



Title: Antibacterial activity of *Costus pulverulentus* (Costaceae) C. Presl

Authors: RAMIRO-BAUTISTA, Luis Rodrigo, HERNÁNDEZ-MORALES, Alejandro, CARRANZA-ÁLVAREZ, Candy e MALDONADO-MIRANDA, Juan José

Editorial label ECORFAN: 607-8695

BECORFAN Control Number: 2020-05

BECORFAN Classification (2020): 111220-0005

Pages: 34

RNA: 03-2010-032610115700-14

ECORFAN-México, S.C.

143 – 50 Itzopan Street

La Florida, Ecatepec Municipality

Mexico State, 55120 Zipcode

Phone: +52 1 55 6159 2296

Skype: ecorfan-mexico.s.c.

E-mail: contacto@ecorfan.org

Facebook: ECORFAN-México S. C.

Twitter: @EcorfanC

www.ecorfan.org

Holdings

Mexico	Colombia	Guatemala
Bolivia	Cameroon	Democratic
Spain	El Salvador	Republic
Ecuador	Taiwan	of Congo
Peru	Paraguay	Nicaragua

Contenido

- Introducción

- Antecedentes

- Hipótesis

- Metodología

- Resultados

- Conclusiones

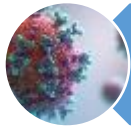
- Referencias

INTRODUCCIÓN

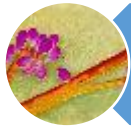
Actualmente existe una enorme y grave problemática causada por el aumento de la resistencia de microorganismos a los tratamientos antimicrobianos, como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas (OMS, 2016).



Bacterias



Virus



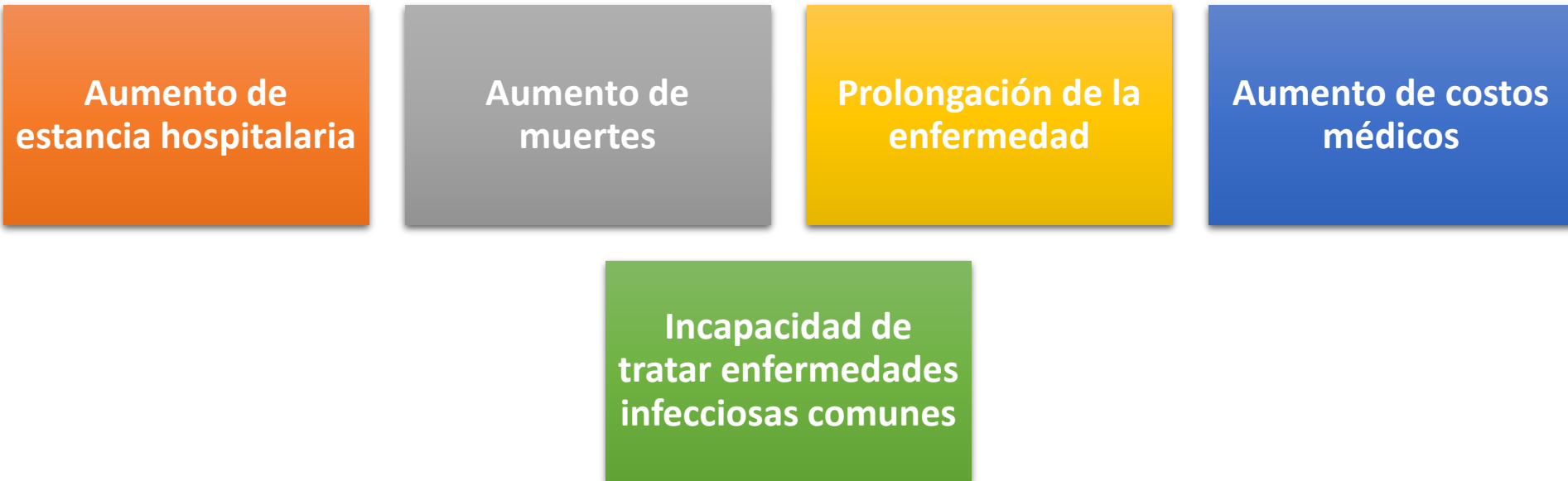
Hongos



Parásitos

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, entre los múltiples problemas que puede causar se encuentran (OMS, 2016).



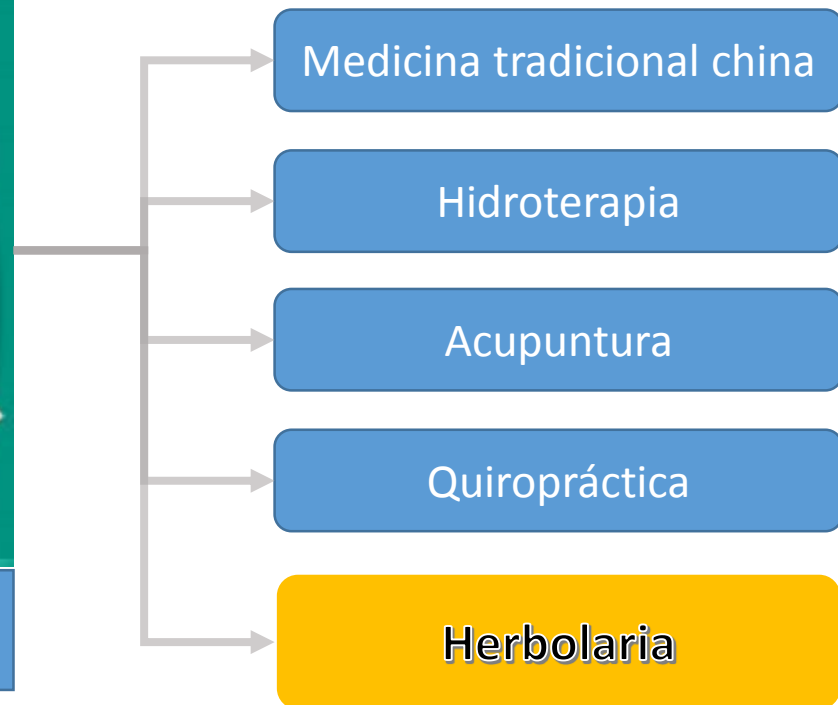
INTRODUCCIÓN

Entre los microorganismos resistentes con una distribución más amplia y que representan un serio problema de salud por ser importantes agentes etiológicos de infecciones el tracto urogenital y gastrointestinal se encuentran los siguientes (OMS, 2017).

Grupo	Microorganismo
Enterobacterias no encapsulada	<i>E. coli</i> ;
Enterobacteria encapsulada	<i>K. pneumoniae</i>
Cocos grampositivos	<i>S. aureus</i>
No enterobacteria	<i>P. aeruginosa</i>
Parásitos	<i>Entamoeba histolytica</i>
Hongos	<i>C. albicans</i>

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los países a nivel mundial no garantizan el 100% de cobertura médica a su población apoyados por la OMS se buscan alternativas basadas en la medicina tradicional y complementaria (MTC) de tratamientos para distintas enfermedades, incluidas las ocasionadas por microorganismos patógenos, principalmente aquellos que muestran resistencia a los medicamentos de primera elección (OMS, 2013).



