

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA DE FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES  
ANTIMICROBIANAS DE LOS EXTRACTOS DE CORTEZA  
Y DE LAS HOJAS DE *BYRSONIMA CRASSIFOLIA* (NANCE)  
FRENTE A BACTERIAS GRAM POSITIVO Y GRAM  
NEGATIVO Y VALORACIÓN DE SU POSIBLE ACTIVIDAD  
ANTIFÚNGICA FRENTE A *CANDIDA ALBICANS***

**MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL  
GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

**FABIOLA ELIZONDO VALVERDE**

**HILARY MARIN OTAROLA**

**TUTOR**

**ADAM AMEY WILLIAMS**

**SAN JOSÉ, COSTA RICA, MARZO, 2020**

## **Agradecimientos**

A Dios por cuidar mis pasos, darme salud y valentía en momentos difíciles. Por ayudarme en cada uno de los obstáculos a lo largo de la carrera, por siempre darme fe y coraje cuando lo necesitaba.

El agradecimiento más profundo a mis padres y hermano por darme su apoyo incondicional, por confiar y creer en mí cada día. Por su esfuerzo para poder cumplir mis metas, por cada consejo y cada palabra de motivación que me impulsaron a seguir adelante y por nunca dejar que me diera por vencida. Son mi ejemplo a seguir.

A mis abuelas Teresa y Felicia, por sus oraciones y paciencia en toda la carrera, sus conocimientos y su amor, me enseñan a ser una mejor persona. A mis tíos y tías por siempre brindarme palabras de aliento y su disponibilidad cuando los necesitaba.

Mis agradecimientos a mis compañeros y amigos Dylan, Keyner y Sergio por siempre estar cuando los necesitaba, por las largas horas de estudio, por sus consejos, por disfrutar juntos lindos momentos. Gracias porque en los tiempos más duros de la universidad, ustedes estuvieron siempre a mi lado. Que los buenos amigos, las bromas y las risas nunca se acaben.

A mis amigas desde el primer cuatrimestre María José, Natalia y Jennifer por darme las mejores experiencias y demostrarme el valor de la amistad.

A mi compañera de tesis Hilary, por siempre apoyarme en cada ocurrencia, siempre estar dispuesta a dar lo mejor de sí y darme tranquilidad con su palabra.

Al Dr. Roldan Ajun por su apoyo, conocimiento, tiempo y consejos para ejecutar esta investigación.

A nuestro tutor de tesis Adam Amey W. por el apoyo brindado, cada recomendación, y la orientación durante el desarrollo de la tesis. Gracias por ser un excelente profesor y motivarnos a lograr nuestras metas.

A Davis y Yendry, que nos brindaron en el laboratorio dándonos toda su ayuda y conocimiento para la realización de este trabajo.

*Fabiola Elizondo Valverde*

## **Agradecimientos**

Quiero dar gracias a Dios en primer lugar por permitirme terminar mi carrera, por darme salud y fuerza en los momentos más difíciles, porque sin él no somos nada.

Agradecer a las personas más valiosas de mi vida, mis padres que sin ellos no podría haber cumplido mis sueños, ellos siempre creyeron en mí y me alentaron a nunca darme por vencida en mis peores batallas, por su amor, paciencia y jamás abandonarme, sin ellos no sería nadie.

A toda mi familia, porque de alguna forma siempre me apoyaron en esta etapa de mi vida, con palabras de motivación, a seguir a pesar de todo nunca dejaron si quiera pensar en renunciar a este camino, a mi sueño.

Davis y Yendry que más que realizar un trabajo en laboratorio, se convirtieron en amigos, gracias por toda su ayuda, por siempre estar ahí para nosotras, y ayudarnos con una sonrisa y en todo lo que les fuera posible, de verdad sin ustedes esto tampoco sería posible.

A nuestro tutor el Lic. Adam Amey porque sin su ayuda esta investigación jamás hubiera sido posible, por compartir todo su conocimiento y siempre recibimos de una manera inmejorable, gracias por ser el mejor tutor, profesor y persona que pudimos conocer.

Al Dr. Roldan Ajum, por su inigualable ayuda, disponibilidad y paciencia para con nosotras al momento de realizar todas las pruebas microbiológicas, por siempre velar que todo se diera de la mejor manera, porque con su aporte permitió el avance de la tesis.

A mi compañera de tesis, Fabiola Elizondo, por ser mi amiga incondicional, por aguantarme todo este tiempo, por siempre apoyarme y nunca juzgarme, fue un gusto y placer compartir con usted un momento tan importante, nuestra tesis.

A mis compañeros de la Universidad, por siempre estar ahí para mí, porque sin importar el momento ni el motivo me apoyaron en toda situación. Siempre serán parte importante de mi vida universitaria, sin ustedes esta etapa no hubiera sido la misma.

*Hilary Marín Otárola*

### **Dedicatoria**

Este trabajo de graduación es dedicado a Dios por siempre estar a mi lado en cada paso, guiarme con valentía y nunca abandonarme.

A mis padres por brindarme su apoyo incondicional y demostrarme que con esfuerzo, dedicación y perseverancia cada meta propuesta, es alcanzable. Ustedes son los responsables de que este sueño se haga realidad, han estado presentes en todo el camino y siempre están pendientes de mí.

A mis abuelas que han esperado con mucho cariño verme como una profesional, que me dieron tanto amor y que siempre con sus palabras me enseñan a creer en misma.

*Fabiola Elizondo Valverde*

### **Dedicatoria**

Esta investigación se lo quiero dedicar a las personas más incondicionales de mi vida, a los que siempre estuvieron presentes en el transcurso de este sueño.

A mis padres, a ellos les debo todo, les debo mi vida entera, sin su apoyo inigualable nada de esto sería real.

A mi madre Maricela que sin importar el cansancio o la situación nunca me dejó sola, por más difícil que fuera el camino, siempre me apoyo y consoló en mis peores momentos, sin su ayuda jamás hubiera logrado nada de esto. Gracias mami por todo.

*Hilary Marín Otárola*

## Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	22
Planteamiento del Problema .....	22
Objetivos.....	25
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos .....	26
Justificación .....	26
Antecedentes.....	28
Histórico .....	28
Internacionales .....	30
Nacionales.....	31
Proyecciones .....	32
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	32
Bacterias .....	32
Bacterias gram positivas .....	33
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
Bacterias gram negativas .....	38
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	38
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	41
<i>Escherichia coli</i> .....	44
Hongos .....	46
Generalidades .....	46
<i>Candida albicans</i> .....	47
Tipos de Candidiasis.....	50
Resistencia Bacteriana .....	51

	11
Características .....	51
Alternativas Farmacéuticas .....	55
Medicamentos de Amplio Espectro .....	56
Microbiología .....	58
Cultivo Microbiano .....	59
Agar Metodo Estándar .....	59
Prueba de Sensibilidad .....	60
Concentración Mínima Inhibitoria .....	60
Método de Macrodilución .....	61
Método del Epsilon test .....	61
Plantas Medicinales .....	62
Byrsonima crassifolia (Nance) .....	62
Hojas .....	63
Corteza .....	64
Extracción .....	65
Maceración .....	67
Destilación a Presión Reducida (Rotavapor) .....	67
Liofilización .....	68
Técnicas de Identificación y Cuantificación de Fitoquímicos .....	69
Métodos Químicos .....	69
Tamizaje fitoquímico .....	69
Prueba de Sólidos Totales .....	71
Secado en estufa .....	71
Método de Identificación de Espectroscopia Infrarroja .....	72
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....	73
Enfoque .....	73

	12
Diseño .....	74
Variables .....	75
Proceso de Recolección de la Planta.....	76
Corteza.....	77
Materiales y Técnicas .....	78
Método de Extracción por Maceración de Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance) .....	80
Extracto acuoso corteza .....	81
Método de Extracción Por Maceración de Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance) .....	83
Extracto acuoso hojas .....	84
Extracto etanólico hojas.....	85
Método de Destilación a Presión Reducida (Rotavapor).....	86
Extracto acuoso hojas .....	87
Extracto etanólico hojas.....	87
Extracto acuoso corteza .....	88
Extracto etanólico corteza.....	89
Pruebas Físico-Químicas de los Extractos.....	90
Prueba Alcaloides .....	90
Prueba Flavonoides.....	90
Prueba Taninos .....	91
Prueba de almidón (Lugol) .....	91
Prueba para saponinas (Espuma) .....	91
Prueba de Sólidos Totales.....	92
Prueba de Sólidos Totales (Polvo Liofilizado).....	92

Pruebas Antimicrobianas y Antifúngicas de los Extractos Etanólicos y Acuosos de las

Hojas y de las Corteza Frente a las Bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y Contra el Hongo de <i>Candida albicans</i> .	92
Reactivos y Equipo Para Realizar las Pruebas Microbiológicas .....	93
Equipo.....	93
Reactivos.....	93
Cultivos de las Distintas Cepas de las Bacterias, Así Como del Hongo.....	94
Prueba de Aumento al Doble, Cuádruple y Séxtuple de la Concentración Original del Extracto Acuoso Corteza Para la Evaluación de su Posible Actividad Antimicrobiana Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> y Contra el Hongo de <i>Candida albicans</i> .....	95
Prueba de Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (nance) Empleando el Método del Epsilon test Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Candida albicans</i> .....	96
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	97
Recolección de la Muestra de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> .	97
Extracción del Material Vegetal .....	98
Extracto acuoso de la corteza.....	98
Extracto acuoso de las hojas .....	99
Extracto etanólico de la corteza .....	99
Extracto etanólico de las hojas.....	99
Pruebas de Caracterización del Extracto.....	101
Pruebas Fisicoquímicas.....	101
Identificación de Alcaloides. ....	102
Identificación de Flavonoides.....	105
Identificación de Taninos.....	109
Identificación de Saponinas .....	114

	14
Identificación de Almidón .....	117
Prueba de Sólidos Totales.....	121
Caracterización Espectroscópica Infrarrojo.....	123
Caracterización Espectroscópica de los Extractos Etanólicos de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (nance).....	123
Caracterización Espectroscópica de los Extractos Acuosas de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (nance).....	125
Prueba de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance) Mediante Pruebas In Vitro Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Candida albicans</i> por Medio de Difusión Agar .....	128
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	128
<i>Escherichia coli</i> .....	130
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	132
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	133
<i>Candida albicans</i> .....	135
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Acuoso de la Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> Concentrado al Doble, Cuádruple y Séxtuple Respecto a la Muestra Original Mediante Pruebas In Vitro, Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Candida albicans</i> Por Medio de Difusión Agar .....	137
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	138
<i>Escherichia coli</i> .....	139
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	140
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	141
<i>Candida albicans</i> .....	143
Prueba de Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i>	

	15
(Nance) Mediante el Método del Epsilon Test Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Candida albicans</i> .....	145
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	146
<i>Escherichia coli</i> .....	148
<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	149
<i>Candida albicans</i> .....	150
Determinación de la Actividad de Amplio Espectro de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance) .....	153
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	154
Conclusiones.....	154
Recomendaciones .....	156
BIBLIOGRAFÍA .....	157

## Contenido de Tablas

<b>Tabla 1. Clasificación Taxonómica de Staphylococcus aureus.....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 2. Clasificación Taxonómica de Klebsiella pneumoniae.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 3. Clasificación Taxonómica de Pseudomona aeruginosa.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 4. Clasificación Taxonómica de Escherichia coli .....</b>	<b>45</b>
<b>Tabla 5. Clasificación Taxonómica de Candida albicans.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 6. Resumen de la Información de los Extractos Etanólicos y Acuoso de Byrsonima crassifolia (Nance).....</b>	<b>100</b>
<b>Tabla 7. Resumen de Resultados de la Pruebas Físicoquímicos realizadas a los Extractos Etanólicos y Acuoso de Byrsonima crassifolia (Nance).....</b>	<b>101</b>
<b>Tabla 8. Información Obtenida para el Cálculo de Sólidos Totales en la Prueba Realizada a los Extractos Etanólico y Acuoso de Byrsonima crassifolia (Nance)</b>	<b>123</b>
<b>Tabla 9. Caracterización Espectroscópica de los Extractos Acuoso Para la Corteza y de las Hojas de Byrsonima crassifolia (Nance).....</b>	<b>125</b>
<b>Tabla 10. Caracterización Espectroscópica de los Extractos Acuoso Para Tanto Corteza y de las Hojas de Byrsonima crassifolia (Nance).....</b>	<b>127</b>
<b>Tabla 11. Datos de la Medición de los Halos de Inhibición de las Bacterias Utilizadas Para la Investigación .....</b>	<b>135</b>
<b>Tabla 12. Datos del Halo de Inhibición del Hongo Candida albicans Utilizado Para la Investigación. ....</b>	<b>137</b>
<b>Tabla 13. Datos de la Medición de los Halos de Inhibición de las Bacterias Utilizadas Para la Investigación con los Extractos Más Concentrados del Extracto Acuoso de la Corteza .....</b>	<b>143</b>
<b>Tabla 14. Clasificación de la Sensibilidad de Acuerdo al Halo de Inhibición de Cada Bacteria con Respecto al Antibiótico Utilizado (Levofloxacino).....</b>	<b>143</b>
<b>Tabla 15. Datos de la Medición del Halo de Inhibición del Hongo Candida albicans Utilizado Para la Investigación con el Extracto Acuoso de la Corteza más Concentrada .....</b>	<b>145</b>
<b>Tabla 16. Clasificación de la Sensibilidad de Acuerdo al Halo de Inhibición del Hongo con Respecto al Antimicótico Utilizado (Fluconazol).....</b>	<b>145</b>

