E
E9-2	N/E	N/E	N/E	N/E
E11-2	N/E	N/E	N/E	N/E
E15	resistente	resistente	resistente	resistente
E16	resistente	resistente	resistente	resistente
E18-MI	resistente	resistente	resistente	resistente

N/E: no evaluado

Tabla IV. Medida de los halos de inhibición en disco de los extractos que mostraron resistencia en el cultivo en caldo (continuación)

	Halo de inhibición del crecimiento			
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
E20	resistente	resistente	resistente	Resistente
E24-2	N/E	N/E	N/E	N/E
E27-2	N/E	N/E	N/E	N/E
E28	resistente	resistente	resistente	resistente
E31	resistente	resistente	resistente	resistente
E36	resistente	resistente	resistente	resistente
E38	resistente	resistente	resistente	resistente
E41	resistente	resistente	resistente	resistente
E42	resistente	resistente	resistente	resistente
E46	resistente	resistente	resistente	resistente
E47	resistente	resistente	resistente	resistente
E49	resistente	resistente	resistente	resistente
E52	resistente	resistente	resistente	resistente
E53	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-1	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-1	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-3	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-5	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-7	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-8	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-10	resistente	resistente	resistente	resistente
EY18-11	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-1	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-2	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-5	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-6	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-7	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-9	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-10	resistente	resistente	resistente	resistente

N/E: no evaluado

Tabla IV. Medida de los halos de inhibición en disco de los extractos que mostraron resistencia en el cultivo en caldo (continuación)

	Halo de inhibición del crecimiento			
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27823	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
MA18-11	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-12	resistente	resistente	resistente	resistente
MA18-13	resistente	resistente	resistente	resistente
RIO18-1	resistente	resistente	14 mm resistente (PAO1)	resistente
RIO18-T1	resistente	resistente	resistente	resistente
T18-M1	resistente	resistente	resistente	resistente
T18-M2	resistente	resistente	resistente	resistente
T18-M4	resistente	resistente	resistente	resistente
T18-M5	resistente	resistente	resistente	resistente
T18-M6	resistente	resistente	resistente	resistente
TY18-1	resistente	resistente	12 mm 16 mm (PAO1)	resistente
TY18-2	resistente	resistente	resistente	resistente

Los extractos restantes mostraron actividad inhibiendo el crecimiento de una o varias de las cepas de las especies patógenas evaluadas (CMI ≤ 64 $\mu\text{g/mL}$). En algunos casos, este resultado fue confirmado con el ensayo de Kirby-Bauer. Los resultados se muestran en las Tablas V y VI, respectivamente.

Tabla V. Concentración mínima inhibitoria de los extractos activos de la serie evaluada

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
CZE56	8 8	8	16 8 8	4 8	16 8 8	16 16	1 0,5 0,5	<0,125
E2-2	N/E	N/E	64 256	256 512	>1024	N/E	128	256
E2-29	N/E	N/E	32 64	32 64	32 64	32 64	32	32
E25-1	N/E	N/E	64 128	128	32	128	64	128
E26-2	N/E	N/E	256 512	N/E	64	256	>512	256
E35	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16 8	16 8
E50	64	64	128	N/E	>128	N/E	32	N/E
EY18-4	4 4	2 4	16 32	16	32	64	4	8

N/E: no evaluado

Tabla V. Concentración mínima inhibitoria de los extractos activos de la serie evaluada (continuación)

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
EY18-12	16	N/E	>128	N/E	>128	N/E	16 32 32	8
MA18-M4	128 32 64	32	>128 >128	N/E	128 >64	>128 >64	64 128	128 >64

N/E: no evaluado

Tabla VI. Medida de los halos de inhibición en disco de los extractos que fueron activos en el cultivo en caldo

	Halo de inhibición del crecimiento							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
CZE56	res res	res	res	8 mm	res	N/E	16 mm	18 mm
E2-2	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
E2-29	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
E18-MI	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E
E25-1	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
E26-2	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
E28	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E

res: resistente; N/E: no evaluado

Tabla VI. Medida de los halos de inhibición en disco de los extractos que fueron activos en el cultivo en caldo (continuación)

	Halo de inhibición del crecimiento							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
E31	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E
E35	res	N/E	res	N/E	res	N/E	10 mm res res	res res
E50	res	N/E	res	N/E	res	N/E	8 mm res	8 mm
EY18-1	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E
EY18-3	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E
EY18-4	10 mm	res	res	N/E	N/E	N/E	14 mm res	N/E
EY18-5	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E
EY18-10	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E
EY18-12	8 mm	N/E	res	N/E	res	N/E	8 mm	res
MA18-M4	res	N/E	res	N/E	res	N/E	res	N/E

res: resistente; N/E: no evaluado

5.2 Obtención de las fracciones de los extractos activos

Una vez seleccionados los extractos activos, se procedió a su partición líquido-líquido para la obtención de las 5 fracciones representadas en la Figura 1.

En este trabajo, se mostrará únicamente la partición y posterior evaluación biológica de los extractos CZE56, E25-1, EY18-4 y EY18-12.

Debido a la posible actividad de los extractos RIO18-1 y TY18-1 frente a *P. aeruginosa* ATCC 27823 observada en el rastreo inicial, éstos fueron fraccionados y sus fracciones fueron evaluadas frente a las cuatro cepas tipo. Todas las cepas mostraron ser resistentes a concentraciones $\leq 128 \mu\text{g/mL}$ de cada una de las 10 fracciones (RIO18-1-WW, RIO18-1-WB,

RIO18-1-FH, RIO18-1-FD, RIO18-1-FM, TY18-1-WW, TY18-1-WB, TY18-1-FH, TY18-1-FD y TY18-1-FM), lo que confirmó que los extractos RIO18-1 y TY18-1 no eran activos y por lo que no se les realizó ninguna purificación cromatográfica posterior. Estos resultados no se incluyeron en este escrito.