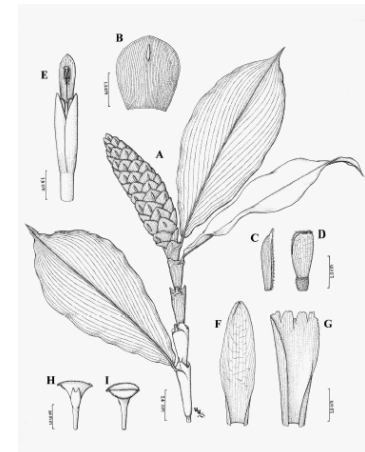
INTRODUCCIÓN

En la Huasteca Potosina las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos tanto en el medio rural como en el suburbano, entre ellas *Costus pulverulentus* destaca como una importante alternativa de tratamiento, lo anterior derivado del uso etnofarmacológico que se le da a la planta para el tratamiento de infecciones del sistema urinario y gastrointestinal. Sin, embargo es necesario validar mediante metodologías científicas las propiedades terapéuticas de la planta, así como conocer el principio activo de esta planta (Alonso-Castro et al., 2015)

OBJETIVOS

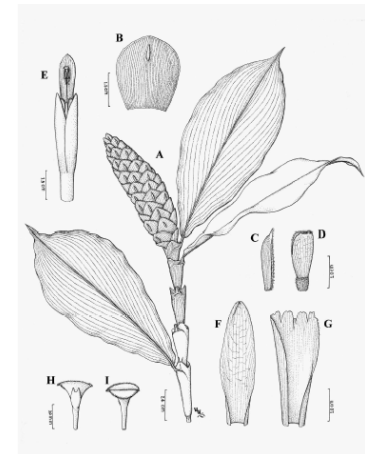
Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano sobre bacterias de importancia clínica del extracto etanólico completo y fracciones orgánicas obtenidas *Costus pulverulentus* (Costaceae).



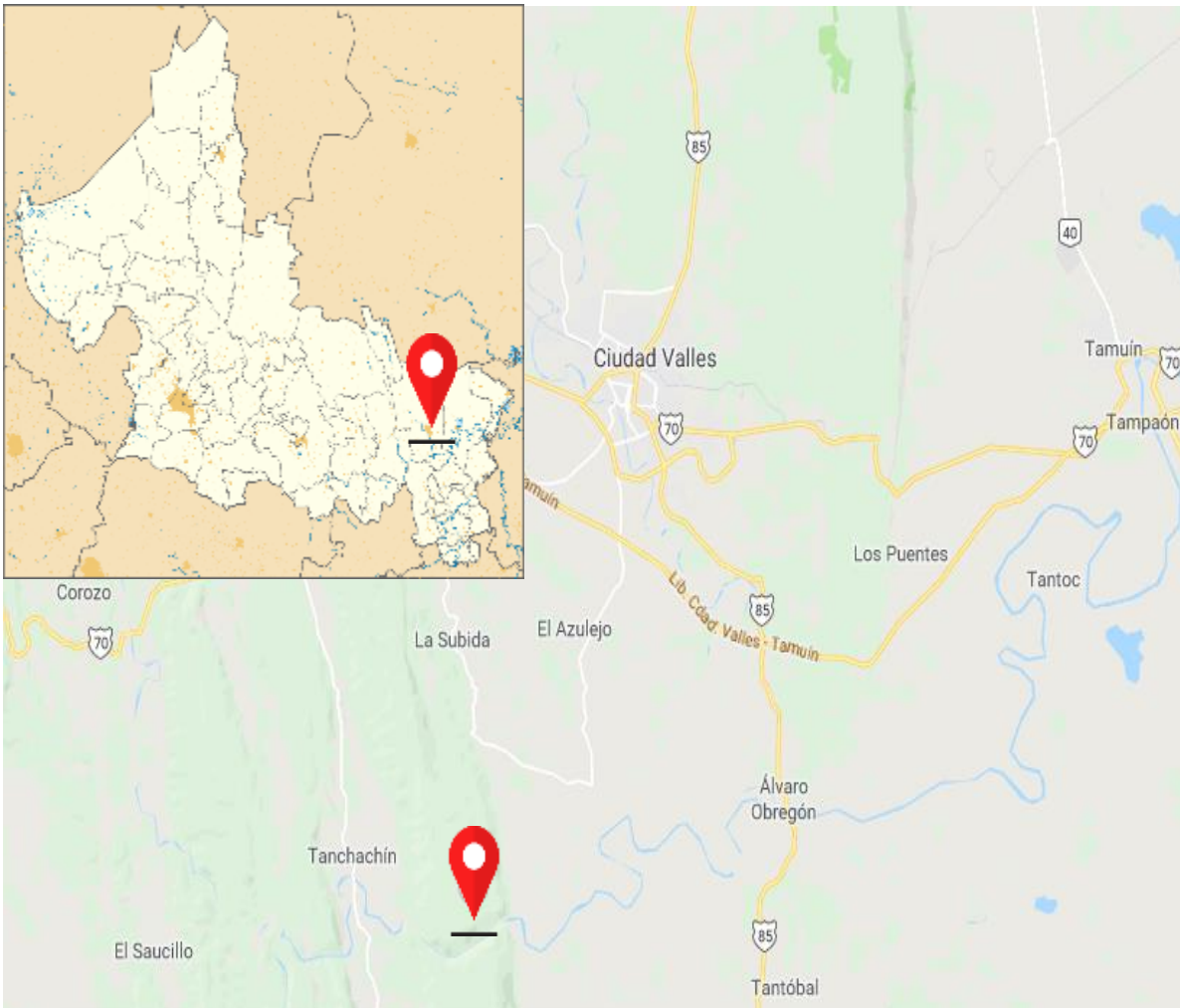
HIPÓTESIS

Costus pulverulentus es una planta de interés farmacológico que contiene metabolitos bioactivos en su tallo los cuales poseen actividad antimicrobiana contra bacterias de interés clínico.



METODOLOGÍA

PROCESAMIENTO DE LA PLANTA



Secado a 45 ° C, estufa de convección



Pulverizado en molino analítico



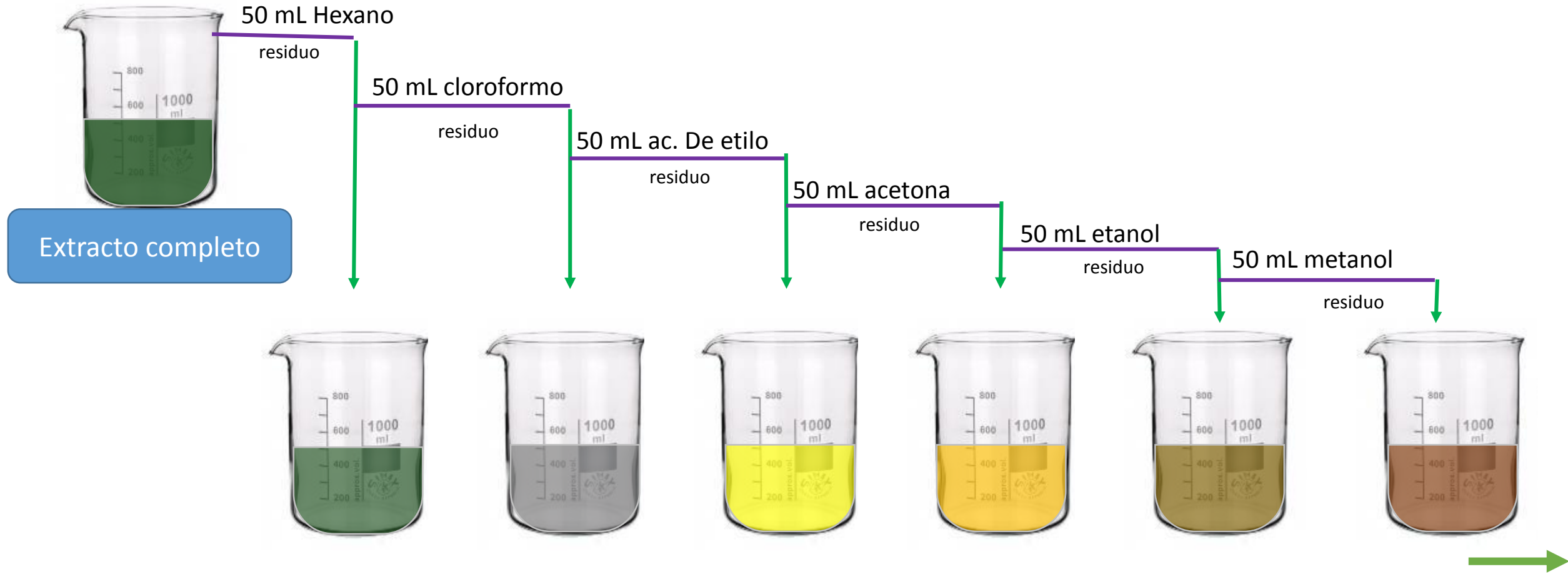
Maceración y filtrado



Concentración en rotavapor (40° C, 175 mbar)