**Tabla 17. Concentraciones Utilizadas de Cada Extracto Para Realizar la Prueba de Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa, Escherichia coli y el hongo Candida albicans..... 152**

**Tabla 18. Resumen de la Concentración Mínima Inhibitorio de Cada Extracto Analizado Frente a Cada Microorganismo y Hongo Estudiado ..... 152**

Contenido de Figuras

<b>Figura 1. Microorganismo Staphylococcus aureus.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 2. Microorganismo Klebsiella pneumoniae.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 3. Microorganismo Pseudomona aeruginosa .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 4. Microorganismo Escherichia coli .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 5. Hongo Candida albicans.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 6. Equipo de Destilación a Presión Reducida Mediante el Rotavapor ..</b>	<b>68</b>
<b>Figura 7. Estufa.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 8. Muestra de Hojas de Byrsonima crassifolia .....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 9. Muestra de Corteza de Byrsonima crassifolia.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 10. Trozos de Corteza de Byrsonima crassifolia.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 11. Extracto Acuoso de Corteza de Byrsonima crassifolia Después de 3 Días de Reposo .....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 12. Extracto Etanólico de Corteza de Byrsonima crassifolia Después de 7 Días de Reposo .....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 13. Trozos de Hojas de Byrsonima crassifolia .....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 14. Extracto Acuoso de Hojas de Byrsonima crassifolia Después de 3 Días de Reposo.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 15. Extracto Etanólico de Hojas de Byrsonima crassifolia Después de 7 Días de Reposo .....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 16. Equipo de Destilación a Presión Reducida Mediante el Rotavapor.</b>	<b>86</b>
<b>Figura 17. Extracto Acuoso de Hojas de Byrsonima crassifolia Reposado Por un Mes. ....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 18. Extracto Etanólico de Hojas de Byrsonima crassifolia Reposado Por un Mes.....</b>	<b>88</b>

<b>Figura 19. Extracto Acuoso de Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> Luego del Liofilizado.....</b>	<b>89</b>
<b>Figura 20. Extracto Etanólico de Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> Reposado Por un Mes .....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 21. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Etanólico de la Corteza.....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 22. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Etanólico de las Hojas .....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 23. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Acuoso de la Corteza.....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 24. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Acuoso de las Hojas .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 25. Prueba para la Identificación de Flavonoides del Extracto Etanólico de la Corteza.....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 26. Prueba para la Identificación de Flavonoides del Extracto Etanólico de las Hojas.....</b>	<b>107</b>
<b>Figura 27. Prueba Para la Identificación de Flavonoides del Extracto Acuoso de la Corteza.....</b>	<b>108</b>
<b>Figura 28. Prueba Para la Identificación de Flavonoides del Extracto Acuoso de las Hojas .....</b>	<b>109</b>
<b>Figura 29. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Etanólico de la Corteza.....</b>	<b>110</b>
<b>Figura 30. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Etanólico de las Hojas .....</b>	<b>111</b>
<b>Figura 31. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Acuoso de la Corteza.....</b>	<b>112</b>
<b>Figura 32. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Acuoso de las Hojas .....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 33. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Etanólico de la Corteza.....</b>	<b>114</b>

<b>Figura 34. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Etanólico de las Hojas .....</b>	<b>115</b>
<b>Figura 35. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Acuoso de la Corteza.....</b>	<b>116</b>
<b>Figura 36. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Acuoso de las Hojas .....</b>	<b>117</b>
<b>Figura 37. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Etanólico de la Corteza.....</b>	<b>118</b>
<b>Figura 38. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Etanólico de las Hojas .....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 39. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Acuoso de la Corteza.....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 40. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Acuoso de las Hojas .....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 41. Muestras Resultante de la Prueba de Sólidos Totales de los Extractos Etanólicos y Acuosos de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance) .....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 42. Espectro Infrarrojo del Extracto Etanólico de la Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>124</b>
<b>Figura 43. Espectro Infrarrojo del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>125</b>
<b>Figura 44. Espectro Infrarrojo del Extracto Acuoso de la Corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>126</b>
<b>Figura 45. Espectro Infrarrojo del Extracto Acuoso de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>127</b>
<b>Figura 46. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>S.aureus</i> Frente a Extracciones Etanólicas y Acuosas de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance)..</b>	<b>130</b>
<b>Figura 47. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>E.coli</i> Frente a las Extracciones Etanólicas y Acuosas de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>132</b>

<b>Figura 48. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>P. aeruginosa</i> de las Extracciones Etanólicas y Acuosa de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 49. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>K.pneumoniae</i> Frente a Extracciones Etanólicas y Acuosa de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 50. Prueba de Sensibilidad Antifúngica de <i>C.albicans</i> Frente a Extracciones Etanólicas y Acuosa de la Corteza y de las Hojas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>136</b>
<b>Figura 51. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>S. aureus</i> Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).</b>	<b>139</b>
<b>Figura 52. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>E. coli</i> Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>140</b>
<b>Figura 53. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>P. aeruginosa</i> Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance)</b>	<b>141</b>
<b>Figura 54. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>K. pneumoniae</i> Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance)</b>	<b>142</b>
<b>Figura 55. Prueba de Sensibilidad Antifúngica de <i>Candida albicans</i> Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance)</b>	<b>144</b>
<b>Figura 56. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>S. aureus</i> Frente a los Cuatro Extractos Acuosa y Etanólicas de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>147</b>
<b>Figura 57. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>E.coli</i> Frente al Extracto Acuosa de la Corteza, Etanólico de la Corteza y de las Hojas <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>149</b>
<b>Figura 58. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>P. aeruginosa</i> Frente al Extracto Acuosa de la Corteza, Etanólico de la Corteza y de las Hojas <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance) .....</b>	<b>150</b>
<b>Figura 59. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de <i>C. albicans</i> Frente al Extracto Acuosa de la Corteza, Etanólico de la Corteza y de las Hojas <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance).....</b>	<b>151</b>

## Resumen

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos de corteza y hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance) frente a bacterias gram positivo: *Staphylococcus aureus* y gram negativo: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* y frente al hongo: *Candida albicans*, para de esta manera establecer una alternativa natural para tratar las enfermedades que estos microorganismos generan, además de las complicaciones que ocasione el hongo en la actualidad.

Para desarrollar la investigación, se efectuaron todos los procedimientos de extracción en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, además de la correspondiente caracterización fisicoquímica y espectroscópica. En lo que concierne a las pruebas microbiológicas, se llevaron a cabo en el Laboratorio Microlabs, ubicado en Guadalupe.

En la obtención el extracto de *Byrsonima crassifolia*, se utilizó dos disolventes distintos, etanol al 95% y agua y se efectuó por medio del método de maceración. En el caso del extracto etanólico de corteza y hojas, se tomó la muestra y se cortó en trozos más pequeños, posteriormente se adicionó el solvente correspondiente y se dejó reposar por 7 días. Con respecto al extracto acuoso de corteza y hojas, se le añadió agua como disolvente y de igual manera se dejó reposar por 3 días.

Seguidamente para las muestras obtenidas por ambos solventes, se procedió a colocarlas en un equipo de destilación a presión reducida mediante el rotavapor, para eliminar la mayor cantidad de los solventes. El extracto resultante a acuoso de la corteza, se liofilizó para obtener un extracto totalmente seco y así poder evidenciar sus posibles diferencias, entre los extractos líquidos y el sólido.

En lo referido a la caracterización fitoquímica de corteza y hojas, se demuestra la presencia de: Flavonoides, Alcaloides, Saponinas y Taninos. De igual manera se realizaron pruebas espectroscópicas, en las cuales se manifestó señales propias de dichos metabolitos. Además, se comprobó mediante pruebas de difusión agar, que los extractos etanólicos son los que presentan mayor actividad tanto antibacteriana como antifúngica, sin embargo, al aumentar la concentración del extracto acuoso corteza, se observó un efecto inhibitorio superior por parte de este.

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **Planteamiento del Problema**

Las plantas presentan distintos principios activos que son los responsables de provocar los efectos antimicrobianos que se les atribuyen, donde la mayoría son utilizados desde el punto de vista farmacológico. Esto debido a que los que presentan este tipo de actividad son utilizados para elaborar nuevas formas farmacéuticas, con el fin de dar el tratamiento ante diferentes patologías. Hoy en la actualidad, se ha visto que los problemas de salud se han incrementado por la resistencia que presentan las bacterias frente a los antibióticos que son usados para tratarlas, esta problemática ha creado la necesidad de utilizar las plantas que presenten alguna actividad antimicrobiológica y así poder combatir este tipo de bacterias. (Pastor, 2014)

Como se ha mencionado, la resistencia bacteriana se encuentra en constante evolución, y se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. Es común que se mencione la resistencia hacia los antibióticos y que esta se desarrolle debido a nuevos mecanismos. Este tipo de resistencia se da tanto en bacterias catalogadas como gram negativas así como también las clasificadas gram positivas sin distinción, y como se ha mencionado, se conocen consecuencias graves en la salud de la población que puede llegar a presentarla, debido a que el nivel de respuesta a los antibióticos se ve seriamente disminuida y compromete las posibilidades de cura, además de incrementar los costos del tratamiento. (Cruz, 2015)

Según Serra 2017, la utilización de antibióticos de gran escala en hospitales, puede ser una causa importante de la resistencia microbiana que se ha desarrollado. Este tipo de situación se da por medio de la creación de mecanismos de resistencia que desarrollan ciertas cepas, que inclusive pueden disminuir drásticamente las opciones de tratamiento o peor aún dejar sin alternativas para poder contrarrestarlas. Esto conlleva a que las enfermedades se prolonguen al no contar con un tratamiento eficaz, y puede desarrollar un aumento de la mortalidad causada por los microorganismos respectivos.

La llamada resistencia adquirida, la cual ocurre en una bacteria inicialmente sensible a los antibióticos, por cambios, mutaciones o la adquisición de genes de resistencia durante

el fenómeno de transferencia genética lateral. El proceso por el cual un organismo transfiere material genético a otra célula, no es descendiente, por la resistencia bacteriana adquirida a los antibióticos puede ser de distintos tipos, dependiendo de la presión selectiva, las mutaciones o la transferencia de genes de resistencia. (Cruz, 2015, p. 1)

La Organización Mundial de la Salud [OMS], en un comunicado de prensa publicado en el 2018, indica los primeros datos publicados sobre la vigilancia de la resistencia hacia los antibióticos, que los niveles de resistencia a algunas infecciones bacterianas graves son elevados tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos. También establece que las bacterias resistentes más frecuentes son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp.* (parr. 1-3)

En el caso de *Staphylococcus aureus*, se le considera un microorganismo causante de infecciones que se adquieren tanto en un hospital así como en una comunidad. Se ha observado que afecta mayormente a niños y jóvenes, pero también afecta a las personas que viven bajo condiciones de higiene caótica, o en hacinamiento. Este microorganismo se presenta principalmente con una infección en la piel y de igual manera aparece en las partes blandas del cuerpo. (Alemañy et al, 2017)

*Pseudomona aeruginosa*, es responsable de infecciones múltiples, pero principalmente nosocomiales, ya que está presente en pacientes que tienen alguna otra complicación médica, como inmunosupresos, quemaduras severas o neutropenia inducida por quimioterapia. Este microorganismo presenta diversos métodos para adquirir resistencia a los mecanismos, una de ellas es por medio de mutaciones. Otro aspecto importante por tomar en cuenta con este patógeno es que de forma intrínseca es resistente a varios antibióticos que estructuralmente son distintos entre sí, esto debido a características propiamente de la bacteria que ocasiona que el antibiótico no alcance el efecto esperado. (Luján, 2014, p.466)

Según Cruz, González, Moreno, Nieves, Puig y Solórzano (2013), en el caso de *Klebsiella pneumoniae*, se le cataloga como una bacteria gram negativa, la cual es de importancia médica ya que es asociada con enfermedades nosocomiales. Principalmente

tiene prevalencia en pacientes inmunosupresos o en aquellos que llevan un periodo extenso en el área de internamiento de un hospital, además, se ha observado que afecta en gran medida al área pediátrica y de cirugía. Lo anterior ocasiona que los niveles de mortalidad aumenten considerablemente, y por consiguiente, los costos de salud incrementarán en forma paulatina conforme avance esta problemática.