En la Figura 3 se muestra la partición del extracto CZE56.

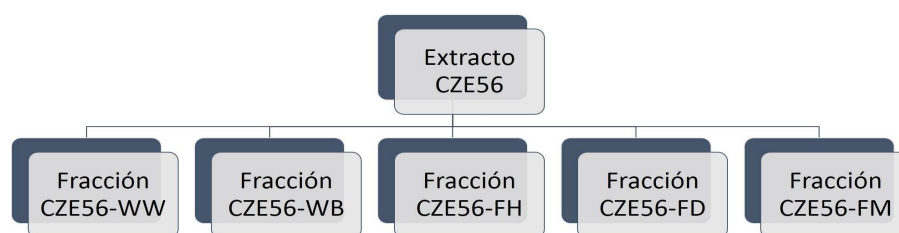


Figura 3. Partición del extracto crudo CZE56

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de las cinco fracciones y la medición de los halos de inhibición de crecimiento en disco, permitieron seleccionar las fracciones activas y descartar aquellas ante las cuales las bacterias mostraron resistencia. A continuación, se muestran las CMI de las distintas fracciones del extracto CZE56 (Tabla VII) y los resultados de los ensayos de Kirby-Bauer en discos (Tabla VIII) destacando que, aparentemente, los compuestos responsables de la actividad se concentran en las fracciones de diclorometano y metanol.

Tabla VII. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones del extracto CZE56

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
CZE56-WW	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
CZE56-WB	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
CZE56-FH	>128	>128	>128	>128	>128	>128	16 >128	>128
CZE56-FD	32	16	16	16	32	32	4	2
	16		32		32		2	
CZE56-FM	64	64	64	32	32	64	32	4
	64		64		32		4	

N/E: no evaluado

Tabla VIII. Medida de los halos de inhibición en disco de las fracciones del extracto CZE56

	Halo de inhibición de crecimiento			
	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	ATCC 17978	ATCC 700603	ATCC 27823	ATCC 29213
CZE56-WW	resistente	resistente	resistente	resistente
CZE56-WB	resistente	resistente	resistente	resistente
CZE56-FH	resistente	resistente	resistente	resistente
CZE56-FD	resistente	resistente	11 mm	13 mm
CZE56-FM	resistente	resistente	resistente	12 mm

A continuación, se muestra la partición del extracto E25-1 (Figura 4).

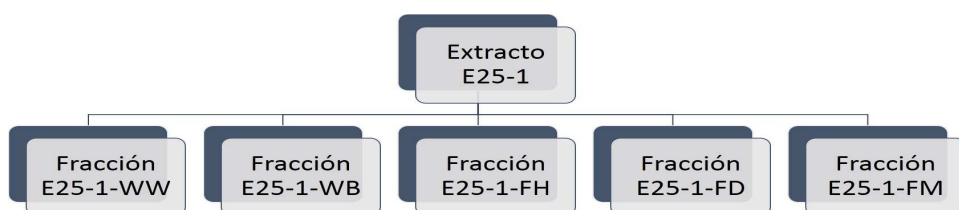


Figura 4. Partición del extracto crudo E25-1

En la Tabla IX se muestran las CMI de las fracciones obtenidas del extracto E25-1.

Tabla IX. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones del extracto E25-1

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
E25-1-WW	>512	>512	>512	>512	16	N/E	N/E	N/E
E25-1-WB	128	128	128	64	32	2	N/E	N/E
E25-1-F	>512	>512	>512	128	64	2	N/E	N/E
E25-1-FH	>512	>512	>512	>512	256	512	N/E	N/E
E25-1-FD	>512	>512	>512	>512	256	512	N/E	N/E
E25-1-FM	128	128	128	64	32	16	N/E	N/E

N/E: no evaluado

A continuación, se muestra la partición del extracto EY18-4 (Figura 5).

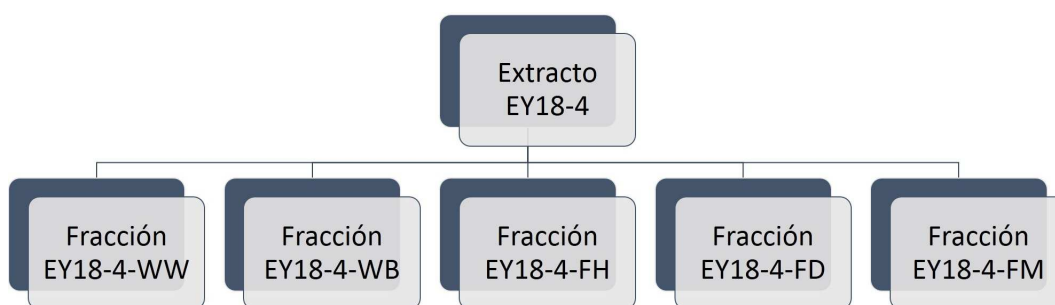


Figura 5. Partición del extracto crudo EY18-4

En la Tabla X se muestran las CMI de las fracciones obtenidas del extracto EY18-4.

Tabla X. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones del extracto EY18-4

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
EY18-4-WW	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
EY18-4-WB	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
EY18-4-FH	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
EY18-4-FD	16	N/E	64	N/E	128	N/E	16	N/E
EY18-4-FM	4	N/E	16	N/E	16	N/E	4	N/E

N/E: no evaluado

Finalmente, se muestra la partición del extracto EY18-12 (Figura 6).