METODOLOGÍA

FRACCIONAMIENTO PRIMARIO



METODOLOGÍA

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA



Hexano (ml)	Acetato de etilo (ml)	Metanol (ml)
100	0	0
90	10	0
80	20	0.1
70	30	0.2
60	40	0.3
50	50	0.4
40	60	0.5
30	70	0.6
20	80	0.7
10	90	0.8
0	100	0.9

Sistemas 100 mL, recolección de fracciones de 50 mL.
Velocidad 1 gota/segundo

CROMATOGRAFÍA CG-EM



60 m x 250 μ m x 0.25 μ m
Helio como gas acarreador a una velocidad de flujo constante de 1 ml/min.

METODOLOGÍA

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA



Preinóculo de bacterias
seleccionadas
Caldo Müller-Hinton
18 hrs, 37 ° C

Bacterias Gram positivas
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus ATCC 29213
S. aureus Ox^R,
Enterococcus faecalis,
Bacillus sp.



Cromobacterium violaceum
Caldo LB 20 mL + 10 µL Kanamicina
100 µg/mL
24 hrs, 37 ° C

Bacterias Gram negativas
Escherichia coli ATCC 15597
Pseudomonas aeruginosa ATCC 30298
Klebsiella pneumoniae ATCC 22895
Aeromonas hydrophila,
Proteus mirabilis,
Citrobacter freundii,

METODOLOGÍA

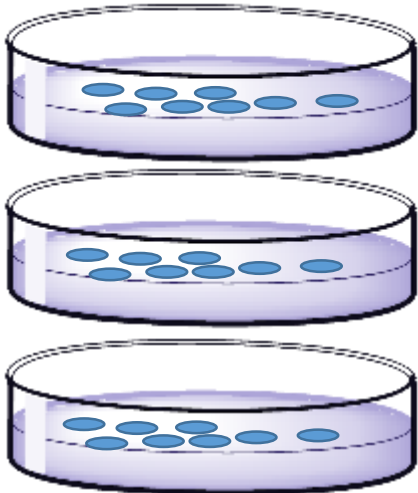
PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO



Preinóculo de bacterias seleccionadas
Caldo Müller-Hinton
18 hrs, 37 ° C

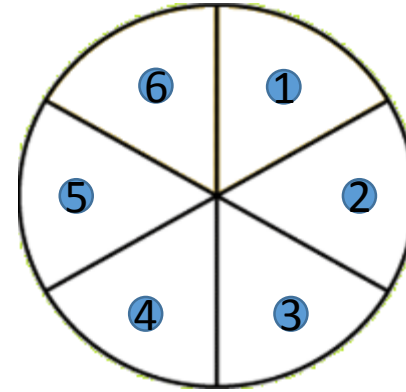


Siembra en césped



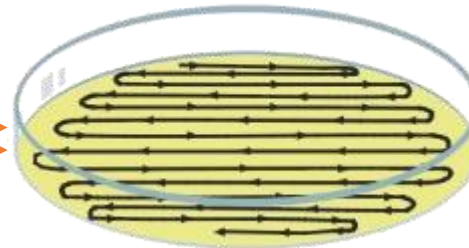
10 µL (Concentración necesaria para 10 y 30 µg de la fracción o extracto) en el disco correspondiente

Secado 2 hrs, T.A,
protegido de la luz



Identificación numérica de cada uno de los extractos fracciones probadas.