Igualmente, la *Escherichia coli* es una bacteria catalogada como gram negativa, muy comúnmente conocida por ocasionar infecciones a nivel del tracto urinario e incluso, puede llegar a producir diarrea. Con respecto a este microorganismo se ha detectado que ha ido incrementando su resistencia rápidamente, lo que provoca que su tratamiento se complique al no ser completamente eficaz para combatirlo. Esto disminuye el nivel de respuesta en el momento de escoger el tratamiento adecuado para tratar esta patología. (Mata, 2017, pp.3-4)

Otro aspecto por considerar, son las infecciones que son causadas por hongos conocidas como micosis, estas afectan a cualquier tipo de persona sin importar el sexo, edad, o alguna otra condición, ya que pueden producir cuadros que van desde leves hasta severos y en algunos casos pueden provocar la muerte. Se debe tener en cuenta que estas enfermedades se tienen que tratar con una relevancia importante al igual que otras patologías, como en el caso de infecciones ocasionadas por bacterias o parásitos. Además, se ha evidenciado que mayoritariamente este tipo de micosis es producida por la especie *Candida* con un 80% de todas las enfermedades. (Arias, Dzul, López, Lugo, & Zavala, 2016)

Estas infecciones se han complicado al no responder a los tratamientos a los cuales se someten los pacientes, lo anterior se ha visto aumentado de manera significativa. Esto puede tener relación con la resistencia que se ha atribuido a la *Candida spp.* Lo que podría ser una de las causas, es el uso continuo y no controlado de los medicamentos que se emplean para combatirlas. Aunque todavía este tipo de resistencia es poco conocida y no se tiene mucha información al respecto, se ha observado que esta se presenta principalmente ante varios agentes antifúngicos como los son azoles y polienos. (Arias et al, 2016).

Como ya se mencionó, la *Candida albicans* provoca grandes complicaciones en la salud, este tipo de hongo afecta más aún cuando el sistema inmune está comprometido, como es el caso de los pacientes que se encuentran en la unidad de cuidados intensivos, y en niños

y neonatos que están expuestos principalmente porque su sistema inmune no está totalmente desarrollado. Un aspecto importante es la relación que existe entre los pacientes que lo padecen y los que utilizan un catéter venoso central, generalmente estos últimos cuentan con una estancia prolongada en algún hospital que incrementa las cifras de padecimiento de este tipo de patologías. Sin embargo, también se puede diseminar la infección mediante la utilización de algunos dispositivos biomédicos, lo cual puede llegar a aumentar el riesgo de mortalidad. (Arias et al, 2016).

Debido a estas inquietudes con respecto al gran aumento en los casos de resistencia a los antibióticos por parte de muchos microorganismos y además de la actividad antimicrobiana presente en los distintos extractos de plantas, surge la interrogante de la investigación: ¿Presentan los extractos de las hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia* actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivo y gram negativo, así como actividad antifúngica frente a *Candida albicans*?

Además, tras investigar las propiedades tanto antimicrobianas como antifúngicas que están presentes en el Nance, surge la conjetura del tema: “Los extractos de corteza y de las hojas de *Byrsonima crassifolia* muestran actividad frente a bacterias gram negativo y gram positivo, además de su posible actividad antifúngica contra *Candida albicans* de modo que puedan considerarse de amplio espectro”

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos de corteza y de las hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance), frente a bacterias gram positivo y gram negativo y frente a *Candida albicans* para conocer la efectividad del extracto, por medio del método de difusión de agar.

### Objetivos específicos

- Verificar la capacidad antimicrobiana de los extractos de corteza y hojas del Nance frente a bacterias Gram negativa: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* y Gram positivo: *Staphylococcus aureus*, para la valoración de su actividad mediante el método difusión en agar.
- Determinar su actividad antifúngica frente al hongo de *Candida albicans* para la calificación de su sensibilidad, mediante prueba de agar.
- Estimar la actividad antibacteriana y antifúngica que presentan los extractos de hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance), para la categorización de amplio espectro.

## Justificación

Por mucho tiempo las plantas medicinales han sido una de las principales elecciones como recurso para la cura de diferentes patologías; sin embargo, no se ha profundizado en el conocimiento de especies vegetales que poseen distintas propiedades medicinales. Este tipo de búsqueda es de gran interés científico, ya que de esta manera, se pueden utilizar las plantas con propiedades curativas como base de la medicina tradicional, así como también para minimizar el gran aumento de procesos de resistencia de los microorganismos que son de mayor importancia médica, a fármacos que están disponibles en el mercado. (Laca, Pozo y Evaristo, 2013, pp.14-15).

A nivel mundial existen diferentes enfermedades causadas por bacterias, virus o parásitos, que complican la salud de la población, esto porque han causado un incremento

importante en las patologías infecciosas, con un posible aumento de los niveles de morbi-mortalidad. Esto se puede relacionar con la resistencia a los antibióticos, puesto que ha complicado el tratamiento efectivo de estas infecciones. Para contrarrestar este efecto negativo se ha visto elevado el uso de tratamientos alternativos para combatirlos y si fuera posible a su vez prevenirlas, una posibilidad que ha tomado fuerza es la utilización de plantas naturales para estas situaciones. (Delgado, et al, 2013, p.357)

Se ha observado que gran parte de las propiedades que posee la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance), se emplea con más frecuencia para el control de infecciones gastrointestinales y respiratorias; sin embargo, se han encontrado hasta 24 usos medicinales que desde la antigüedad se aprovechan como medicina tradicional ante situaciones donde su poder astringente es de gran utilidad. De igual manera, se han hallado beneficios sobre la estimulación del apetito, disentería y estomatitis. (Torres, Ortiz & Valdivia, 2012)

Como se mencionó, debido a los crecientes casos de resistencia que existen sobre los antibióticos y los antifúngicos, se han implementado diferentes análisis de las propiedades antimicrobianas que tienen estos extractos, ya que de esta manera se pueden visualizar alternativas para combatirlos. Como es el caso del estudio que se realizó a distintas partes de la planta de *Byrsonima crassifolia* y en distintos medios como etanol y acetona para el análisis, donde se muestra que diferentes microorganismos y hongos presentaron actividad antimicrobiana y antifúngica. (Lima & Morales, 2014)

Avilés en el 2015, estableció que, se ha evidenciado que los extractos obtenidos de distintas partes de la planta de *Byrsonima crassifolia*, además de presentar propiedades antimicrobianas, se le puede atribuir una posible actividad catalogada como antifúngica, esto porque ha manifestado un efecto contra algunos hongos, como es el caso de *Candida albicans*, el cual es un hongo que afecta comúnmente a la población y provoca candidiasis.

En este estudio se pretende brindar conocimiento sobre la posibilidad de utilizar extractos de plantas naturales para tratar patologías ocasionadas por diferentes microorganismos y el hongo de *Candida albicans*, a su vez aportar información de una posible actividad catalogada como de amplio espectro por parte de esta planta.

## Antecedentes

### Histórico

Según González y Mollinedo, en el artículo denominado “Bacterias Gram Negativas” en el 2014, declara que “El bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen en el 1844, desarrolló una técnica de coloración diferencial empleada en la microbiología para la observación de bacterias y la denominó Tinción Gram, cuya reacción es diferente según el microorganismo pues las bacterias consideradas Gram positivas se tiñen de color violeta y las bacterias Gram negativas de color rosa”. (p.2610).

Este bacteriólogo se basó en una serie de características para poder establecer cuáles bacterias pertenecían a una clase y cuáles a la otra. Una de las principales diferencias que manifestó fue que las bacterias gram positivas presentan en la pared celular una estructura que posee una capa de peptidoglicano más gruesa que las gram negativas, ya que en estas últimas la capa es más delgada. Además, se observó que en las gram negativas esta capa de peptidoglicanos se une gracias a lipoproteínas a otra membrana plasmática externa, lo que ocasiona es que, al ser tan delgada, esta capa no puede retener el color violeta de la tinción, lo que las diferencia de las gram positivas que sí son capaces de hacerlo al contar con la capa de peptidoglicanos gruesa. (González y Mollinedo, 2014, p.2610)

En el artículo publicado en la Revista Iberoamericana de Patología Clínica denominado “Características generales del *Staphylococcus aureus*”, se establece que el *Staphylococcus aureus* fue descubierto en 1880 por el médico Alexander Ogston, desde entonces se le consideró como un microorganismo de gran importancia, ya que se ha visto su alto potencial de virulencia y se le responsabiliza de causar un amplio número de infecciones tanto en humanos como en animales. Las enfermedades que se le atribuyen van desde problemas en la piel y hasta pueden ocasionar problemas en los tejidos blandos que podrían llegar a amenazar la vida, esto último aumenta por la gran resistencia que ha desarrollado ante los posibles tratamientos. (Cervantes, García y Salazar 2014, p. 28)

Además, se establece en el artículo llamado “*Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria”. Establece que la *Pseudomona*

*aeruginosa*, fue descrita por primera vez el término *Pseudomonas* a finales del siglo XIX por el profesor Walter Migula del Instituto Karlsruhe en Alemania, llamando a este microorganismo “Células con órganos polares”. Por su parte el término *aeruginosa* surgió del investigador Schroeter en el año de 1872, este nombre se originó por los colores que la bacteria mostraba en ciertas condiciones de cultivo, un color similar al cobre oxidado, como un verde-azulado. Este microorganismo puede provocar grandes complicaciones en la salud por su alta patogenicidad. (Álvarez, Mangwani, Martínez, Paz, Solano y Vázquez 2019, pp. 180-181)

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria que por las características que presenta, es gram negativa. Este microorganismo fue detectado por primera vez en 1875 por el bacteriólogo alemán Edwing Klebs, ya que este se encontraba investigando los procesos neumónicos en pacientes que habían fallecido por complicaciones, lo que se relaciona con el género de *Klebsiella*. Pero fue hasta en 1882 que se describió esta bacteria como responsable de estas complicaciones, lo cual realizó Friedländer. Sin embargo, no se identificó esta bacteria con el nombre de *Klebsiella pneumonie* hasta 1887 cuando Trevisan se lo otorgó en honor a Edwing Klebs, esto descrito en la tesis llamada “Caracterización molecular del gen de la  $\beta$ -lactamasa SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae*, elaborada por Chaves, 2002”

El microorganismo de *Escherichia coli* fue descubierto mientras examinaban heces en pacientes pediátricos por el microbiólogo alemán Theodor Escherich en 1885. Este doctor logró aislar con éxito varias colonias a las que nombró *Bacterium coli commune*. También evidenció que eran responsables de cuadros de infección intestinal aguda. Sin embargo, no fue hasta ocho años después de la muerte de este microbiólogo que en su honor se llamó a esta bacteria *Escherichia coli*. (Mora y Vargas, 2018, pp. 27-28)

Según un artículo publicado en el 2015, denominado “Candidiasis bucal en pacientes con tratamiento antineoplásico”, se establece que la *Candida albicans*, se empezó a manifestar y hablar de ella por Hipócrates en su libro “Epidemias”, en el siglo IV antes de Cristo, él manifestaba que tenía relación con algunas complicaciones en la salud severas. Pero no fue hasta en 1839, que Langenbeck descubrió y además, observó lo que el microorganismo del muguet como lo llamó podía ocasionar en las personas que lo padecían, como es el caso de las placas blancas que son producidas por este hongo; sin embargo, el

nombre de *Candida* como se conoce hoy en día fue otorgado por Burkhout. (Díaz, Estrada, Márquez y Sánchez, O, 2015, p.1081)

### **Internacionales**

En el 2014 Pastor, elaboró su trabajo denominado “*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Malpighiaceae): Actividad antimicrobiana y estudio de los metabolitos secundarios” en el cual presenta la extracción tanto de corteza como de hojas para su evaluación antimicrobiana sobre ciertos microorganismos. Dicha extracción se realizó con distintos solventes donde todos mostraron cierta actividad, al inhibir la bacteria *Escherichia coli*. Una conclusión relevante fue que el extracto de la hoja es el que presentó mayor eficacia, además de que el solvente metanol fue el que mostró un mayor rendimiento en la extracción.