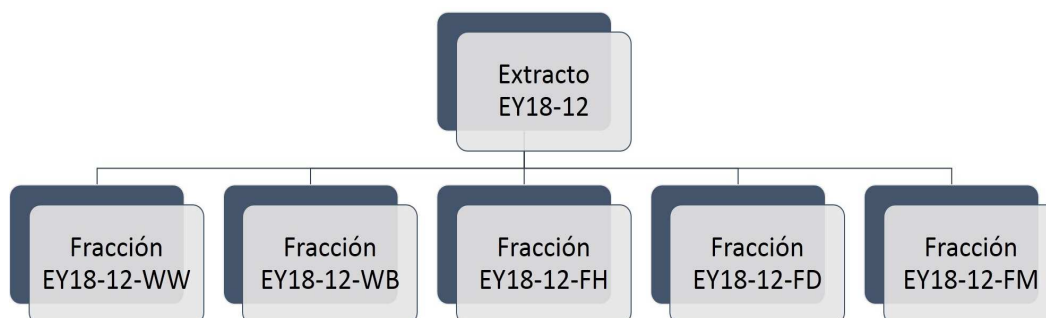


Figura 6. Partición del extracto crudo EY18-12

Las CMIs de las fracciones del extracto EY18-12 se muestran en la Tabla XI.

Tabla XI. Concentración mínima inhibitoria de las fracciones del extracto EY18-12

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
EY18-12-WW	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
EY18-12-WB	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
EY18-12-FH	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E	>128	N/E
EY18-12-FD	128	64	128	16	128	128	16	16
EY18-12-FM	4	2	32	8	16	16	4	2

N/E: no evaluado

5.3 Obtención de las sub-fracciones de los extractos activos

Luego de determinar cuáles fracciones mostraban mejor actividad en la inhibición del crecimiento bacteriano, se procedió a su separación cromatográfica en fase reversa, empleando el método descrito en la sección 4.4.1. lo cual permitió obtener siete sub-fracciones.

En este trabajo, sólo se mostrará la separación cromatográfica y la posterior evaluación biológica de las fracciones CZE56-FD, E25-1-WB y EY18-4-FM. En la Figura 7 se muestran las sub-fracciones obtenidas de la fracción CZE56-FD.

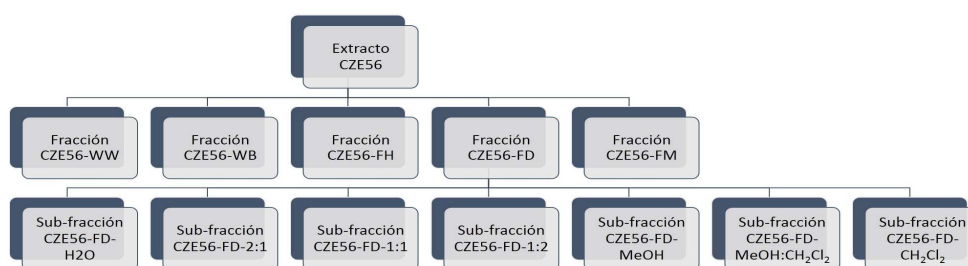


Figura 7. Separación cromatográfica de la fracción CZE56-FD en fase reversa

Las CMIs de las siete sub-fracciones obtenidas de la fracción CZE56-FD se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII. Concentración mínima inhibitoria de las sub-fracciones obtenidas de la fracción CZE56-FD

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
CZE56-FD-H ₂ O	>64	>64	>64	64	>64	>64	8	16
	>64	>64	>64	64	>64	>64	8	16
CZE56-FD-2:1	64	64	>64	64	64	>64	4	
	>64	64	>64	64	>64	>64	8	8 8
CZE56-FD-1:1	16	16	32	8	16	16	0,5	
	16	16	32	16	32	32	1	1 1
CZE56-FD-1:2	>64	>64	>64	64	>64	>64	8	
	>64	>64	>64	>64	>64	>64	16	8 16
CZE56-FD-MeOH	16	16	>64	16	>64	>64	2	
	8	16	>64	32	>64	>64	2	4 4
CZE56-FD-Me:CH ₂ Cl ₂	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
CZE56-FD-CH ₂ Cl ₂	32	32	32	16	32	64	2	
	16	16	64	16	>64	>64	4	4 2

N/E: no evaluado

En la Figura 8 se muestran las sub-fracciones obtenidas de la fracción E25-1-WB.

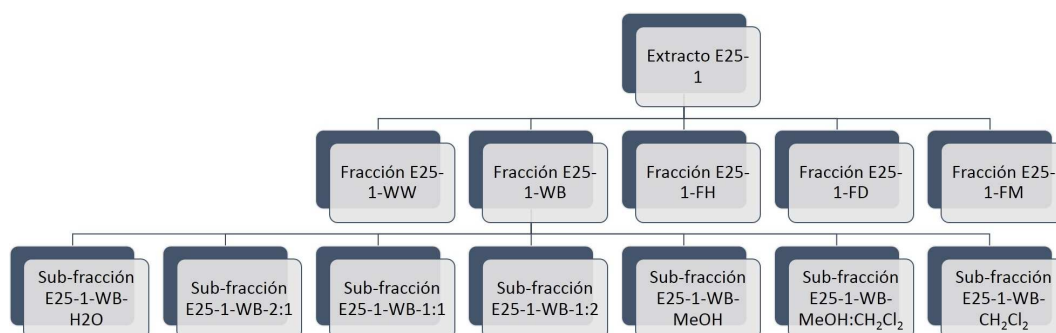


Figura 8. Separación cromatográfica de la fracción E25-1-WB en fase reversa

En la Figura 9 se muestran las sub-fracciones obtenidas de la fracción EY18-4-FM.