Agar Müller-Hinton 4 mm espesor

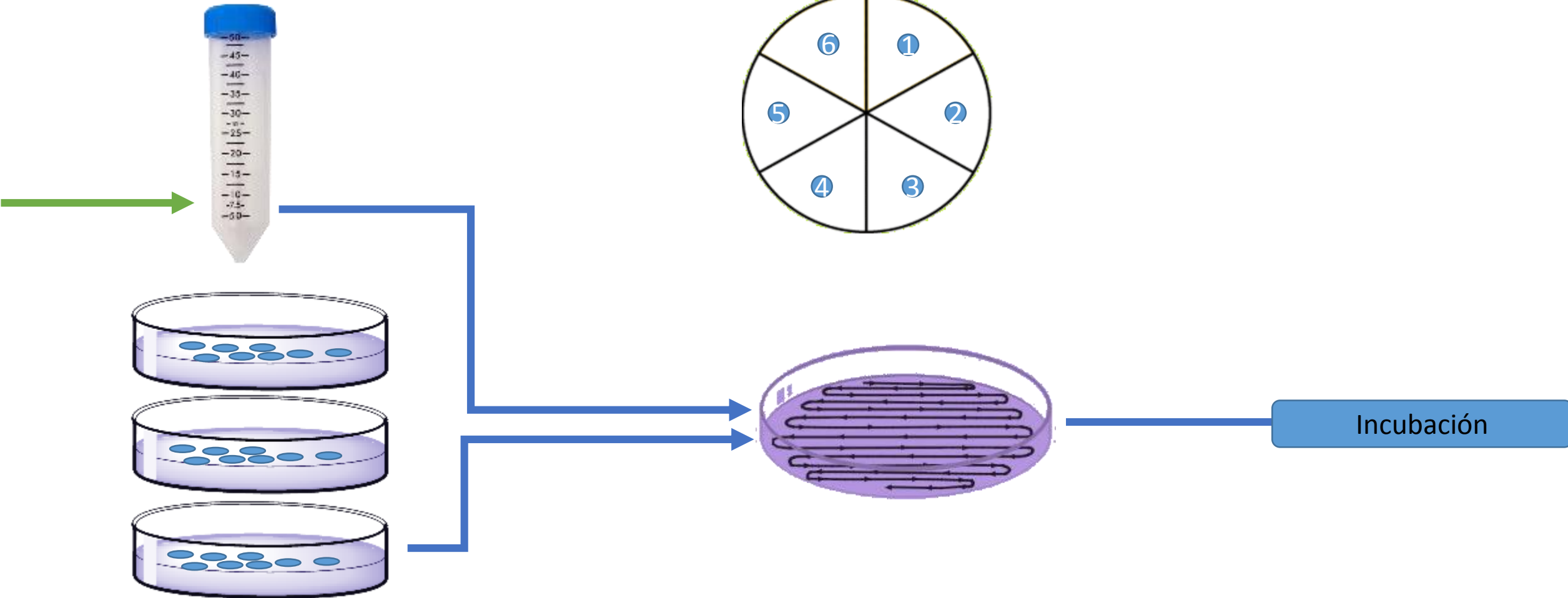


Refrigeración de cajas 2 hrs,
antes de incubación

Incubación

METODOLOGÍA

PRUEBA ANTIQUORUM SENSING

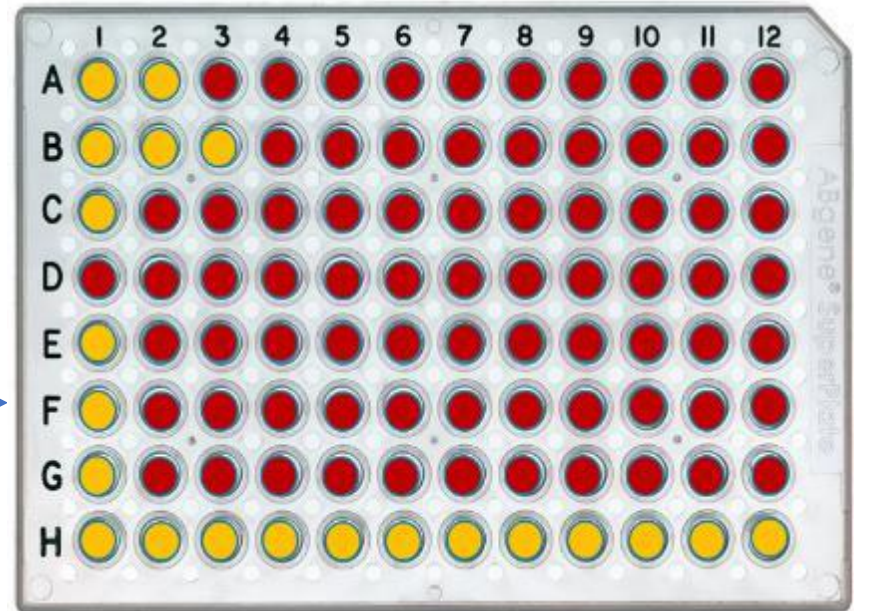


METODOLOGÍA

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA



**Preinóculo de bacterias
seleccionadas**
Caldo Müller-Hinton
18 hrs, 37 ° C



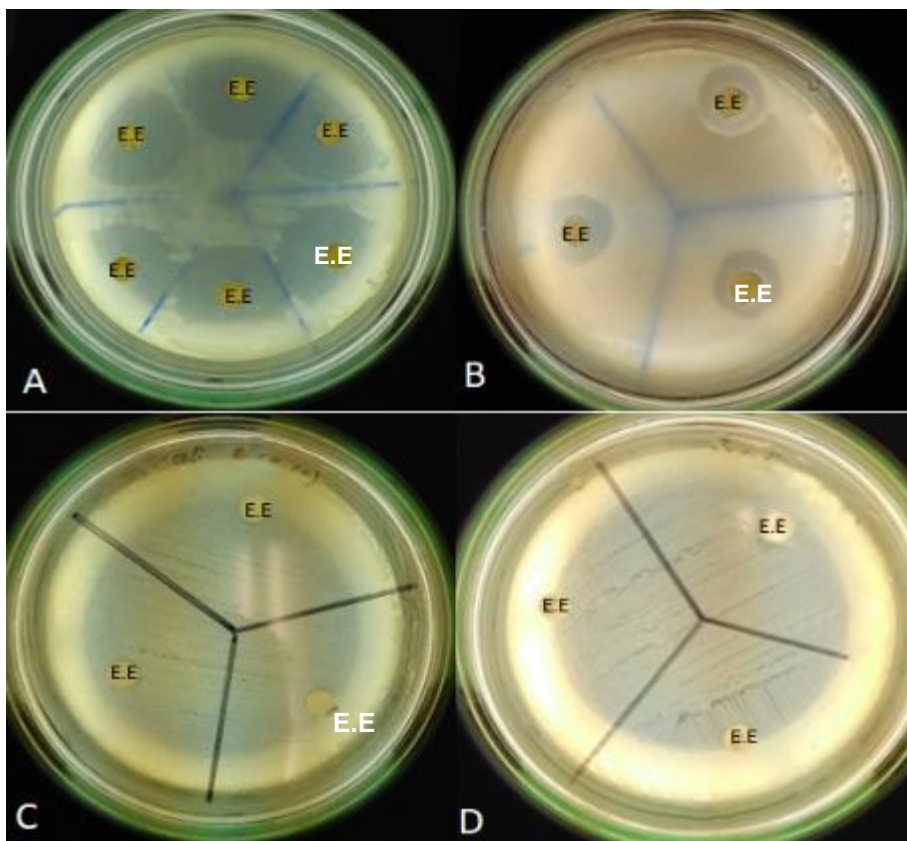
METODOLOGÍA

PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA



Nauplios de tercer instar *A. salina*
Agua de mar sintética
Concentraciones de E.E, Fracción metanólica y Fracción 8.

Determinación de la actividad antimicrobiana del Extracto Etanólico (E.E.) de *Costus pulverulentus*



Microorganismo	Halo de inhibición (mm)	
	E.E.	Km
<i>Escherichia coli</i>	0	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		20
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	7 ± 0	15
<i>Bacillus sp.</i>	16 ± 0.06	19

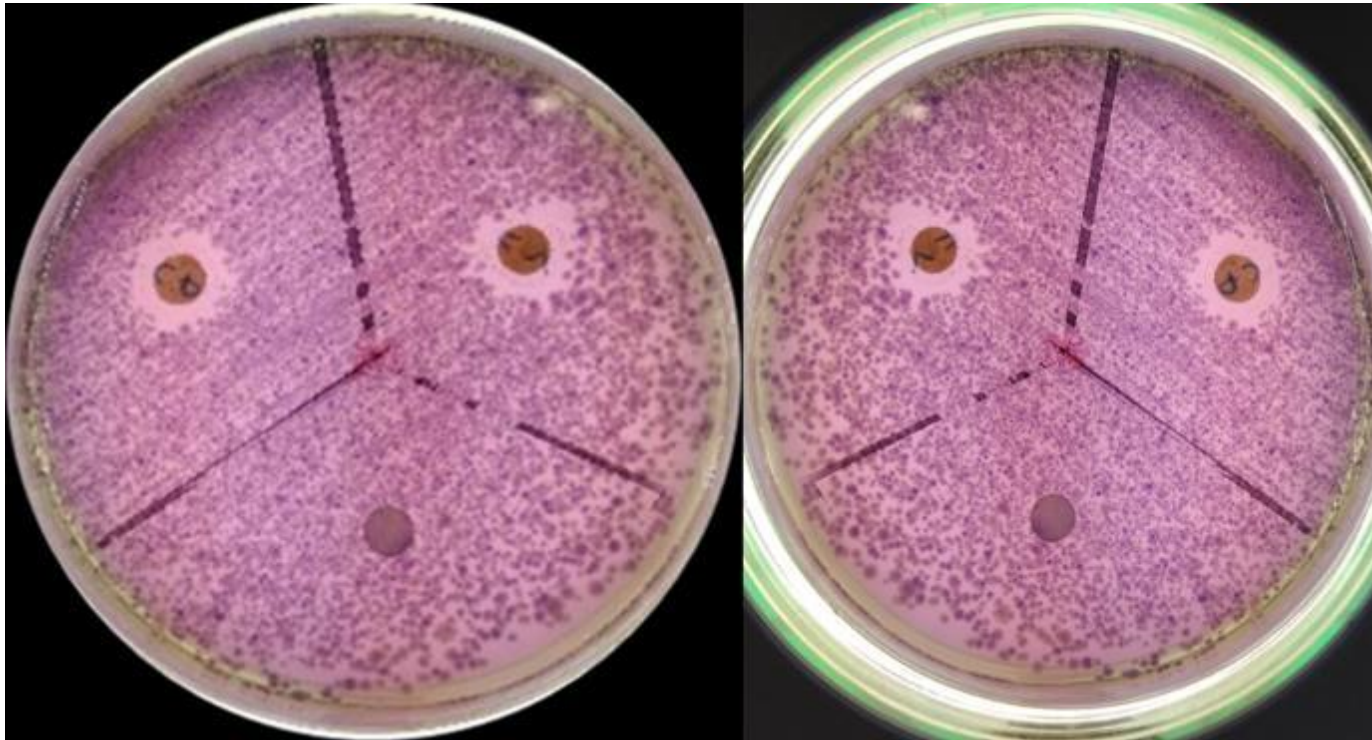
Efecto del E.E. de *C. pulverulentus* contra A) *Bacillus sp.*, B) *E. faecalis*, C) *E. coli*, D) *K. pneumoniae*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la Actividad anti-Quorum Sensing del E.E. de *Costus pulverulentus*