Según un artículo publicado en el 2016, llamado “Actividad antimicrobiana de los extractos de raíces de *Byrsonima crassifolia*”, se menciona que las concentraciones de los extractos obtenidos variaron de acuerdo con su método de extracción, así como también por sus propiedades en esta parte de la planta. Los extractos fueron eficientes en la inhibición bacteriana, excepto *Escherichia coli*, lo que dejó en evidencia que pueden ser una alternativa terapéutica contra infecciones afectadas por *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, se deben realizar una mayor cantidad de estudios que impliquen todas las partes de la planta, para determinar la toxicidad de esta en el uso de dosis más altas y durante períodos de tiempo más largos. (Gellen & Silva, 2016, pp: 66-71)

Otra investigación importante, es aquella donde se evaluó el efecto de la capacidad antioxidante, así como los efectos farmacológicos in vitro (efecto antiproliferativo) e in vivo (antinociceptivo, antiinflamatorio, antiulcerogénico) de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*. Se logró observar que la actividad antioxidante no estaba directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos de los extractos. Además, en el cultivo de células tumorales humanas, los extractos no presentaron actividad antiproliferativa significativa y los extractos de las dos especies redujeron las lesiones ulcerosas producidas por el etanol hasta un 84%. (Carvalho, Monteiro, PomPeu, Rogez & Tinti, 2012, pp:165-172)

## Nacionales

En la tesis: “Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Cinnamomun verum* (Canela), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Ocimum basilicum* (Albahaca), para su estudio sinérgico y comprobar su efecto en *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*”, elaborada por Mora y Vargas en el 2018, establecieron por medio de pruebas microbianas, que estos aceites esenciales presentaron actividad contra las bacterias mencionadas, en mayor o menor grado, pero con sensibilidad. Una conclusión importante fue que la *Pseudomona aeruginosa* fue la que obtuvo mayor grado de resistencia en los cuatro aceites, y el de canela inhibió todos los microorganismos. Lo que demuestra que las plantas naturales sí tienen actividad antimicrobiana frente a distintas bacterias.

En este trabajo de graduación se evaluó la actividad que presenta el aceite esencial de Tomillo contra el microorganismo *Staphylococcus aureus*, y se logró evidenciar que este aceite sí presenta eficacia frente a esta bacteria, lo anterior se demostró mediante pruebas microbianas que manifestaron la sensibilidad que presentó este aceite contra el *Staphylococcus aureus*. Esto evidenció que este tipo de aceites presentan un efecto positivo al combatir la infección causada por este microorganismo, que ha aumentado su prevalencia en la salud a nivel mundial. Lo anterior se describió en la tesis llamada “Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del producto aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el *Staphylococcus aureus*” elaborada por Madrigal en el 2017.

Mata en el 2017, publicó un artículo llamado “Estudio retrospectivo sobre Resistencia Antimicrobiana de la *Escherichia coli* frente a los Antibióticos de mayor uso para tratar Infecciones del Tracto Urinario en pacientes femeninas del GAM entre enero del 2016 y diciembre del 2016.”, donde menciona que la *Escherichia coli* es uno de los microorganismos que más resistencia presentó de acuerdo con las pruebas de urocultivos que se les realizaron a estas pacientes, se contabilizaron 744 pacientes que cumplieron con los requisitos a nivel hospitalario. Se determinó en esta investigación que la mayor resistencia se obtuvo del antibiótico ampicilina. También se recalcó que este tipo de resistencia puede dificultar la eliminación de este microorganismo.

### **Proyecciones**

- Se pretende aportar evidencia de la actividad antifúngica del extracto del Nance frente a *Candida albicans*.
- Se demostrará el beneficio que se podría tener al utilizar plantas naturales para tratar enfermedades causadas por bacterias que presentan algún grado de resistencia a la terapia actual.
- Se pretende evaluar cuál de los dos extractos (corteza u hojas) de *Byrsonima crassifolia*, presentan mayor actividad antimicrobiana y antifúngica.
- Se pretende dar una posible opción de una nueva alternativa farmacéutica que sea de a base de plantas naturales y que se pueda categorizar de amplio espectro

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

### **Bacterias**

Berlanga y Guerrero (2017), establecen que Roger Stanier y Cornelis van Niel plantearon en el año 1962 el nombre de bacteria para aquellas células que no presentan núcleo, con esto se pudo separar en dos grupos a los organismos vivos, los cuales se denominaron como procariotas y eucariotas. La mayoría de las bacterias se observan por el microscopio como pequeños bastones o esferas, sin rasgos muy característicos que las diferencien. En un inicio se creía que las células procariotas no poseían ninguna organización interna, sin embargo, en los últimos años se ha observado que son más intrincadas de lo planteado en un inicio (pp. 13-14)

El reino procariota, presenta bacterias que son microorganismos que presentan capacidad de reproducirse mediante fisión binaria, que al replicar al tiempo su ADN, ocasiona que tengan el mismo genoma cada célula hija. Aunque no se diferencian de manera significativa cuando se observan en el microscopio, se pueden distinguir tres formas básicas: las de forma esférica se le conocen como cocos, las alargadas son bacilos, las curvadas y de forma espiral se le conocen como espirilos, espiroquetas, comas o vibriones con diferentes características entre ellas. (Kuno y Vargas, 2014, p.2595)

Específicamente las conocidas como cocos son agrupaciones homogéneas de forma casi esférica. El tamaño de este tipo de bacterias oscila entre los 0.8 a 0.10m. Se debe tener en cuenta que estas células por factores como la tendencia de mantenerse unidas pueden tomar distintas formas una vez sucedida la división celular. Entre ellas tenemos: diplococos, tétradas, sarcinas, estreptococos y estafilococos. (Kuno y Vargas, 2014, pp.2595-2596.)

Kuno y Vargas (2014), mencionan que, en el caso de los bacilos, estos forman agrupaciones bastante heterogéneas porque poseen gran variedad de subtipos morfológicos. Entre ellas tenemos cilíndricos, forma de bastón, pueden ser largos y delgados, pequeños y gruesos, o con extremos rectos, afilados o redondeados. Igualmente pueden presentar según la tendencia de unión de las células varias formas, las cuales son: diplobacilos, estreptobacilos, empalizado y formas filamentosas. (p. 2596)

También tenemos un tipo de bacteria llamado espirilos, en ella se encuentran todas aquellas donde su forma es una o más curvaturas, inclusive algunas tienden a presentar forma de hélices. Entre estas células se presentan divisiones con respecto a sus características propias, tenemos: vibriones, espirilos y espiroquetas. (Kuno y Vargas, 2014, p. 2596)

Estas bacterias por medio de la tinción de Gram se dividen en gram positivas y gram negativas. Las que retienen la tinción azul-violeta son las gram positivas y las que se decoloran y después se tiñen con safranina son las gram negativas. Esto se da por las diferencias que existen en la estructura de cada una de ellas. (Arenas y Rodríguez, 2018, p.166)

### **Bacterias gram positivas**

Arenas y Rodríguez (2018), mencionan que por medio de la prueba de tinción de Gram se denomina a las bacterias gram positivas a todas aquellas que son capaces de retener la tinción azul-violeta. Esta característica se debe a que presenta una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración. (pp. 166-167)

Estas bacterias como agentes etiológicos han ido aumentando su prevalencia en el desarrollo de enfermedades, siendo algunos de los principales microorganismos el *Staphylococcus aureus*. Las cepas de *S.aureus* meticilino resistentes y el *Streptococcus*

*pyogenes* o también llamado *Streptococcus* del grupo A invasivo. En su conformación contienen distintas partículas que se pueden nombrar como patrones moleculares que se pueden asociar a los patógenos, entre las que tenemos peptidoglicano, el ácido teicoico, las lipoproteínas y los superantígenos que activan el sistema inmune adaptativo. (Barrera y Méndez, 2016. p. 51)

Como se mencionó las gram positivas presentan las estructuras anteriormente descritas que facilitan los factores de virulencia, ya que estos componentes ayudan a la adhesión tisular, evasión inmune y lesión celular del huésped, provocando inflamación lo cual altera la función de las células inmunes, y modifican la coagulación y comprometen la vasculatura (Barrera y Méndez, 2016. p. 52)

Asimismo, Barrera y Méndez (2016), también mencionan específicamente a los peptidoglicanos que poseen las bacterias gram positivas, estas disponen de unas 40 a 80 capas, son consideradas grandes macromoléculas, que alrededor de la célula forman un sáculo, el cual lo conforman cadenas con enlaces beta 1-4 entre moléculas de glicanos alternadas del tipo Nacetilglucosamina (GlcNAc) y Ácido N acetilmurámico (MurNAc). El ácido teicoico con la adición de azúcares como  $\alpha$ -galactosa o N- acetil glucosamina, además de la alteración de la cadena peptídica o de las moléculas de glicanos (NAM – NAG) del peptidoglicano, se consideran algunos de los mecanismos de evasión del sistema inmune con que cuentan las bacterias gram positivas. (p.52)

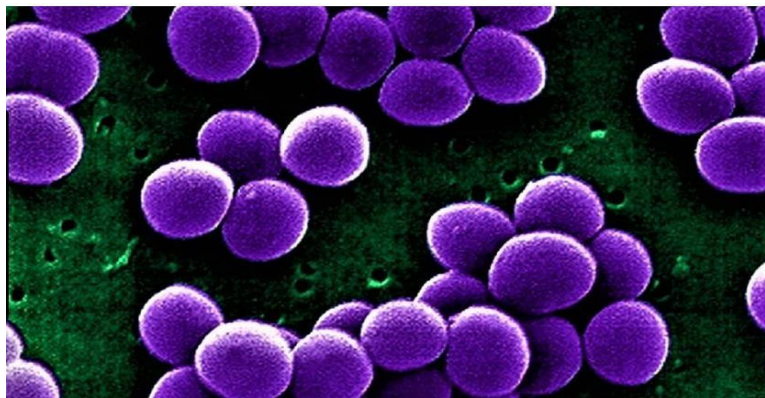
### ***Staphylococcus aureus***

Seguidamente se expondrá información importante sobre la bacteria de *Staphylococcus aureus*, la cual comprende la definición del microorganismo, así como sus síntomas y patologías más importantes.

Según Cervantes, García y Salazar en el 2014, establecen sobre *Staphylococcus*:

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas.

**Figura 1. Microorganismo *Staphylococcus aureus***



Fuente: Batra, 2017

### Clasificación taxonómica

**Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus***

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus'</i>
Especie	<i>Aureus</i>

Fuente: Parra, 2017

Avalos, Soto y Zendejas (2014) citan: El *Staphylococcus aureus*, es un microorganismo bastante común en lo que concierne a las infecciones del torrente circulatorio (BSI) aparte de intoxicaciones provocadas por alimentos. Las enfermedades ocasionadas por esta bacteria se presentan en la gran mayoría de los países industrializados, una explicación para este aspecto es que estos lugares presentan una importante cantidad de personas que los habitan. (p.130)

Álvarez y Ponce (2012) mencionan que esta bacteria es responsable de una amplia cantidad de enfermedades por su alto grado de patogenicidad, estas infecciones van desde leve hasta graves que comprometen la vida. Este microorganismo coloniza en adultos y niños desde un 30 hasta un 50% en la piel, un 30% de forma intermitente y un 20% permanente.

Entre las zonas más comunes de colonización se encuentran las fosas nasales anteriores, aunque también se presenta en la región inguinal, axilas, región del periné y la faringe. (p.384)

Correa y Jiménez (2008), afirman que este microorganismo es reconocido como uno de los principales patógenos humanos, esto se debe a que esta bacteria posee gran variedad de virulencia, tanto bioquímica como estructural, por esto está preparado para colonizar, invadir y diseminarse, estas características son las que lo hacen capaz de manifestarse ampliamente en clínicas y provocar complicaciones en la salud.