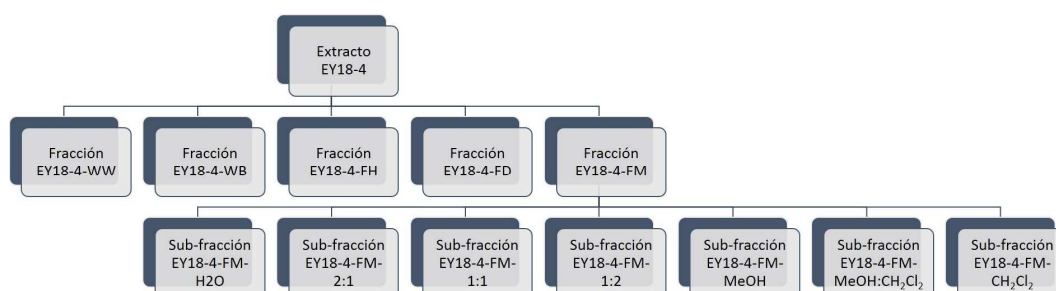


Figura 9. Separación cromatográfica de la fracción EY18-4-FM en fase reversa

Las CMI de las siete sub-fracciones obtenidas de la fracción EY18-4-FM se muestran en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Concentración mínima inhibitoria de las sub-fracciones obtenidas de la fracción EY18-4-FM

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
EY18-4-FM-H ₂ O	>64	>64	>64	64	>64	>64	>64	>64
EY18-4-FM-2:1	4	4	16	8	32	64	4	
EY18-4-FM-1:1	4	4	32	8	64	64	16	16
EY18-4-FM-1:2	8	4	64	16	64	>64	16	16
EY18-4-FM-MeOH	8	8	32	16	64	>64	8	
EY18-4-FM-Me:CH ₂ Cl ₂	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E	N/E
EY18-4-FM-CH ₂ Cl ₂	4	4	32	8	32	32	4	
	8	8	32	16	64	64	8	4 8

N/E: no evaluado

5.4 Obtención de los compuestos puros responsables de la actividad antibacteriana

Luego de determinar cuáles sub-fracciones mantenían la actividad inhibiendo el crecimiento bacteriano, se sometieron a una separación más eficiente mediante HPLC, obteniéndose nuevas sub-fracciones, que al ser analizadas por medio de experimentos de resonancia magnética nuclear de protones y carbono 13 (RMN- ^1H y ^{13}C), demostraron contener compuestos puros o pares de estereoisómeros.

En este trabajo, sólo se mostrará la separación por HPLC de las sub-fracciones E25-1-WB-3 y E25-1-WB-4. En la Figura 10 se muestran las sub-fracciones obtenidas de la fracción E25-1-WB-3.

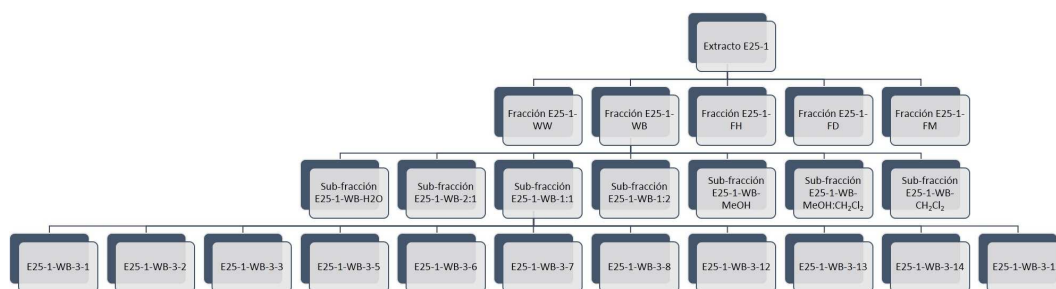


Figura 10. Separación cromatográfica de la sub-fracción E25-1-WB-3 por HPLC

Las CMI de las once sub-fracciones obtenidas de la sub-fracción E25-1-WB-3 se muestran en la Tabla XIV. Es importante destacar que estas sub-fracciones sólo se probaron frente a especies Gram-negativas.

Tabla XIV. Concentración mínima inhibitoria de las sub-fracciones obtenidas de la fracción E25-1-WB-3

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1
E25-1-WB-3-1	>128	>128	128	>128	64	128
	>128	>128	128	>128	64	>128
E25-1-WB-3-2	>128	>128	>128	>128	32	128
	>128	>128	>128	>128	32	>128
E25-1-WB-3-3	>128	>128	>128	>128	128	>128
	>128	>128	>128	>128	128	>128
E25-1-WB-3-5	>128	>128	>128	>128	64	>128
	>128	>128	>128	>128	64	>128
E25-1-WB-3-6	>128	>128	>128	>128	64	128
	>128	>128	>128	>128	64	>128
E25-1-WB-3-7	>128	>128	64	64	8	128
	>128	>128	64	128	8	32
E25-1-WB-3-8	>128	>128	64	64	8-16	128
	>128	>128	64	128	16	128
E25-1-WB-3-12	128	>128	64	128	32	128
	128	>128	128	64	16	128
E25-1-WB-3-13	>128	>128	>128	64	64	128
	>128	>128	128	64	128	>128
E25-1-WB-3-14	>128	>128	>128	>128	>128	>128
E25-1-WB-3-15	>128	>128	128	>128	64	128
	>128	>128	128	>128	64	>128

N/E: no evaluado

En la Figura 11 se muestran las sub-fracciones obtenidas de la fracción E25-1-WB-4.

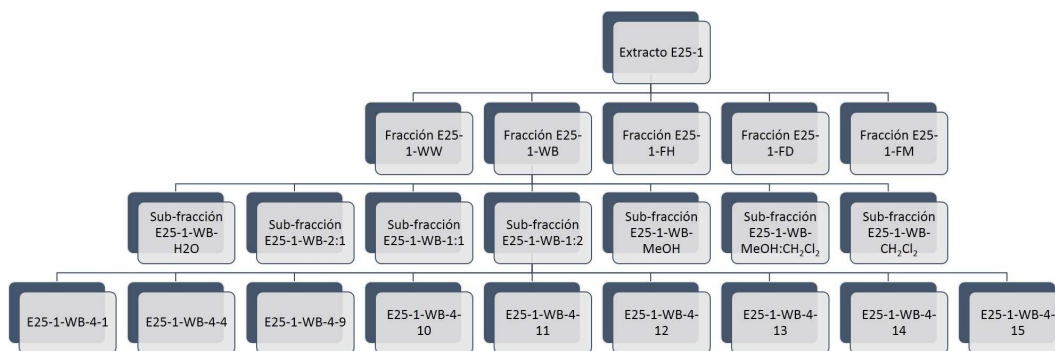


Figura 11. Separación cromatográfica de la sub-fracción E25-1-WB-4 por HPLC

Las CMI de las nueve sub-fracciones obtenidas de la sub-fracción E25-1-WB-4 se muestran en la Tabla XV. Las sub-fracciones obtenidas tampoco se evaluaron frente a especies Gram-negativas.