Los resultados obtenidos muestran que la producción de violaceína no se afecta en presencia del E.E., indicando que el extracto de *C. pulverulentus* no posee compuestos anti-QS. Sin embargo, el E.E. posee efecto inhibitor de crecimiento a una dosis de 10 μg /disco generando un halo de inhibición de 12 mm en la placa inoculada con *C. violaceum*

Efecto del E.E. contra C. violaceum CV026. Todas las pruebas se hicieron por triplicado

RESULTADOS

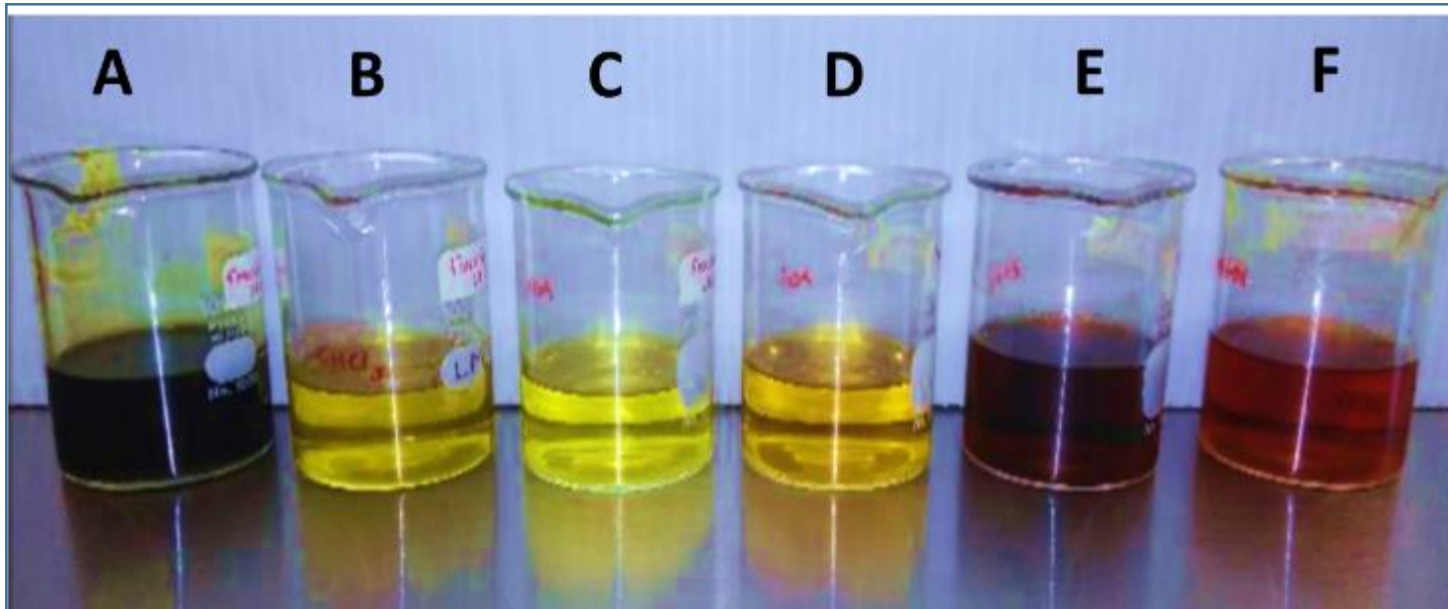
La caracterización química del extracto muestra la presencia de **carbohidratos, ácidos orgánicos y esteroides**, de manera similar a lo reportado previamente (Alonso-Castro et al. 2016). Entre los ácidos orgánicos se identificaron compuestos fenólicos, a los cuales se ha atribuido actividad antimicrobiana (Creus, 2004).

Para determinar el o los metabolitos bioactivos, responsables del efecto antimicrobiano, se realizó el fraccionamiento del E.E. de *C. pulverulentus*



RESULTADOS

Fraccionamiento del extracto etanólico de *C. pulverulentus*



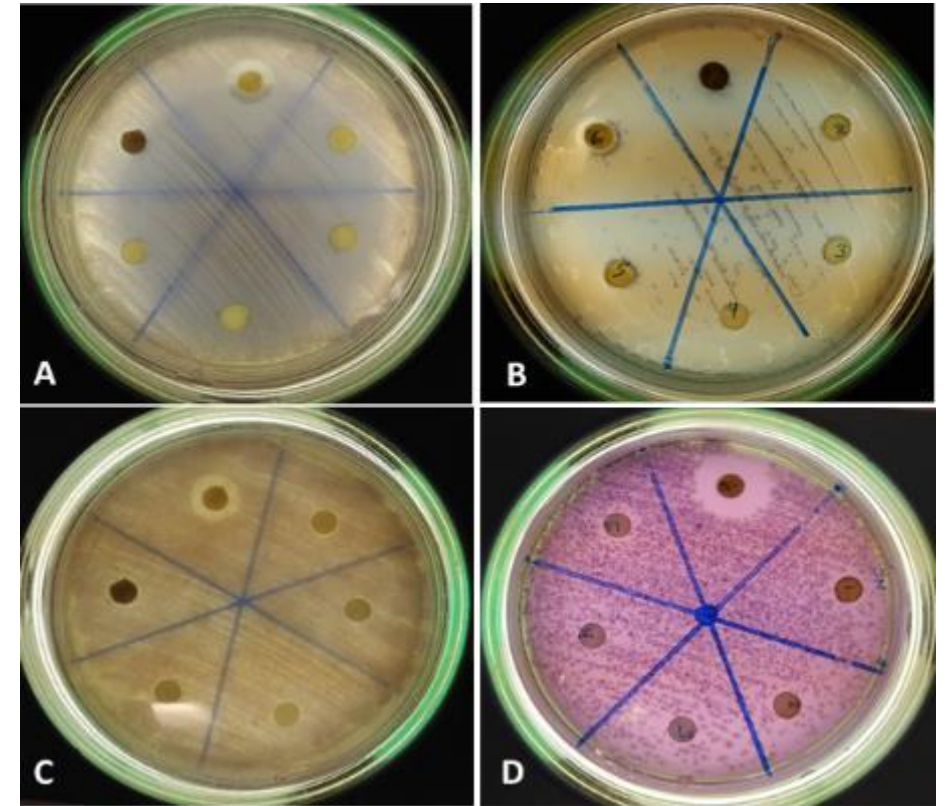
Fracciones orgánicas del extracto etanólico de *C. pulverulentus*. A) Hexano, B) Cloroformo, C) Acetato de Etilo, D) Acetona, E) Etanol, F) Metanol.

Fracción	Peso	Rendimiento %
Hexánica	0.4651 g	0.4651 %
Clorofórmica	0.0180 g	0.0180 %
AcoEt	0.0090 g	0.0090 %
Acetona	0.0128 g	0.0128 %
Etanólica	0.1294 g	0.1294 %
Metanólica	0.3054 g	0.3054 %

RESULTADOS

Actividad antimicrobiana de las Fracciones orgánicas obtenidas a partir del E.E.

Bacteria	Fracción / Inhibición (mm)						Control
	Hex	CH ₃ Cl	AcoET	Acet	EtOH	MeOH	
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	0	0	0	0	0	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	7	6	15
<i>Bacillus sp.</i>	0	0	0	0	8	15±0.5	19
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	0	0	0	0	0	12	0
Control (Kanamicina)	Inhibición dependiente de la bacteria según estándares internacionales (BSAC, 2013).						