Como anteriormente se mencionó este microorganismo es muy peligroso por la alta virulencia que presenta. Esta se da porque cuenta con un numeroso catálogo de causantes que le facilita esta característica, una de las más importantes son las toxinas liberadas. Estas toxinas lesionan las membranas y esto llega a desarrollar la muerte celular. Comúnmente produce hemolisinas y leucotoxinas potentes. Además, se evidenció que algunos de los últimos pueden lisar neutrófilos después de la ingestión, lo que representa un arma especialmente poderosa contra la eliminación bacteriana por la defensa innata del huésped. Los factores que reprimen la cascada del complemento o imposibilita el reconocimiento por parte de las defensas del huésped. Por otro lado, también se da la presencia de otro tipo de toxinas que se adicionan a este programa multifacético de la bacteria, esto con el fin de esquivar la eliminación por parte del huésped. (Otto, 2014. p. 32)

Además, de que cuenta con la capacidad de obtener elementos exógenos por transferencia horizontal, esto lo puede adquirir tanto dentro como fuera de otras especies, todas estas cualidades le permiten adaptarse fácil y rápido al medio, por esto es catalogado como un patógeno exitoso. Esta adaptación también le es posible a los agentes antimicrobianos, por medio de la creación de resistencia a los antibióticos, situación que ha aumentado a nivel mundial. (Correa y Jiménez, 2009. p.148)

Este microorganismo tiene una forma de transmisión importante el cual es por contacto directo, ya que, al encontrarse en la piel, un simple roce con las manos es un factor crucial para traspasar esta bacteria. El *S.aureus* presenta generalmente lesiones en la piel y tejidos blandos como abscesos, celulitis e impétigo, también es capaz de causar enfermedades sistémicas (endocarditis, empiema y neumonía). Esta bacteria desprende toxinas que son causantes de la piel escaldada, síndrome tóxico alimentario y el síndrome del Shock Tóxico. (Espinoza, Rodríguez, Sejas, A., Sejas, M y Zurita, 2016. p.30)

En los últimos años la patogenia mencionada ha ido en aumento en la población, esto por la resistencia que ha producido esta bacteria contra los antimicrobianos comunes que se utilizan para contrarrestarlo, aparte de la pésima atención que se le brinda por parte de los hospitales a este tipo de patología. Por ello, es importante vigilar de manera exhaustiva los mecanismos de defensa que desarrolla esta bacteria para poder minimizarlos. (Avalos, Soto y Zendejas, 2014. p.136)

Almada et al (2016). Reafirman la resistencia que ha manifestado esta bacteria, ya que se ha observado la defensa que tiene el *Staphylococcus aureus* ante los antimicrobianos especialmente los  $\beta$ -lactámicos. Esta resistencia radica generalmente en la penicilinas, la cual es una enzima que hidroliza a la penicilina y a otros compuestos sensibles. En 1950 se establecieron los primeros  $\beta$ -lactámicos que fueron estables frente la acción de penicilinas como las cefalosporinas y meticilina que estuvieron disponibles, sin embargo, un tiempo después se encontraron las primeras cepas resistentes a meticilina. (p. 609)

En 1961 se dio la aparición del primer *Staphylococcus aureus* catalogado como resistente a la meticilina (SARM) lo anterior en Inglaterra. Esta resistencia se ha

incrementado de manera ininterrumpida, por esto se ha destacado este microorganismo como

uno de los patógenos más importantes en enfermedades nosocomiales. Pero un aspecto por tener en cuenta es que la epidemiología de SARM se ha ido transformándose con el pasar de los años hasta alcanzar un aumento de las infecciones que se obtienen desde la comunidad en pacientes sin factor de riesgo conocido. (Almada et al, 2016, p.609)

### **Bacterias gram negativas**

Como ya se mencionó gracias al bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen 1844, que desarrolló la técnica de coloración denominada Tinción de Gram. Se establece que una característica de las bacterias gram negativas es que estas poseen una pared celular delgada, además de que está unida por lipoproteínas a otra membrana plasmática externa, la cual es soluble en solventes orgánicos y la capa de peptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea. (Mollinedo y Gonzáles, 2014)

Mollinedo y Gonzáles (2014), dictan que estas bacterias se pueden clasificar de acuerdo con su necesidad de oxígeno para mantenerse con vida, por consiguiente se cuenta con la siguiente clasificación: bacterias aerobias estrictas, en las cuales se cuentan con bacilos y cocos aerobios como el género *Campylobacter* y las *pseudomonas*, bacterias anaerobias estrictas que presenta *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Porphyromonas*, por último se tienen las bacterias anaerobias facultativas las que pertenecen a esta división son las bacterias de la familia de *Enterobacteriaceae*, entre las cuales tenemos la *Escherichia coli*, *Salmonellas*, *Serratia*, *Shigellas* y la *Klebsiella*. (p.2612)

### ***Klebsiella pneumoniae***

Según lo establece Cubero en el 2015, la *Klebsiella pneumoniae*:

El género *Klebsiella* lo componen bacterias gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo inmóvil, oxidasa negativa y catalasa positiva, tiene una cápsula, básicamente compuesta por polisacáridos, que es un importante determinante de patogenicidad. (p.5)

Cruz et al (2013), *Klebsiella pneumoniae* es considerada una bacteria importante por la patogenicidad que puede provocar, ya que se ha visto que tiene relación con varias enfermedades en la comunidad, así como nosocomiales generalmente en los pacientes

inmunocomprometidos. Las cepas de este microorganismo pueden causar morbilidad y mortalidad, estas características las presentan mayormente en el área de cuidados intensivos pediátricos y servicios quirúrgicos. (p.374)

**Figura 2. Microorganismo *Klebsiella pneumoniae***



Fuente: Salabert, 2019

### Clasificación Taxonómica

**Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *Klebsiella pneumoniae***

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
orden	Enterobacteriales
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>pneumoniae</i>

Fuente: Cubero, 2015

Este microorganismo se considera un saprófito en el hombre y algunos mamíferos, habita generalmente en el tracto gastrointestinal, la piel y la nasofaringe, aunque también se ha visto presente en el agua y suelos. Su espectro y epidemiología de las infecciones causadas por este patógeno cambió drásticamente en los años 70, ya que en esta época se estableció para ambiente hospitalario convirtiéndose en la principal causa de infecciones nosocomiales. (Sosa. J, Sosa, Y y Valdés, 2018, p.1272)

Hasta la actualidad la *klebsiella pneumoniae* es considerado un importante patógeno nosocomial, esto porque se ha visto que causa notables epidemias y brotes alrededor de todo el mundo. Estas infecciones se consideran graves con una letalidad aproximada de un 35%, siendo una amenaza para la salud pública. Desgraciadamente este microorganismo además de otras enterobacterias multirresistentes tienen una limitación terapéutica importante para tratarlas, esto debido a la gran resistencia a los antimicrobianos, que por lo anterior provoca la gran mortalidad en el paciente. (Sosa, J, Sosa, Y y Valdés, 2018, p.1272)

Según Agudelo, Echeverri, Maya, Ospina y Rueda (2012), La *klebsiellapneumoniae* es una de las especies de enterobacterias más estudiadas y de mayor importancia clínica. En diferentes estudios realizados se determinó que este microorganismo es el segundo patógeno que más se ha aislado en pacientes que se encuentran en el área de Cuidados intensivos hospitalizados, esto ocasiona que su prevalencia aumente considerablemente. (p.175)

Como anteriormente se mencionó este microorganismo ha desarrollado una importante resistencia a los antimicrobianos que se utilizan para tratarlos. La resistencia que presenta se debe sobre todo a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) que ocasiona que los antimicrobianos no cumplan con su función, esto porque inactiva los medicamentos más utilizados para contrarrestarlas. Por otra parte, también se ha visto que pueden llegar a producir carbapenemasas que inactivan a los carbapenémicos, que estos son utilizados en primera instancia para tratar bacterias productoras de BLEE. Esta última resistencia es inclusive más grave que las anteriores porque ocasiona que se minimicen drásticamente las opciones para tratar pacientes infectados con estos patógenos. (Agudelo et al, 2012, p.175)

Según Ramírez y Villalobos (2016), la *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado (KPBLEA+), ha ido incrementado su prevalencia a nivel mundial lo que se cataloga como un problema emergente. Esta presencia va a depender de acuerdo a las regiones geográficas que se encuentran en distintas partes del mundo, siempre teniendo en cuenta que la mayoría son adquiridas de manera nosocomial, con tasas entre 7.5% y el 44%. Un aspecto de relevancia es que la tasa de KPBLEA+ en Latinoamérica es de 44%, mientras que en algunos lugares es menor como un 22,4% en Asia / Pacífico Oeste, 13,3% en Europa y del 7,5% en los Estados Unidos. (p.63)

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido ( $\beta$ LEE) que son producidas por bacilos gram

negativos como en este caso la *Klebsiella*, tienen la potestad de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro y los monobactámicos, pero no las cefamicinas ni los carbapenémicos. Son mediadas generalmente por plásmidos y derivan de otras enzimas con menor espectro hidrolítico. Esta característica de los microorganismos entorpece de manera importante la terapia de las muchas patologías que presentan estas cepas, además de resistencia a la gran mayoría de los  $\beta$ -lactámicos, altas tasas de resistencia a antimicrobianos de otras familias. (Cruz et al, 2013, p.374)

Generalmente este microorganismo provoca enfermedades en personas inmunosuprimidas, ocasionándoles infecciones respiratorias, urinarias, intraabdominales y bacteriemias, también presentan infecciones de heridas, de dispositivos intravasculares o invasivos, del conducto biliar, abscesos hepáticos, peritonitis, meningitis, mionecrosis y celulitis crepitante. Se reportan que la mortalidad para las bacteriemias por *Klebsiella pneumoniae* no productora de BLEA (KPBLEA-) es de un 14% y del 68% para las bacteriemias por KPBLEA+. (Ramírez y Villalobos, 2016, p.63)

Se conocen algunas causas para llegar a obtener este patógeno, entre las que tenemos una extensa permanencia hospitalaria principalmente en la Unidad de cuidados intensivos, padecer enfermedades más severas, la presencia de catéteres, la realización de procedimientos invasivos y quirúrgicos, terapia de reemplazo renal, soporte ventilatorio, y el uso de  $\beta$ -lactámicos y fluorquinolonas. (Ramírez y Villalobos, 2016, p.63)

### ***Pseudomona aeruginosa***

Según Betancourt en el 2015, establece que la *Pseudomona aeruginosa*

La *Pseudomona aeruginosa* se destaca por ser bacilos Gram negativos rectos o ligeramente curvados que no forman esporas, no fermentadores de azúcares, normalmente móviles debido a que poseen uno o más flagelos polares, catalasa positivos y aerobios estrictos; en ocasiones pueden usar los nitratos como fuente alternativa de electrones, lo que les permitiría crecer también como anaerobios

Álvarez et al (2019). La *pseudomona* se mencionó en el siglo XIX por vez primera,

esto gracias al profesor Walter Migula del Instituto Karlsruhe en Alemania. Lo que en un comienzo se denominó como esporas, posteriormente se reconoció que eran en realidad gránulos refráctiles de materiales de reserva. *Aeruginosa* lo estipuló el investigador Schroeter en el año de 1872, este nombre fue dado por los colores que mostraba la bacteria, parecido al color cobre oxidado. (p.180)

La *Pseudomona aeruginosa* fue aislada primeramente por Carle Gessard en 1882, pero se denominó *Bacillus pyocyaneus*. Migula incorporó esta especie dentro de su género y creó sinónimos fundamentándose en lo expuesto por Gessard y Schroeter. La taxonomía de esta bacteria ha sufrido muchos cambios desde que se descubrió la misma hasta la reorganización de las especies en los últimos años. (Álvarez et all, 2019, p.180)

**Figura 3. Microorganismo *Pseudomona aeruginosa***



Fuente: Hamers (2018)

### Clasificación Taxonómica

**Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *Pseudomona aeruginosa***

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	GammaProteobacteria,
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	Pseudomonas
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Fuente: Betancourt, 2015

Ferdinand Cohn reunió las bacterias con base en la morfología bacteriana y de las colonias en 1872. Sin embargo, esta organización se ha ido modificando por aspectos más fisiológicos además de factores de patogenicidad esto con el fin de llegar a una clasificación más precisa. Stanier plantea una clasificación novedosa para este género fundamentándose en un perfil metabólico de 267 especies sobre 146 metabolitos. (Álvarez et al, 2019, pp.180-181)

Cruz et al (2013) afirman que esta bacteria es un bacilo catalogado gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. La *Pseudomonas aeruginosa* se considera que tiene características muy versátiles, ya que es capaz de soportar condiciones bajas de oxígeno, además puede subsistir con niveles disminuidos de nutrientes aparte de poder crecer en intervalos de temperatura de 4 a 42°C. Gracias a estas cualidades le otorgan la capacidad de unirse, sobrevivir en distintas superficies como equipos médicos entre otros. (p.139)

Lo anterior le otorga la característica de provocar infecciones nosocomiales principalmente en pacientes inmunosuprimidos. Puede llegar a producir neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, además de una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, esto por ser una patología crónica que desarrollan a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria. Un aspecto muy importante y de preocupación es la alta resistencia intrínseca, aparte de su poder de adquirir resistencia a múltiples antibióticos. (Cruz et al, 2013, p.139)