Tabla XV. Concentración mínima inhibitoria de las sub-fracciones obtenidas de la fracción E25-1-WB-4

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1
E25-1-WB-4-1	>128 >128	>128 >128	128 128	>128 >128	64 64	128 >128
E25-1-WB-4-4	>128 >128	>128 >128	>128 >128	>128 >128	32 32	128 >128
E25-1-WB-4-9	>128 >128	>128 >128	>128 >128	>128 >128	128 128	>128 >128
E25-1-WB-4-10	>128 >128	>128 >128	>128 >128	>128 >128	64 64	>128 >128
E25-1-WB-4-11	>128 >128	>128 >128	128 >128	>128 >128	64 64	128 >128
E25-1-WB-4-12	>128 >128	>128 >128	64 64	64 128	8 8	128 32
E25-1-WB-4-13	>128 >128	>128 >128	64 64	64 128	8-16 8	128 128
E25-1-WB-4-14	128 128	>128 >128	64 128	128 64	32 16	128 128
E25-1-WB-4-15	>128 >128	>128 >128	>128 128	64 64	64 128	128 >128

6. DISCUSIONES

6.1 Selección de los extractos activos

Tras la realización de un rastreo inicial de los extractos metanólicos crudos, se seleccionaron aquellos que resultaron bioactivos, basándonos en el criterio de la CLSI (24) adaptado al hecho de que estaban siendo evaluados extractos naturales en lugar de antibióticos disponibles comercialmente.

Tal criterio se resume en que se consideraron “**sensibles**” aquellas cepas que presentaron una CMI igual o inferior a 64 mg/L del extracto y “**resistentes**” a aquellas cepas cuya CMI resultó mayor a dicho valor.

6.2 Obtención de las fracciones: partición líquido-líquido de los extractos crudos

Una vez seleccionados los extractos activos, en colaboración con los Lic. Dawrin Pech y Lic. Mar Pérez, éstos fueron sometidos a los diferentes sistemas de partición obteniéndose fracciones de menor complejidad, en las que los compuestos químicos presentes están agrupados de acuerdo a su polaridad.

Durante la estancia en el grupo QUIMOLMAT, se aplicó el protocolo modificado de Kupchan sobre el extracto metanólico EA-1 (aproximadamente 50 g).

Luego de intentar disolver esta masa viscosa y oscura con porciones de diclorometano que totalizaron los 100 mL, debieron adicionarse 100 mL de agua en porciones para lograr disolver restos de aspecto más bien iónico (cristales transparentes).

La formación de emulsiones complejas en las mezclas diclorometano-agua está ampliamente descrita en guías prácticas de química orgánica (25). Existen distintos métodos para intentar romperlas, no obstante, las particiones líquido-líquido de un extracto natural, excluye la posibilidad de adicionar salmuera, dejando como último recurso, permitir a la emulsión separarse de forma natural durante períodos largos de tiempo

(12 a 24 horas). En este caso, se tuvo que optar por esta vía, ya que la agitación de la interfase con una varilla de vidrio y el calentamiento de la emulsión con una pistola de calor, no arrojaron resultados satisfactorios.

Una vez obtenidas las fracciones W y F, la partición para obtener WB y WW fue relativamente sencilla, con la única dificultad que representa la evaporación del *n*-butanol, de elevado punto de ebullición, teniendo que mantener la precaución de no calentar por encima de los 40°C. El agua de la fracción WW fue eliminada por arrastre con una corriente de aire.

La fracción FH se obtuvo también sin contratiempos, a diferencia de las dos últimas fracciones, FM y FD, que por tratarse de mezclas de metanol-diclorometano-agua, presentaron nuevamente la formación de emulsiones que requirieron períodos de 24 horas para separarse.

6.3 Obtención de las sub-fracciones: separación cromatográfica de las fracciones activas

6.3.1 Separación cromatográfica en fase reversa con cartuchos C-18

El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en capa fina, con la diferencia de que la fase estacionaria está constituida por partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos de diferentes tipos, convirtiéndola en una matriz apolar. Por este motivo, los eluyentes que se emplean son mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica modificada. Aunque las interacciones hidrofóbicas son, en general, bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; sustituyendo el agua de la fase móvil por un solvente orgánico de manera gradual.

Para llevar a cabo esta técnica, se comenzó disolviendo la masa a separar en la mínima cantidad de agua necesaria o mezclas agua-metanol.

Luego se sembró en la cabeza de la columna cromatográfica, previamente acondicionada con agua, empleando para ello una pipeta Pasteur y haciendo vacío en la salida del cartucho, insertándolo en una cámara adaptada para tal fin.

La columna se eluyó con cada uno de los sistemas de solventes mencionados y el eluato se recogió en matraces limpios. Posteriormente, el solvente se evaporó a presión reducida en el rotavapor o por arrastre con aire.

6.3.2 Separación por HPLC

La purificación de las sub-fracciones activas mediante HPLC es un proceso que requiere conocimiento, entrenamiento y pericia del operario del equipo. No obstante, aun contando con estas habilidades, cada muestra a purificar representa un nuevo desafío debido a la diversidad que puede tenerse en su composición.