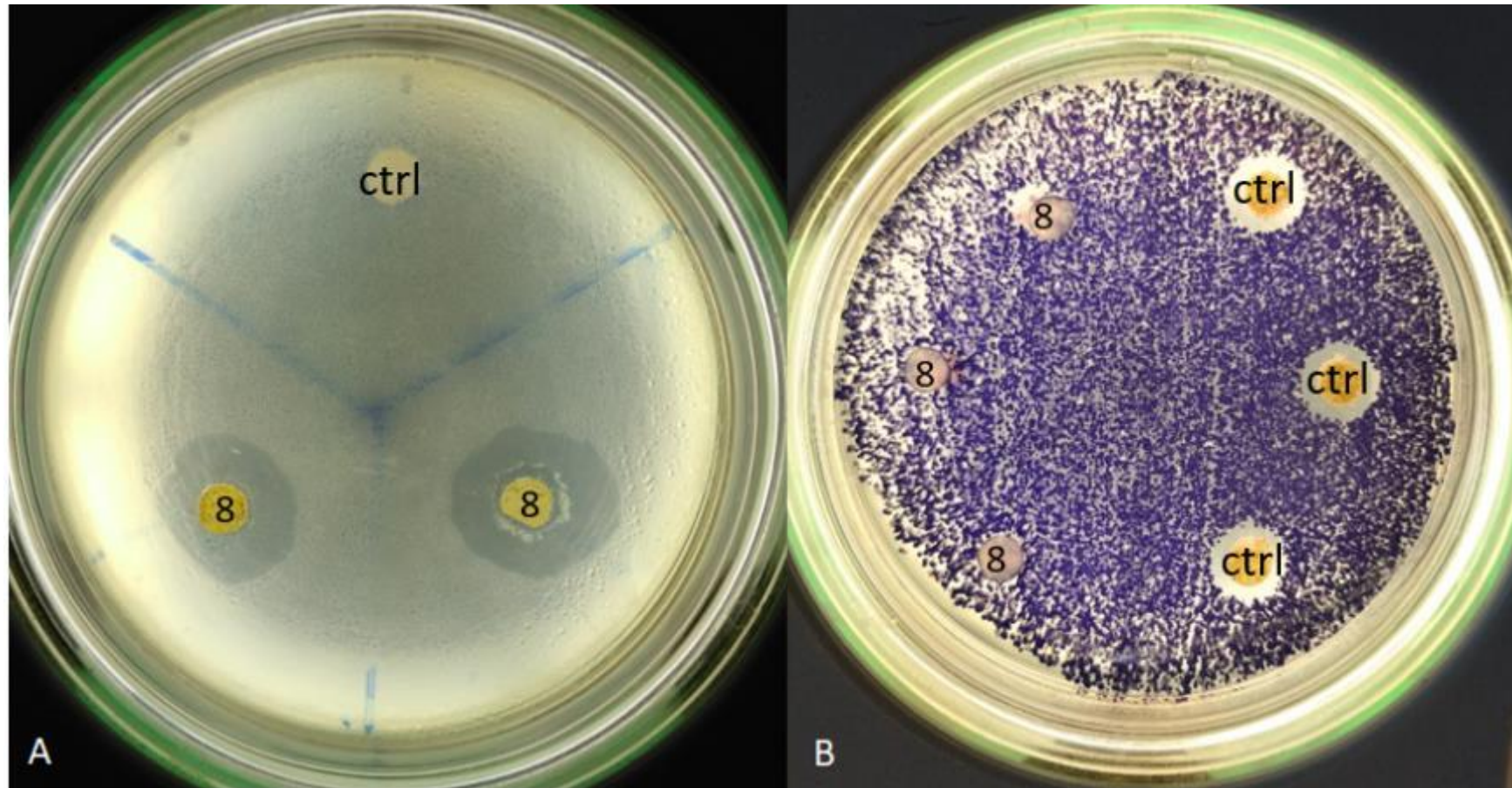


A) *Bacillus sp.* B) *Enterococcus faecalis* C) *C. violaceum* CV026 d) *C. violaceum* CV026.

*Actividad *E. faecalis*, *Bacillus sp.* y *C. violaceum* CV026: Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos bioactivos²³ son de naturaleza polar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana de las Fracciones (F1-F32)



Efecto de la F8 en el desarrollo de A) *Bacillus sp.* (inhibición 18 ± 0 mm) y B) *C. violaceum* CV026 inhibición 8 ± 0 mm.

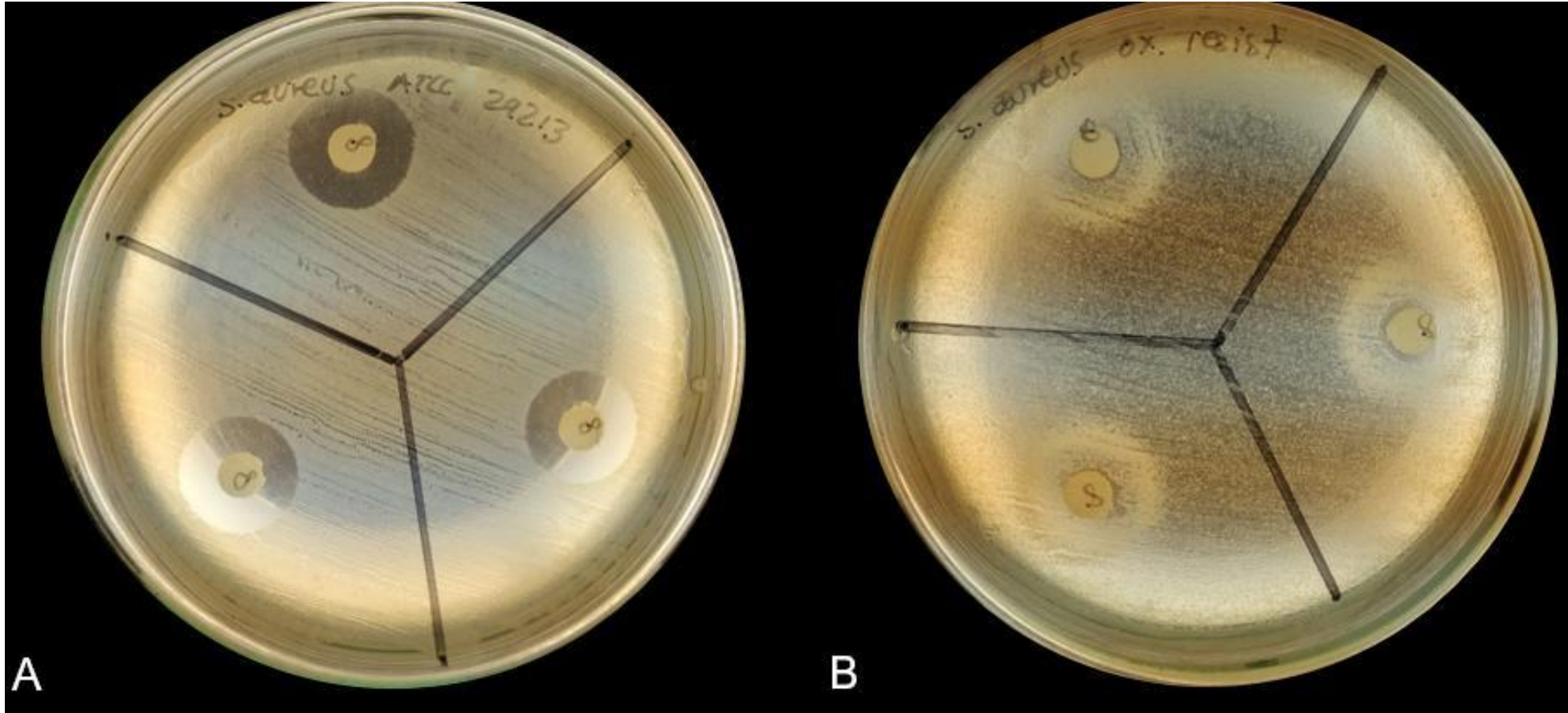
RESULTADOS

Actividad antimicrobiana contra microorganismos de importancia clínica

Grupo	Bacteria representativa	Halo (mm)	
		F8 mm	Km*
Cocos Gram-positivo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	18	19
	<i>Staphylococcus aureus</i> Ox ^R	18 (Het)	19
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	25
Enterobacteria No encapsulada	<i>Escherichia coli</i> ATCC 15597	0	20
	<i>Escherichia coli</i> BLEE +	0	20
	<i>Escherichia coli</i> BLEE -	0	20
Enterobacteria encapsulada	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 22895	0	20
No enterobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 30298	0	22