Canteras et al (2018), consideran que la *Pseudomonas aeruginosa* hoy en día es uno de los patógenos más comunes en producir infecciones a nivel hospitalario. Su frecuencia varía dependiendo del tipo de hospital, área geográfica, tipo de servicio, tipo de pacientes, así como la manera de utilizar los antibióticos ya que esto es característico de cada uno de los centros de salud. De igual forma, su porcentaje de mortalidad es sumamente significativo ya que se encuentra entre 35% y 70%, esta proporción va a depender de ciertos factores como dónde se encuentran las infecciones, la gravedad de la misma, así como el tratamiento antimicrobiano. (p.124)

Esta resistencia a las sustancias antimicrobianas, se ha asociado con la formación de biopelículas bacterianas, así como la fagocitosis por componentes del sistema inmune

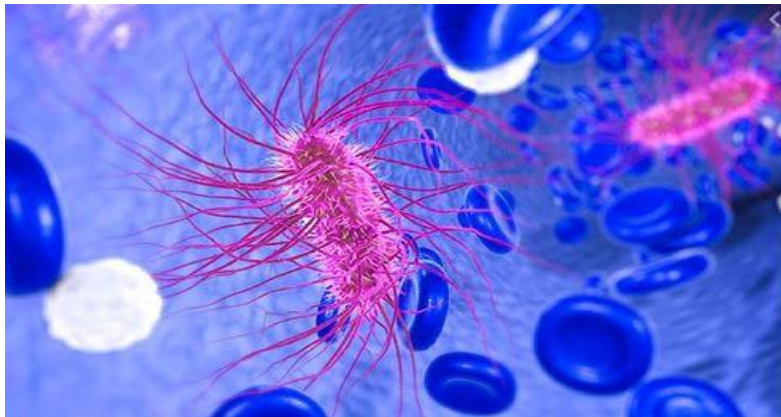
adaptativo. Las infecciones nosocomiales producidas por esta bacteria se asocian a su facultad para desarrollar biopelículas, que están integradas en la matriz extracelular por proteínas de membrana externa, pili, exopolisacáridos (EPS) y ácidos nucleicos. (Cruz et al, 2013, p.140)

Esto se desarrolla principalmente frente a todos los antipseudomónicos que se tienen, incorporados los carbapenémicos con actividad frente a *Pseudomonas spp.* (imipenem, meropenem y doripenem). Esto se debe a distintos mecanismos: a) producción de carbapenemasas, b) alteración de las porinas y c) bombas de eflujo. Esta característica de resistencia se ha aumentado el nivel de mortalidad. (Canteras et al, 2018, p.124)

### ***Escherichia coli***

Según Canet (2016), La *Escherichia coli* (*E.coli*) se descubrió y fue aislada en 1885 por el pediatra alemán Escherich, donde demostró que habita naturalmente en el intestino. La describió como una bacteria común del colon llamada *Bacterium coli commune*. Sin embargo, Castellani y Chalmers en 1919 lo denominaron *Escherichia* en honor a Escherich. Pertenece al género de la familia *Enterobacteriaceae*, siendo su especie más común *Escherichia coli*. (parr. 1-2)

Según la Organización Mundial de la Salud (2018), este microorganismo produce la toxina Shiga, a estas se les llama así por su similitud por las toxinas que libera *Shigella dysenteriae*. Específicamente esta bacteria tiene la capacidad de desarrollarse entre los rangos de temperatura 7 °C a 50 °C, sin embargo, su temperatura perfecta es de 37°C. También tienen la capacidad de multiplicarse en alimentos ácidos hasta un pH 4.4, pero con actividad de agua es d 0.95. Un aspecto sumamente importante de la *E. coli* productora de toxina Shiga, es que esta se aniquila guisando los alimentos hasta una temperatura mínima de 70 °C. (párr.2-3)

**Figura 4. Microorganismo *Escherichia coli***

Fuente: FDA, 2019

**Clasificación Taxonómica****Tabla 4. Clasificación Taxonómica de *Escherichia coli***

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>coli</i>

Fuente: Janon, 2016

Esta bacteria se encuentra en el sistema digestivo tanto de los animales como de los humanos, donde se cataloga parte normal de la flora intestinal. Esta bacteria se considera inocua, ya que se encuentra 1% de la microbiota del tracto intestinal. Pero se debe tener en cuenta que no siempre cumple la anterior premisa y puede llegar a contaminar alimentos o agua al sobrevivir en el medioambiente. (Franco, López, Orozco y Ramírez, 2013, p.92)

Existen distintas cepas de esta bacteria que pueden llegar a desarrollar patologías humanas, entre ellas se tienen cinco cepas de *E.coli* serotipo O157:H7 (Enterohemorrágica, ECEH), esta se considera el tipo más relevante ya que es una bacteria que ha ascendido en

su trascendencia para con la salud pública al por provocar distintas enfermedades que son transmitidas por alimentos (ETAS) en el mundo, puede vincularse con cuadros de diarrea no sanguinolenta y hasta con una colitis hemorrágica (CH), que si se agrava puede provocar un síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénicatrombótica e insuficiencia renal aguda, que puede progresar a insuficiencia renal crónica, lo que provocaría riesgo de vida en un aproximado de 3 a 5%, comúnmente en niños, ancianos y pacientes inmunosuprimidos. (Franco, López, Orozco y Ramírez, 2013, p.92)

Según Morejon (2013), se ha observado que la *Escherichia coli* ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia antimicrobiana que han generado preocupación a la salud pública, se cree que esto se debe al uso inapropiado de antibióticos para tratar infecciones urinarias y mucho más en la bacteriuria asintomática. Esta bacteria se ha catalogado como multirresistente tanto a nivel hospitalario como comunitario. Cuando aparecieron las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), que son capaces de inactivar las oxiiinocefalosporinas como la ceftriaxona, cefotaxima y ceftazidima, además del aztreonam, gracias a las BLEE han creado que sea muy complejo el tratamiento de algunas infecciones como urinarias en pacientes hospitalizados y con sondas prolongadas. (pp.4-5)

## Hongos

### Generalidades

Se estima que los hongos aparecieron en los últimos 660 millones y 2.15 billones de años. Se cree que ellos fueron unos de los primeros en habitar tierra firme lo que permitió la presencia posteriormente de plantas e indirectamente de los animales. Además, existe evidencia de que estos crearon condiciones que facilitaron el desarrollo de diferentes tejidos, órganos e inclusive sistemas que son con los que cuentan las plantas y animales hoy en día. Gracias a esto, muchos investigadores han llegado a considerar a los hongos como un factor decisivo para las formas multicelulares. (Cuevas, 2016.p.3)

Los hongos presentan un núcleo definido, además poseen similitudes tanto con las plantas como con los animales. Una característica de estos organismos es que sus células son alargadas y al tenderse a alinearse entre ellas formas filamentos conocidos comúnmente con hifas, estas se pueden entrelazar y formar una estructura similar al algodón llamada micelio, denominándose a los que poseen esta característica como hongos filamentosos. Sin embargo,

algunos de ellos presentan una sola célula, como es el caso de las levaduras. (Cuevas, 2016.p.3)

Los hongos estaban clasificados en el siglo XIX dentro del reino *Plantae*, estos porque al ser organismos inmóviles y poseer similitudes en el área anatómica. Sin embargo, con el avance en el ámbito de los microscopios y las investigaciones moleculares en ellos, se demostró que poseen mayores características del reino animal. Una de las diferencias con las plantas es que los hongos no poseen clorofila ni cloroplastos, es decir, no son capaces de obtener sus nutrientes por medio de la fotosíntesis, sino por absorción, lo cual establece una similitud con los animales que se nutren por componentes que fabrican otros organismos. (Cuevas, 2016. p.3)

El botánico sueco Elías Magnus Frías en el año 1821, en su obra *Systema mycologicum*, publicó la primera clasificación moderna de los hongos, él se basó en las características morfológicas externas, forma y color. En la actualidad por sus propiedades morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y moleculares los hongos cuentan con su propio reino denominado como Fungi. A este reino lo conforman un aproximado de 1.5 millones de especies, lo cual demuestra la gran diversidad en todos los ecosistemas, la mayor importancia que tienen estos organismos es que se pueden comportar como simbioses, saprófitos y parásitos. (Cuevas, 2016. p.4)

Como ya se mencionó los pertenecientes al reino Fungi, son de mucha importancia para la biodiversidad de los ecosistemas. Al ser hongos tan diversos es difícil agruparlos en alguna categoría, pero sí se describen como organismos mayormente filamentosos con crecimiento apical, eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa. (Aguilar, Aguirre, Cifuentes, Ulloa y Valenzuela, 2014)

### ***Candida albicans***

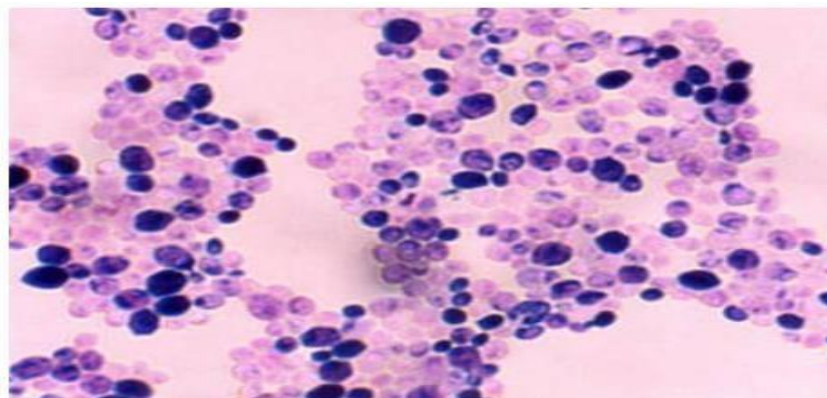
Para Arias, Dzul, López, Lugo y Zavala (2016), este hongo se cataloga como una levadura diploide sexual eucariota del reino hongos, y aunque se han encontrado más de 150 especies, no todas son patógenos humanos, solo una pequeña cantidad de ellas lo son. Los que pertenecen a este género de *Candida*, se consideran que son muy heterogéneos por lo

que cuentan con la característica de crecer como levadura o en forma filamentosa. La especie más relevante es la *Candida albicans*, y aunque forma parte en la microbiota humana normal, por alteraciones puede ocasionar infecciones en la población. (p.128)

Según Enríquez y Solange (2019), la *Candida albicans* es una célula oval levaduriforme, de 2,5 por 3,14  $\mu\text{m}$  y de paredes finas, presentan una forma filamentosa del hongo (hifa), la cual es una estructura microscópica tubular. Tiene una estructura dimorfa al poder producir hifas y micelios y en ocasiones las blastosporas varían de ovoide a elongada o esférica. Además, tiene la capacidad de formar cuerpos terminales de pared gruesa conocidos como clamidosporos. Este hongo comúnmente se desarrolla en medios aerobios a un pH de 2.5-7.5, a una temperatura de 20 a 38°C, aunque se ha visto que este género en específico crece mejor a 37°C, además de que no le afecta concentraciones altas de dióxido de carbono. (pp.40-41)

Este hongo se desarrolla por dos formas: planctónica y en biopelícula. Sin embargo, la más estudiada es la de biopelículas, las cuales están formadas por una red compleja de 42 células levaduriformes hifas y pseudohifas interconectadas con una matriz extracelular formada por múltiples biocapas. Su mayor componente son los hidratos de carbono (39,6%, de ellos el 32,2% es glucosa, el 5% proteínas, el 3,3% hexosaminas, el 0,5% fósforo y el 0,1% ácido úrico) de la matriz extracelular. (Enríquez y Solange, 2019, pp. 41-42)

**Figura 5. Hongo *Candida albicans***



Fuente: Sossa, 2019

## Clasificación taxonómica

**Tabla 5. Clasificación Taxonómica de *Candida albicans***

Reino	Fungi
División	Deuteromycota
Clase	Blastomycetes
Orden	Pseudosaccharomycetales
Familia	<i>Cryptococcaceae</i>
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>Albicans</i>

Fuente: Ávila, Huanca y Jaimes, 2018

Este microorganismo se encuentra generalmente en mucosa oral, vías respiratorias, tracto gastrointestinal y genitourinario femenino, y una alteración de esta provoca patologías en los humanos, se ha establecido que cerca del 90% de las infecciones a nivel hospitalarios se debe a este hongo además del *Aspergillus*, y se ha observado que su nivel de mortalidad es elevada. (Enríquez y Solange, 2019, p. 40)

*Candida albicans*, se encuentra mayormente en niños, neonatos y en cualquier población que se encuentre en la unidad de cuidados intensivos. Un aspecto por resaltar es que se visualiza con frecuencia en el uso de catéteres venosos centrales, además de la formación de biopelículas sobre catéteres, prótesis dentales o cardíacas y otros dispositivos biomédicos, por esta razón se ha observado que se minimiza el correcto funcionamiento de cada uno de los dispositivos, aparte de que complica la salud de los pacientes que los utilizan y por lo consiguiente aumenta su estadía en los hospitales así como el costo de esta atención y en casos serios se ha visto que incrementa la mortalidad. (Arias et al, 2016, p.128).