Inicialmente, se realiza una inyección de la muestra en el cromatógrafo para verificar la complejidad de la misma y su comportamiento cromatográfico con un método estándar. Luego se van realizando ajustes hasta encontrar las condiciones de operación del equipo que permitan la mayor resolución de la mezcla y el menor gasto de solventes.

Durante el período de trabajo en el grupo QUIMOLMAT, se pudieron observar todas estas cuestiones, no obstante, el tiempo de la estancia no nos permitió adquirir la pericia suficiente como para operar el equipo de forma independiente, por lo que las sub-fracciones que se evaluaron en este trabajo, fueron todas obtenidas por el Lic. Dawrin Pech.

6.4 Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos, fracciones, sub-fracciones y compuestos

6.4.1 Método de la dilución en caldo: determinación de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento

La concentración mínima inhibitoria se obtuvo por la observación directa de los puntos de corte del crecimiento bacteriano en las placas en las que se hizo la microdilución de los extractos, fracciones y compuestos.

Según la cantidad de analito recibido, se partió de concentraciones máximas tan altas como 256 µg/mL o tan bajas como 64 µg/mL. En la mayoría de los casos se pudieron realizar las determinaciones por duplicado y en algunos, inclusive, por triplicado.

La dispersión de los resultados fue mínima, encontrándose que se obtenía el mismo valor en la mayor parte de las determinaciones por duplicado o triplicado.

A continuación, se discutirá cada extracto evaluado de manera particular.

6.4.1.1 Extracto CZE56

En la Tabla XVI se aprecia que las CMI's del extracto crudo son inferiores a las CMI's de la fracción más activa evaluada frente a todas las cepas estudiadas. Esto podría deberse a un efecto sinérgico que ejercen los demás componentes presentes en la mezcla cruda del extracto sobre los compuestos que se aislaron en la fracción FD. Esta tendencia se mantuvo a medida que se avanzó en el proceso de purificación de la mezcla CZE56-FD, pues nuevamente se encontró que las CMI's de las sub-fracciones más activas obtenidas fueron ligeramente superiores a las registradas para el extracto madre.

Destacan los valores de CMI en torno a 0,5 µg/mL y 1 µg/mL de la sub-fracción CZE56-FD-1:1 frente a *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* USA 300 LAC, respectivamente, los cuales la perfilan como una sub-fracción muy prometedora para el aislamiento de los compuestos

responsables de tal actividad y un eventual uso de éstos en el ámbito clínico.

Tabla XVI. Concentración mínima inhibitoria del extracto CZE56 y las fracciones y sub-fracciones más activas

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
Extracto	8		16	4	16	16	1	
CZE56	8	8	8	8	8	16	0,5	<0,125
			8		8		0,5	
Fracción	32		16		32		4	
CZE56-FD	16	16	32	16	32	32	2	2
			32		32		4	
Sub-fracción			32	8	16	16	0,5	1
CZE56-FD-1:1		16	32	16	32	32	1	1
		16					1	
Sub-fracción	16	16						
CZE56-FD-MeOH	8							

6.4.1.2 Extracto E25-1

En la Tabla XVII, se observa que las CMIs del extracto crudo y de la fracción más activa, casi siempre fueron valores semejantes, con la excepción del valor obtenido para E25-1-WB frente a *P. aeruginosa* PAO1 (2 $\mu\text{g/mL}$). No obstante, debido a la poca cantidad de fracción disponible, no se pudieron realizar réplicas el experimento, por lo que este valor se considera dudoso, más aún cuando luego de su fraccionamiento, no se encontró tal potencia antibacteriana en ninguna de las sub-fracciones derivadas de ella.

De las series de sub-fracciones o compuestos puros derivados de E25-1, destacan E25-1-WB-3-7 y E25-1-WB-4-12 con CMI de 8 µg/mL frente a *P. aeruginosa* ATCC 27823 como los mejores valores de la serie.

Tabla XVII. Concentración mínima inhibitoria del extracto E25-1 y las fracciones y sub-fracciones más activas

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
Extracto E25-1	N/E	N/E	64 128	128	32	128	64	128
Fracción E25-1-WB	128	128	128	64	32	2	N/E	N/E
Sub-fracción E25-1-WB-3-7	>128	>128	64	64 64	8	128	N/E	N/E
Sub-fracción E25-1-WB-4-12	>128	>128	64	64 128	8	32	N/E	N/E

N/E: no evaluado

6.4.1.3 Extracto EY18-4

Al igual que en el caso anterior, en la Tabla XVIII se aprecia que las CMI de la fracción más activa EY18-4-FM son prácticamente iguales a las CMI de el extracto crudo frente a las cepas tipo (entre las que podemos hacer la comparación). Además, esta tendencia se mantiene luego del fraccionamiento posterior, encontrándose valores tan buenos como una CMI de 4 µg/mL para la sub-fracción EY18-4-FM-2:1 frente a *A. baumannii* ATCC 17978 y en torno a 4 µg/mL para las sub-fracciones EY18-4-FM-2:1 y EY18-4-FM-CH₂Cl₂ frente a *A. baumannii* ABRIM, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* USA 300 LAC. Esto convierte a estas sub-fracciones en candidatas prometedoras para su purificación posterior.

Tabla XVIII. Concentración mínima inhibitoria del extracto EY18-4 y las fracciones y sub-fracciones más activas

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
Extracto	4	2	16					
EY18-4	4	4	32	16	32	64	4	8
Fracción								
EY18-4-FM	4	N/E	16	N/E	16	N/E	4	N/E
Sub-fracción								
EY18-4-FM-2:1	4		16		32		4	4
	4		32		64		8	8
Sub-fracción		4						
EY18-4-FM-1:1		8		8	16			
Sub-fracción								
EY18-4-FM-CH ₂ Cl ₂					32	32	4	4
					64	64	8	8

N/E: no evaluado

6.4.1.4 Extracto EY18-12

En la Tabla XIX sólo se aprecia la comparación entre las CMIs del extracto crudo y de la fracción más activa EY18-12-FM. Como se puede ver, las CMIs de la fracción son notablemente inferiores a las del extracto madre, con valores muy prometedores como CMIs de 2 µg/mL frente a *A. baumannii* ABRIM y *S. aureus* USA 300 LAC. No obstante, deben realizarse réplicas de estos experimentos para validar si hay reproducibilidad en los resultados, haciendo confiables o no a estos datos.