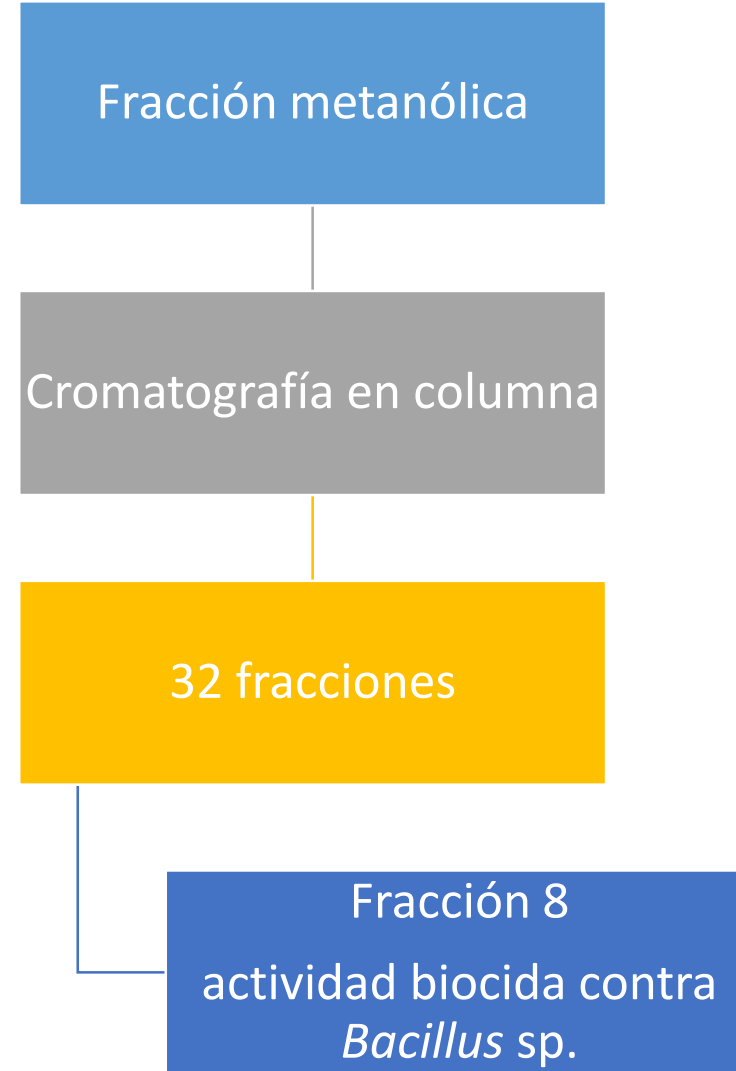
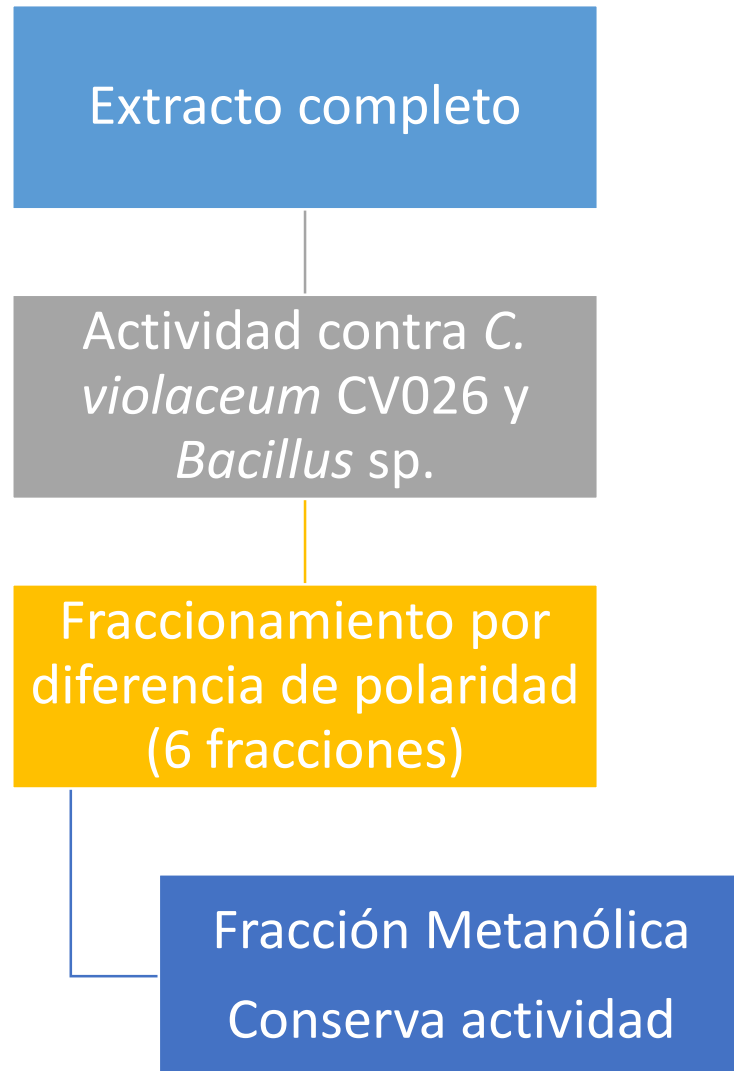
RESULTADOS

Efecto inhibitorio de la fracción 8



A) *S. aureus* ATCC 29213 y B) *S. aureus* oxacilina resistente (susceptibilidad heterogénea).

RESULTADOS



RESULTADOS

Análisis y caracterización de la F8

El análisis del cromatograma reveló la presencia de 16 picos, de los cuales 13 picos (81.25 %) corresponden a ácidos orgánicos, 2 (12.5 %) no fueron identificados en la biblioteca NIST y 1 (6.25 %) identificado como glicerol