Ávila, Huanca y Jaimes (2018) afirman que generalmente las infecciones por *Candida* no representan un cuadro muy peligroso, si se complican pueden colocar en riesgo la vida de las personas que lo padecen. Como es el caso de la *Candida* presente en la boca la cual si llega a zonas profundas como es el caso de invadir la faringe o laringe, puede cerrar vías aéreas por la inflamación y en los casos más graves, propagarse por la sangre y provocar una micosis sistémica. Estos lugares favorecen su existencia ya que en superficies secas no

pueden subsistir por mucho tiempo, en cambio esta aumenta de manera significativa en lugares húmedos. (p.18)

Sin embargo, requieren de sustancias como carbohidratos simples para replicarse, por esta razón si se padece de algún tipo de candidiasis se siente la necesidad de consumir dulces. Los distintos tipos de candidiasis suelen transmitirse fácilmente como por contacto sexual, por el tacto o tocar objetos contaminados con el hongo, y un aspecto de suma importancia es la transmisión vertical que puede ocurrir durante el parto, donde si la madre sufre de candidiasis genital puede contagiar al bebé. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.18-19)

### **Tipos de Candidiasis**

Candidiasis genital: Es una de las más frecuentes que se presentan en el ser humano, el hongo se manifiesta en la vagina y/o en el endometrio del útero, provoca como síntoma más característico un flujo espeso y de color blanquecino, además de sensación de quemazón y enrojecimiento. Este padecimiento es más común en la mujer por los cambios a nivel hormonal que se presentan mayormente en el periodo de gestación y en diabetes gestacional. Además, los usos constantes de anticonceptivos hormonales orales favorecen la infección. Si se presenta en el embarazo la madre se lo transmite en el parto al bebé. Se dice que un 75% de las mujeres padecen candidiasis una vez en su vida, además del 5% lo sufre más de 4 veces durante un año. A pesar de no ser tan común esta infección también se manifiesta en genitales masculinos. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.19)

Candidiasis oral: Esta aparece como manchas de color blanco o rosado sobre la lengua, encías o en toda la mucosa oral, también se ha visto que se manifiesta en forma de comezón en los labios. Un aspecto por tener en cuenta es que puede aparecer tanto de manera asintomática o causar dolor, mal sabor, ardor de boca, además de que puede provocar grietas, hendiduras y úlceras. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.20)

Candidiasis esofágica: Se manifiesta en la parte profunda de la garganta, presenta dolor pectoral y problemas para deglutir. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.20)

Onicomycosis o infección en uñas: Es una lesión a nivel de la uña, la cual se manifiesta por un incremento en el grosor y opacidad de la uña, aparte de que provoca supuración y dolor en el lugar afectado. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.20)

Candidiasis urinaria: Esta infección suele manifestarse más comúnmente en la uretra, vejiga y en casos graves afectar el riñón. Aparece la mayoría de los casos en personas que presentan catéteres principalmente los utilizados para diálisis, además de los pacientes con tratamientos con esteroides y los que padecen de diabetes mellitus, en este último caso se da por la alteración del metabolismo de la glucosa y ayuda al crecimiento de la Cándida. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.20)

Candidiasis intestinal: Se da al incrementarse la reproducción de las levaduras que habitan en la luz intestinal. Provoca generalmente diarrea o estreñimiento, hinchazón, indigestión, e intolerancias a variados alimentos. A nivel sistémico puede aparecer fatiga, depresión, pérdida de peso e irritabilidad. (Ávila, Huanca y Jaimes, 2018, p.20)

## **Resistencia Bacteriana**

### **Características**

Según Baquero, Galán y Moreno (2014) la Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que existe un problema importante a nivel mundial lo cual tiene relación con la resistencia a los antibióticos ya que esta afección ha ido aumentando a nivel poblacional en los últimos años, esto ha imposibilitado mejorar en lo que se refiere a la salud a nivel global, porque compromete la capacidad de eficacia en el tratamiento utilizado para contrarrestarlas, lo que provoca un incremento en la morbi-mortalidad al no poder controlar el grado de infección y de esta manera se facilita la transmisión de la enfermedad a una mayor cantidad de individuos, y esto engruesa así los costos de atención en materia de salud. (p.830)

Según Aguilar y Calderón (2016), se debe conocer la diferencia entre los conceptos resistencia antimicrobiana y multi-resistencia antimicrobiana. Donde establecen que el primer término se refiere a:

“La capacidad que tiene una bacteria de sobrevivir ante la exposición de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cualquier tipo de antibiótico, que inhibe/mata a otras de la misma especie”.

También mencionan que el segundo término hace referencia sobre:

“La resistencia que presenta un microorganismo ante la exposición de dosis terapéuticas adecuadas de tres o más antibióticos los cuales pertenecen a diferentes grupos antibacterianos”. (Aguilar y Calderón, 2016. p.758)

El término de resistencia a los antibióticos, el cual hace alusión a toda aquella capacidad que tienden a desarrollar los microorganismos con respecto a la posibilidad de defenderse contra los efectos que ocasionan sobre ellos los antimicrobianos. Un aspecto importante es que este tipo de resistencia se puede dar por varias razones, entre ellas tenemos que se produce por una selección natural, donde ocurre de forma no pronosticada o al azar, o también se puede fomentar por una aplicación de presión selectiva en una población. (Aguilar y Calderón, 2016, p. 758)

En mayor detalle la resistencia natural, es la capacidad reiterativa con la que cuentan las cepas de una especie específica de bacterias, así como un mecanismo permanente, además no se tiene una relación con ningún antibiótico, sino más bien se da de manera genética. Como es el caso de *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas y la *Klebsiella pneumoniae* por su producción natural de betalactamasas resistentes a la penicilina. (Pérez y Robles, 2013, p.188)

Por otro lado, la resistencia adquirida, es una particularidad de cada especie bacteriana, donde es sensible por naturaleza a un antimicrobiano, pero por mutación o por la obtención de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones), pierden esta naturaleza de sensibilidad. Los antibióticos con mayor afectación son los beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfamida. (Pérez y Robles, 2013, p.188)

Se debe conocer lo que ocasiona que las bacterias puedan transferir y extender su capacidad de resistencia a los antibióticos, esto es posible gracias a sus bases genéticas. En 1920 Hans Winkler propuso el término de genoma para denominar a todo el ADN que está presente en la célula. Se conoce que Worcel y Burgi aislaron de *E. coli* el ADN bacteriano, esta fue la primera muestra que se obtuvo con respecto al ADN. En mayor grado el cromosoma bacteriano se encuentra contenido en el nucleóide de la célula, en el cual el ADN se ubica como una sola molécula sin ninguna membrana que lo limite. El nucleóide más complejo hasta el momento es el de la bacteria *E. Coli*. (Gutiérrez, Sánchez y Muñoz, 2012, p.33)

Según Gutiérrez, Sánchez y Muñoz (2012), mencionan que las bacterias son capaces de desarrollar distintos mecanismos para trasladar genes de resistencia de un microorganismo a otro, esto sin importar si son de la misma o distinta especie. Esta facultad que poseen es una de las posibles razones del porqué se da el incremento acelerado de la resistencia a los antibióticos. Para poder desarrollar este intercambio de genes, involucra la transferencia de elementos genéticos, entre lo que están los plásmidos, las secuencias de inserción (IS), los integrones, los transposones (Tn) y los bacteriófagos. (p.33)

Los plásmidos son moléculas extracromosomales que generalmente tienen menos de un veinteavo del tamaño del cromosoma. Además, presentan la cualidad de poder replicarse de manera independiente al cromosoma bacteriano, por esto también se les dice replicones. Aunque se les considera que no son esenciales para la supervivencia de la bacteria, sí contiene información genética importante, como lo es que los genes que codifican las proteínas que las hacen resistentes a los antibióticos, un aspecto importante es que un solo plásmido puede conferir resistencia a múltiples antibióticos. Es por esto que la *Klebsiella* puede producir betalactamasas, que inactivan los antibióticos betalactámicos, el *Staphylococcus* puede hacerse resistente a la meticilina, y las bacterias *E. coli* y *K. pneumoniae* pueden hacerse multirresistentes. (Gutiérrez, Sánchez y Muñoz, 2012, p.34)

También los transposones y las secuencias de inserción, son genes que facilitan la movilidad dentro del genoma de los organismos. Barbara McClintock en 1947 los describió al analizar la existencia de elementos móviles en el ADN, estudió la herencia del color y la distribución de la pigmentación del maíz. Los transposones son capaces de moverse de manera autónoma a otras partes del genoma de una célula, por eso pueden provocar mutaciones o modificaciones en el ADN. Existen diferentes clases de transposones, están los sencillos y compuestos, estos últimos en su centro portan genes específicos que son usualmente de resistencia a los antibióticos. (Gutiérrez, Sánchez y Muñoz, 2012, p.34)

Gracias a otro tipo de mecanismos se pueden desarrollar resistencia a los antibióticos lo que ha dado como resultado las mutaciones cromosomales y el intercambio de material genético de otras bacterias o fagos lo que ocasiona que se disminuya o inactive la acción de los fármacos utilizados para combatirlos. (Aguilar y Calderón, 2016)

Aguilar y Calderón (2016), mencionan los mecanismos responsables de estas mutaciones, entre las que tenemos:

Transformación: consiste en la transferencia o incorporación por una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias.

Transducción: transferencia de ADN cromosómico o plasmidico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infecta bacterias).

Transposición: movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular.

Conjugación: consiste en el intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas.

Según Pérez y Robles (2013). La resistencia bacteriana se puede plantear de manera molecular y biológica. Por esto se dividen en tres mecanismos por medio de las cuales las cepas bacterianas pueden desarrollar o adquirir la resistencia a los antimicrobianos, esto va a depender del mecanismo de la bacteria o del mecanismo de acción del antibiótico. Un aspecto por tener en cuenta es que los tres mecanismos pueden ocurrir de manera simultánea. Los mecanismos son: (p.189)

1. Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química: Esto se lleva a cabo porque se producen enzimas que van a destruir o modificar la estructura química. Unas de las más conocidas son para la destrucción de la estructura química son las beta-lactamasas, estas rompen el enlace amida por su capacidad de hidrolizar el núcleo, también está la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. En cambio, el cloranfenicol acetiltransferasa modifican la estructura, además de las que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) (p.189)
2. Alteración del sitio blanco del antibiótico: Este actuar describe la variación de uno o más sitios específicos de la célula bacteriana como por ejemplo la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales. (p.189)

3. Alteración en las barreras de permeabilidad: Se da por las variaciones de los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o alteraciones en cubierta de la célula bacteriana, que condicionan la permeabilidad de la misma. (pp.189-190)
4. Bombas de eflujo: Estas se encuentran en la membrana celular, estas son las responsables de la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Esto quiere decir que entre mayor variedad de bombas, suministran de mayor resistencia antimicrobiana, sin importar si la bacteria es gram positiva o gram negativa. (p.190)

### **Alternativas Farmacéuticas**

Según Lifshitz (2011) describe que desde la antigüedad se ha investigado cómo tratar a ciertas enfermedades para curarlas, desde entonces se ha empleado distintas sustancias de origen animal, vegetal o mineral, a las que se le atribuían características curativas. A pesar de esto, fue hasta 1885 que se produjo el primer fármaco sintético que fue la acetofinidina, su propiedad farmacológica fue analgésico, y lo llamaron Phenacetin, un segundo medicamento de relevancia fue ácido acetilsalicílico comercializado en 1889. (p.46)

Como ya se mencionó a través de los años el hombre ha necesitado de una función importante que desempeñan las plantas en el campo de la medicina y es para el tratamiento de patologías. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció que cerca de un 80% de la población utiliza las plantas de forma frecuente para remediar sus problemas de salud, más que todo en lo referente a atención primaria. También se observó que lo que se emplea son los extractos o principios activos de ellas. (Mancebo, Regalado y Sánchez, 2012. P.133)

Según Rodríguez, Sánchez y Zarate (2017). En los últimos tiempos se ha incrementado los estudios orientados a averiguar la existencia de posibles alternativas en el tratamiento antimicrobiano como opciones de curación para cambiar los fármacos que se utilizan en la actualidad. Esto debido a la tasa tan alta de resistencia que presentan las bacterias a la terapia actual a nivel mundial. Esta problemática involucra a todos los países sin ninguna excepción por el gran impacto en la salud que esto genera en las personas, también se ha visto incrementado el costo del tratamiento para estas patologías. Estudios realizados por la OMS, menciona que aprovechando los recursos naturales se podrían diseñar alternativas de tratamiento. (p.130)