Tabla XIX. Concentración mínima inhibitoria del extracto EY18-12 y las fracciones y sub-fracciones más activas

	CMI (µg/mL)							
	<i>A. baumannii</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>	
	ATCC 17978	ABRIM	ATCC 700603	ST15	ATCC 27823	PAO1	ATCC 29213	USA 300 LAC
Extracto EY18-12	16	N/E	>128	N/E	>128	N/E	16 32 32	8
Fracción EY18-12-FM	4	2	32	8	16	16	4	2

N/E: no evaluado

6.5.2 Ensayo de Kirby-Bauer (halos de inhibición del crecimiento)

El método de Kirby-Bauer o de difusión en agar es un método orientativo de la susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas, aunque también puede ser empleado para determinar la sensibilidad de una cepa a cierto extracto natural o compuesto desconocido.

No obstante, presenta limitaciones importantes que hacen necesario un ensayo adicional para verificar un resultado presuntivo. En el caso de la evaluación de extractos naturales y/o sus fracciones, estas limitaciones están asociadas principalmente a la capacidad de los compuestos de difundir a través del agar para lograr una distribución comparable entre los distintos analitos evaluados o entre los propios componentes de un analito compuesto.

Es posible que en la mayoría de los casos no haya podido verificarse la actividad detectada con el ensayo de dilución en caldo (Tabla V) con este método, debido a que los 10 extractos que resultaron activos en suspensión, no estén difundiendo a igual velocidad a través del agar sólido de las placas.

7. CONCLUSIONES

Diez de los sesenta y cinco extractos de los organismos marinos evaluados en este estudio mostraron actividad inhibiendo el crecimiento de especies bacterianas multirresistente relevantes y de interés clínico.

Los extractos CZE56, EY18-4, EY18-12 y E25-1 fueron los más activos de la serie.

La partición líquido-líquido de los extractos permitió separarlos en fracciones más sencillas que mantienen la respuesta biológica inicial, apreciada principalmente en las fracciones metanol y diclorometano, lo que podría indicar que los compuestos responsables son de polaridad media.

La purificación cromatográfica de las fracciones permitió centrar la búsqueda de los compuestos activos en fracciones de polaridad media-baja.

El experimento de determinación de la concentración mínima inhibitoria ofrece, en la mayor parte de los casos, resultados reproducibles.

El ensayo de sensibilidad por difusión en disco (Kirby-Bauer) no debe usarse para la toma de decisiones en un aislamiento bioguiado de compuestos de origen natural a partir de sus extractos crudos, ya que presenta limitaciones que enmascaran la verdadera actividad biológica.

8. AGRADECIMIENTOS

Con este trabajo culmina una etapa y su realización no hubiera sido posible sin la participación de las instituciones y personas que mencionaré a continuación, tratando de no olvidar a ninguna, que, de hacerlo, sería de manera totalmente involuntaria:

A la Xunta de Galicia, por el financiamiento de mis estudios a través de la Beca Excelencia Juventud Exterior, convocatoria 2018.

A mis directores, Dra. Margarita Poza Domínguez y Dr. Alejandro Beceiro Casas, por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología del C.H.U.A.C., por confiar en mi voluntad y ganas de aprender, por asesorarme en la toma de decisiones durante el trabajo experimental y en la confección de este manuscrito.

A Marta, por enseñarme todo lo que necesité aprender para realizar los experimentos en Microbiología y echarme un mano cuando hizo falta.

A Juan Carlos, Kelly, Cristina, Astrid, Eva y Soraya por estar allí para resolver cualquier duda rápida y hacer siempre ameno y divertido el trabajo en el laboratorio.

A María (Maricuchi), por el apoyo técnico, los consejos y la amena conversación de cada tarde.

A los directores del grupo QUIMOLMAT, Dr. Jaime Rodríguez y Dr. Carlos Jiménez, por permitirme realizar esta nutritiva estancia sus espacios en el C.I.C.A.

A Mar Pérez y, muy especialmente, a Dawrin Pech, por compartir conmigo tanto conocimiento sobre productos naturales.

A Rosa, Carmen y Diana del QUIMOLMAT, por la ayuda técnica.

A David, Alba, Lidia y Alex por los bonitos momentos trabajando en equipo y aprendiendo juntos durante el máster y, muy especialmente, a Marina, por convertirte en la amiga que necesité en el momento indicado. Gracias por tu amistad sincera y siempre divertida.

A mi esposo, Carlos, porque sin ti cariño, no estaríamos hoy aquí. Gracias por sacar fuerzas cuando ninguno de los dos las teníamos para hacer posible este sueño, por ser mi apoyo y por seguir enseñándome tantas cosas.

A mis hijos, Luciano, por ser la luz de cada mañana y el abrazo en el corazón cada noche de mi vida desde tu llegada, y Martín, llegaste inesperadamente y partiste antes de tiempo para que nuestras vidas dieran un vuelco. Gracias por hacerme tan feliz a tu lado y por enseñarme tanto.

A mis padres y mis hermanos, porque siempre han confiado en mí y que desde la distancia, siempre han celebrado cada uno de mis logros. Papá, sé que estás muy orgulloso allá arriba.

A Dios, por sostenerme y guiarme siempre.

9. BIBLIOGRAFÍA REFERENCIADA

1. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med 2004;10:122-129.