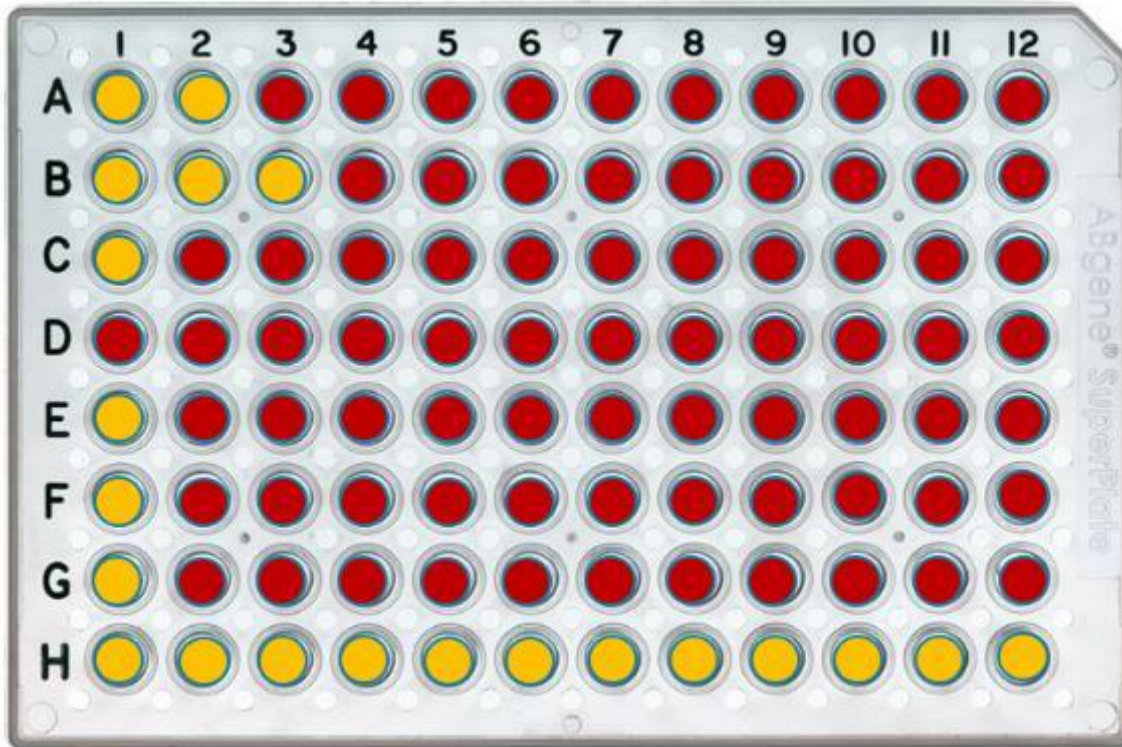
T.R	Área	AR %	Compuesto
12.47	182229996	3.18	Ácido Láctico
12.89	49836550	0.87	Ácido hidroxiaacético
18.86	2194509791	38.33	Glicerol
19.39	32683803	0.57	Ácido Maleico
19.64	344369982	6.02	Ácido Succínico
20.29	53985329	0.94	Ácido Glicérico
20.49	14528588	0.25	Ácido Fumárico
20.95	20439199	0.36	NI

T.R	Área	AR %	Compuesto
22.93	72596375	1.27	Ácido 3,4-Dihidroxi butanoico
24.32	55911259	0.98	Ácido Málico
27.25	88872730	1.55	Ácido p-Hidroxi benzoico
30.38	1158551128	20.24	Ácido Vanílico
30.81	101690192	1.78	Ácido p-Cumárico isómero 1
30.99	16801180	0.29	Ácido Azelaico
32.45	29039520	0.51	NI
33.86	1309135295	22.87	Ácido p-Cumárico isómero 2

Ácido p-cumárico en 24.65 % y el ácido vanílico en 20.24 %

RESULTADOS

Efecto antibacteriano del ácido p-cumárico y ácido vanílico



Las filas con medio MH se inocularon con:

A) *P. aeruginosa*,

B) *S. aureus*,

C) *E. coli*,

D) *P. mirabilis*,

E) *S. epidermidis*,

F) *C. freundii*,

G) *K. pneumoniae*,

H) Control negativo, medio MH.

En cada columna la concentración de ácido p-cumárico 1) 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2) 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 3) 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4) 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5) 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6) 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7) 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 8) 7.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 9) 3.90 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10) 1.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 11) 0.97 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12) 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **El pozo en color rojo indica actividad bacteriana mediante la reducción del cloruro de tetrazolio.**

RESULTADOS

La CMI para los ácidos orgánicos se determinó mediante diluciones 1:2. Los resultados mostraron que el ácido p-cumárico posee actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 29213 a una CMI de 250 µg/mL.

En general se ha demostrado que el ácido p-cumárico ejerce actividad antibacteriana incrementando significativamente la permeabilidad de la membrana externa y la membrana plasmática [5]. Así mismo, se ha sugerido que se une al ADN genómico bacteriano para inhibir las funciones celulares

En lo que respecta al ácido vanílico se determinó que las concentraciones utilizadas no inhibieron el desarrollo de los microorganismos Gram positivos evaluados, sugiriendo que la CMI es superior a 1000 µg/mL.

RESULTADOS

Actividad tóxica contra *A. salina*

Extracto completo	Fracción metanólica	[F 8]	Mortalidad (%).
750 ppm	375 ppm	25 ppm	0
1500 ppm	750 ppm	50 ppm	0
3000 ppm	1500 ppm	100 ppm	0
7500 ppm	3750 ppm	250 ppm	0
15000 ppm	7500 ppm	500 ppm	0
30000 ppm	15000 ppm	1000 ppm	0
		CRTL sol'n salina	0
		CRTL sol'n salina + solvente	0

RESULTADOS

Respecto a la toxicidad del ácido p-cumárico, se ha reportado una dosis letal 50 (LD₅₀) de 2850 y 1160 mg/kg por vía oral e intraperitoneal, respectivamente, causando somnolencia y depresión respiratoria en modelos murinos.

En la prueba de toxicidad aguda mediante la prueba de *A. salina* no se puede establecer una curva de dosis respuesta debido a que hasta las concentraciones usadas no se observa mortalidad de los especímenes de prueba durante el tiempo evaluado.

CONCLUSIONES

El extracto completo y fracción metanólica de *Costus pulverulentus* mostró actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Bacillus sp.* y *C. violaceum* CV026.

La fracción número 8 mantiene actividad, contra *Bacillus sp.* y *S. aureus* ATCC 29213 y Ox resistente en concentraciones de 30 µg/disco.

los metabolitos mayoritarios de la fracción 8 los son ácido vanílico y ácido p-coumárico.

El extracto etanólico y las fracciones obtenidas a partir *C. pulverulentus* no mostraron actividad anti-QS sobre *C. violaceum* CV026 a concentraciones de 10 y 30 µg/disco,

CONCLUSIONES

La prueba de microdilución en placa muestra que el compuesto con mayor actividad es el ácido p-coumárico sobre *S. aureus* ATCC 29213 a una concentración de 250 mg/L.

La evidencia nos permite sugerir la ausencia de toxicidad aguda del extracto completo y las fracciones evaluadas en la prueba de estandarizada con *A. salina*, sin embargo, es necesario complementarlos con los ensayos de citotoxicidad.

REFERENCIAS

Alonso-Castro, A. J., Dominguez, F., Morales, J., y Carranza-Alvarez, C. (2015). Plants used in the traditional medicine of Mesoamerica (Mexico and Central America) and the Caribbean for the treatment of obesity. *Journal of ethnopharmacology*. 175. 10.1016/j.jep.2015.09.029.

Kozyra, M., Komsta, Ł., y Wojtanowski, K. (2019). Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of methanolic extracts from inflorescences of *Carduus* sp. *Phytochemistry letters*, 31, 256-262.

Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., y Li, J. (2012). p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food control*, 25(2), 550-554.

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud

OMS. (2016). Resistencia a los antimicrobianos. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>

OMS. (2017). ¿Qué es la resistencia a los antimicrobianos? Preguntas y respuestas en línea. Obtenido de Organización mundial de la salud: <https://www.who.int/features/qa/75/es/>



ECORFAN®

© ECORFAN-Mexico, S.C.

No part of this document covered by the Federal Copyright Law may be reproduced, transmitted or used in any form or medium, whether graphic, electronic or mechanical, including but not limited to the following: Citations in articles and comments Bibliographical, compilation of radio or electronic journalistic data. For the effects of articles 13, 162,163 fraction I, 164 fraction I, 168, 169,209 fraction III and other relative of the Federal Law of Copyright. Violations: Be forced to prosecute under Mexican copyright law. The use of general descriptive names, registered names, trademarks, in this publication do not imply, uniformly in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protector in laws and regulations of Mexico and therefore free for General use of the international scientific community. BECORFAN is part of the media of ECORFAN-Mexico, S.C., E: 94-443.F: 008- (www.ecorfan.org/ booklets)