2. a) Nathan C, Cars O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. *N Engl J Med* 2014;371(19):1761-1763. b) Kim W, Zhu W, Hendricks GL, van Tyne D, Steele AD, Keohane CE, Fricke N, Conery AL, Shen S, Pan W, Lee K, Rajamuthiah R, Fuchs BB, Vlahovska PM, Wuest WM, Gilmore MS, Gao H, Ausubel FM, Mylonakis E. A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. *Nature* 2018;556(7699):103-107.
3. Gail M, Raut N, Wick SM. Natural products and traditional medicines for the treatment of multidrug resistant bacteria. *Med Res Arch* 2018;6(1).
4. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 2008;197:1079-1081.
5. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48(1):1-12.
6. Chung DR, Song JH, Kim SH, Thamlikitkul V, Huang SG, Wang H, So TM, Yasin RM, Hsueh PR, Carlos CC, Hsu LY, Buntaran L, Lalitha MK, Kim MJ, Choi JY, Kim SI, Ko KS, Kang CI, Peck KR. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184(12):1409-17.
7. Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clin Infect Dis* 2008;46(7):1121-1122.
8. Keen EF, Robinson BJ, Hospenthal DR, Aldous WK, Wolf SE, Chung KK, Murray CK. Prevalence of multidrug-resistant organisms recovered at a military burn center. *Burns* 2010;36(6):819-825.
9. Jiang X, Wang Y, Qin Y, He W, Benlahrech A, Zhang Q, Jiang X, Lu Z, Li G, Zheng Y. Micheliolide provides protection of mice against *Staphylococcus aureus* and MRSA infection by down-regulating inflammatory response. *Sci Rep* 2017;7:41964.

10. Choo EJ, Chambers HF. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Chemother* 2016;48(4):267-273.
11. Ani C, Farshidpanah S, Stewart AB, Nguyen HB. Variations in organism-specific severe sepsis mortality in the United States: 1999–2008. *Crit Care Med* 2015;43(1):65-77.
12. Constantino LS, Guimarães TR, Oliveira SQ, Bianco EM, Pessoa LGS Michel M, Schenkel EP, Dal Pizzol F, Reginatto HF. TSH fraction from *Petromica citrina*: A potential marine natural product for the treatment of sepsis by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *Biomed Pharmacother* 2018;108:1759-1766.
13. Pane G, Cacciola G, Giacco E, Mariottini GL, Coppo E. Assessment of the Antimicrobial Activity of Algae Extracts on Bacteria Responsible of External Otitis. *Mar Drugs* 2015; 13(10):6440-6452.
14. a) Newman DJ, Cragg GM, Snader KM The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 2000;17:215–234. b) Proksch P, Edrada-Ebel RA, Ebel R. Drugs from the sea—Opportunities and obstacles. *Mar Drugs* 2003;1:5-17.
15. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. *J Nat Prod* 2003;66:1022-1037.
16. Sengupta S, Pramanik A, Ghosh A, Bhattacharyya M. Bhattacharyya. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiol* 2015;15:170.173.
17. a) Montaser R, Luesch H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med Chem* 2011;3:1475-1489. b) Gerwick WH, Moore BS. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol* 2012; 19:85-98.
18. Laport MS, Santos OCS, Muricy G. Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Curr Pharm Biotechnol* 2009;10:86-105.
19. Gerovasileiou V, Chintiroglou CC, Konstantinou D, Voultsiadou E. Sponges as “living hotels” in Mediterranean marine caves. *Sci Mar* 2016;80(3):279-289.

20. a) Tarazona G, Santamaría G, Cruz PG, Fernández R, Pérez M, Martínez-Leal JF, Rodríguez J, Jiménez C, Cuevas C. Cytotoxic anomoian B and aplyzanzine B, new bromotyrosine alkaloids from Indonesian sponges. *ACS Omega* 2017;2:3494-3501. b) Urda C, Pérez M, Rodríguez J, Jiménez C, Cuevas C, Fernández R. Pembamide, a N-methylated linear peptide from a sponge *Cribrochalina* sp. *Tetrahedron Lett* 2016;57:3239-3242. c) Figueroa L, Jiménez C, Rodríguez J, Areche C, Chávez R, Henríquez M, De La Cruz M, Díaz C, Segade Y, Vaca I. 3-nitroasterric acid derivatives from the Antarctic sponge-derived fungus *Pseudogymnoascus* sp. *J Nat Prod* 2015;78:919-923.
21. a) Urda C, Fernández R, Rodríguez J, Pérez M, Jiménez C, Cuevas C. Daedophamide, a cytotoxic cyclodepsipeptide from the sponge *Daedalopelta* sp collected in Indonesia. *J Nat Prod* 2017;80:3054-3059. b) Quintana J, Brango-Vanegas J, Costa GM, Castellanos L, Arévalo C, Duque C. Marine organisms as source of extracts to disrupt bacterial communication: bioguided isolation and identification of quorum sensing inhibitors from *Ircinia felix*. *Rev Bras Farmacogn* 2015;25:199-207.
22. Vanwagenen BC, Larsen R, Cardellina JH, Randazzo D, Lidert ZC, Swithenbank C. Ulosantoin, a potent insecticide from the sponge *Ulosaruetzleri*. *J Org Chem* 1993;58:335-337.
23. Acharya, T. Minimum Inhibitory concentration (MIC): Broth dilution method-procedure and interpretation. *Microbeonline. Medical Microbiology Guide*; 2015, mayo. [acceso 6 de junio de 2019]. Disponible en: <https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-mic-broth-dilution-method-procedure-interpretation/>
24. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (28th edition) CLSI supplement M100. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
25. Vogel AI, Tatchell AR, Furnis BS, Hannaford AJ, Greig-Smith PW. *Textbook of practical organic chemistry (fifth edition)*. London, Great Britain: Longman Scientific & Technical; 1989.