En la búsqueda de estas nuevas alternativas, se ha observado que los aceites esenciales de las plantas como los metabolitos secundarios están presentes. Entre ellos tenemos: terpenoides, especialmente monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15) así como diterpenos (C20); estas plantas también producen otras moléculas como alcoholes, aldehídos, ácidos, hidrocarburos alifáticos, ésteres acíclicos o lactonas. Sus propiedades son muy variadas por sus grandes cantidades de compuestos químicos presentes, además no se cree que su efecto antimicrobiano dependa solo de un mecanismo, sino de una combinación de ellos. (Gutiérrez y Peña, 2017, p.56)

Estas combinaciones tienen efecto sobre una parte de la célula específica, en las bacterias gram positivas y gram negativas que muestran sensibilidad, se ha estudiado que uno de los mecanismos que presentan al utilizar los aceites esenciales es que estos se van a introducir en la célula del microorganismo a través de los lípidos de membrana celular y van a modificar su estructura ocasionando que esta sea más permeable, lo que provocaría que se desarrolle una salida de iones entre otros elementos, esto en forma crítica podría ocasionar la muerte celular. (Gutiérrez y Peña, 2017, p.56)

### **Medicamentos de Amplio Espectro**

Con el descubrimiento en 1929 sobre la penicilina, se conmocionó lo que fue el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Gracias a este hallazgo se ha podido ir incrementado en la práctica clínica diversas familias de antimicrobianos que atacan no sólo bacterias, sino también parásitos, virus y hongos. Un aspecto por considerar es que aunque se conozca que estos microorganismos poseen células procariotas, se ha evidenciado que todas las dianas que poseen los antimicrobianos están presentes en las células eucariotas, con la excepción de la pared celular (Calvo y Martínez, 2009)

En la actualidad es más utilizado el término “antibiótico” para hacer referencia a los antimicrobianos que pueden ser biológicos (aquellos que son sintetizados por un microorganismo vivo) y sintéticos. Estos se caracterizan por poseer una toxicidad selectiva, la cual no afecta o es relativamente inocua para las células del huésped, en relación con los antisépticos y los desinfectantes. La toxicidad selectiva se da por medio de las diferencias entre el huésped y el microorganismo invasor. (Simons, Reynolds y Rocha, 2015, pp, 139-145)

Los antibióticos presentan sustancias con comportamientos distintos como son en farmacocinética y farmacodinamia, esto les permite actuar de manera directa sobre alguna de las estructuras de los microorganismos y potenciar su acción biológica a una concentración relativamente baja. Estos medicamentos tienen como objetivo el minimizar la presencia del invasor, para que este sea controlado por el propio sistema inmune del huésped hasta que se dé su eliminación completa. (Seija y Vignoli, 2008, pp. 631-632)

Los antibióticos se clasifican por su efecto en bactericidas: que son aquellos que producen la muerte del microorganismo sensible y actúan en la fase de crecimiento bacteriano. Además, se deben administrar cuando se necesita la muerte rápida o inmediata de los microorganismos para controlar la infección o cuando el sistema inmune no esté en condiciones adecuadas para detener el proceso infeccioso. Los antibióticos bacteriostáticos actúan en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, producen la inhibición del crecimiento bacteriano, mientras que el sistema inmunológico aporta los elementos necesarios para el control de las enfermedades. (Simons, Reynolds y Rocha, 2015)

Otra de clasificación importante de estos fármacos es según su espectro. Aquellos que poseen un amplio espectro son los que actúan sobre una amplia gama de bacterias gram positivas y gram negativas y por el contrario, los que disponen de un espectro limitado son aquellos que poseen actividad solo contra cocos gram positivos y gram negativos, bacilos y espiroquetas. También entran en esta clasificación los antibióticos de espectro reducido los cuales ejercen su acción sólo contra un sector limitado de gérmenes. (Simons, Reynolds y Rocha, 2015)

Por otra parte, se encuentra la clasificación de los antibióticos según mecanismo de acción en los cuales se hallan aquellos que afectan la biosíntesis de la pared bacteriana, la cual es la encargada de proteger a la célula de los cambios osmóticos del medio externo, además de conferir forma y rigidez y contiene elementos patológicos característicos de cada especie. La composición química de la pared varía de acuerdo con las bacterias gram positivas y gram negativas, ya que las primeras poseen una pared formada por una capa de 50 a 100 moléculas de espesor de peptidoglicano, mientras que en las bacterias gram negativas es solo de una o dos moléculas de espesor, además de poseer una capa de lipoproteínas. (Calvo y Martínez, 2009)

Según Calvo y Martínez (2009) la membrana plasmática desempeña funciones importantes para mantener la vitalidad de la bacteria, ya que entre sus principales funciones incluye el actuar como barrera de permeabilidad selectiva y controlar de esta forma la composición del medio interno celular. Es por esta razón que los antibióticos que afectan modificando la permeabilidad, actúan como detergentes o tensioactivos catiónicos y permiten el escape de aminoácido intracelular, purinas, pirimidinas y otras moléculas fundamentales para la vida celular.

Para finalizar con la clasificación por su mecanismo de acción se encuentran aquellos antibióticos que afectan la biosíntesis proteica procariota, los cuales se dividen en dos grupos, según inhiban la transcripción o la traducción proteica. También existen los antibióticos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos bacteriano, donde la biosíntesis del ADN bacteriano es inhibida por dos mecanismos: mediante la inhibición de una topoisomerasa y por medio de la formación de compuestos tóxicos para las bacterias. (Seija y Vignoli, 2008)

### **Microbiología**

La microbiología se define como el análisis de los microorganismos pertenecientes a un grupo amplio que viven en forma de células aisladas o en grupos. Antony Van Leeuwenhoek, fue el primer observador y descriptor científico de microorganismos, aparte creó microscopios sencillos que pudieron aumentar entre 50 a 300 veces su tamaño lo que facilitó la visualización de estas bacterias. En 1875 y 1910, fue un periodo muy importante para la microbiología, ya que se conceptualizó muchas enfermedades bacterianas, así como los microorganismos causantes de cada patología. (Valverde, 2018. p.26)

### **Cultivo Microbiano**

El cultivo de un microorganismo se basa en el conocimiento de sus necesidades nutritivas y físicas. Este tipo de procedimiento se realiza en un laboratorio donde se cuentan con características y medios adecuados para la proliferación de estas bacterias. Existen distintos medios para este crecimiento entre estos tenemos los de consistencia líquida, denominado caldo o sólido este último si se le adiciona agar al caldo. El agar es un polisacárido, extraído de algas, que funciona como sustancia solidificante e inerte, ya que no actúa como elemento nutritivo frente a la gran mayoría de las bacterias. (Lopardo, 2016, p.33)

Otros aspectos por tener en cuenta al momento de realizar este tipo de preparaciones es la consistencia, el pH, el color, la transparencia (ausencia de precipitados, homogeneidad), temperatura adecuada en la disolución, esterilización y agregado de componentes como sangre, vitaminas o antibióticos. (Lopardo, 2016, p.33)

### **Agar Método Estándar**

También llamado agar cuenta estándar, este método fue creado por Buchbinder, Baris y Goldstein en el año 1953. Es un medio no selectivo que se creó para cuantificar la carga microbiana aerobia presente en alimentos, lácteos entre otros... Este agar se diseñó para el desarrollo satisfactorio de bacterias aerobias no exigente, esto gracias a los componentes que contiene que serían levadura, la tripteína y la glucosa que permiten el correcto desarrollo de los microorganismos. (Gil, 2019)

Como características físicas este medio posee un color claro además de un aspecto transparente, lo que facilita la visualización de las colonias que son sembradas en él. Aparte se conoce que este medio no posee inhibidores, esto facilita que las bacterias se puedan desarrollar sin ningún problema a temperaturas entre 25 y 40°C, con una temperatura óptima de crecimiento a 37°C. Las bacterias que se encuentren en este rango son de importancia, porque en su gran mayoría son las que causan enfermedades en los humanos. Por esta y otras razones este medio es recomendado por la American Public Health Association (APHA) para el recuento de mesófilos aerobios. (Gil, 2019)

### **Prueba de Sensibilidad**

Estas pruebas de sensibilidad contra los antimicrobianos desde la antigüedad se realizan de manera *in vitro* e *in vivo*. Los *in vivo* se utilizan tanto en animales como humanos. En un comienzo se realizaban por autoinoculación o por inoculación a terceros muchas veces de un modo discrecional y otras de un modo compasivo, como última alternativa para enfermos terminales, pero en la actualidad se ha regulado este tipo de prácticas. (Lopardo, 2016, p.271)

Hoy en día generalmente se utiliza en un laboratorio microbiológico avanzado exclusivamente, pruebas de sensibilidad *in vitro*. En principio, las pruebas *in vitro* tratan de predecir el efecto de un tratamiento *in vivo*, pero utilizando sólo dos de los tres elementos en juego: el antibiótico y la bacteria, puestos en un medio que dista mucho de ser el que naturalmente se da en una infección. (Lopardo, 2016, p.271)

Aunque el método anterior es de importancia para determinar si una sustancia presenta actividad frente a cualquier patógeno, para esto se observan los halos de inhibición que presenta o no cada sustancia analizada, donde se debe medir en milímetros dicha zona para establecer este valor. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible, intermedia o resistente según cada una de las categorías que les corresponde. (Picazo,2013. p.5)

### **Concentración Mínima Inhibitoria**

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es aquella concentración mínima de un antimicrobiano (en  $\mu\text{g/mL}$ ), que es capaz de inhibir el desarrollo de un microorganismo al transcurrir un periodo de 24 horas de incubación a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Existen diversos tipos de pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Las principales son por dilución macroscópica en caldo y por dilución en agar, las dos pruebas son para cuantificar la concentración mínima de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible in vitro del microbio. (Jima, 2015. pp.15-16)

Estos valores son utilizados para conocer la susceptibilidad que tiene los microorganismos hacia las sustancias que se utilizan para tratarlos. Este método se ha establecido como “Gold Standard” contra otras técnicas que se utilizan para el mismo fin. Este método aparte de identificar cual es la cantidad mínima de que tiene la capacidad para inhibir un microorganismo, también ofrece la oportunidad de determinar la resistencia que pueden experimentar. (Ahón y Rengifo, 2019, pp. 6-7)

Se debe considerar que no siempre un valor de CMI más bajo manifiesta una mayor actividad antimicrobiana. Esto porque la sensibilidad o la resistencia son distintas para cada bacteria y el antimicrobiano por utilizar. Conocer estos criterios es de suma importancia, esto porque si se considera sensible su evolución es favorable, por el contrario, si es intermedio o resistente esta será desfavorable, esto ayuda a evitar el fracaso en el éxito del tratamiento. (Cercenado y Saavedra, 2013. p.215)

Los halos de inhibición presentes en la placa demuestran la diferencia entre los microorganismos o los hongos sensibles de los resistentes, donde se relaciona con la concentración mínima inhibitoria, esto porque si esta zona es pequeña, se correlaciona con altos valores de la CMI lo cual sería resistente, y si por el contrario estos halos son grandes la CMI es baja lo que significa que son sensibles. (Cercenado y Saavedra, 2013. p.215)

### **Método de Macrodilución**

Es una técnica en la cual se utiliza una combinación microorganismo/antimicrobiano o sustancia por analizar para cada bacteria en tubos estériles. El primero es el que contiene la concentración más alta de la sustancia por analizar, luego de esto se realiza una dilución a la mitad de la solución madre y así sucesivamente hasta que se obtiene la cantidad deseada de diluciones. Para cada dilución se debe emplear un instrumento diferente generalmente pipeta. (Picazo, 2013. p.21)

### **Método del Epsilon test**

Este método es también conocido como E-test, donde se puede indicar la concentración inhibitoria mínima (CMI) de forma directa en disco. Esta técnica consiste en colocar una tira de papel filtro donde se coloca en un gradiente la sustancia por analizar en forma de gradiente. Para colocar las tiras en las placas petri con el inóculo, se sigue el procedimiento normal de difusión, ya que una vez colocado el microorganismo se introduce la tira E-test sobre el agar. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica, donde se establece que la CMI corresponde en el valor comprendido entre los extremos de inhibición de la tira. (Picazo, 2013, p.8)

## **Plantas Medicinales**

Las plantas con características medicinales fueron las primeras utilizadas para tratar enfermedades, esto se hacía de forma empírica, ya que consistía en diferenciar las plantas que mataban de las que curaban estos conocimientos primeramente se transmitían de forma oral luego por medio de escritura. No fue hasta el siglo XIX que se realizaron los primeros análisis químicos sobre los principios activos que se obtenían por medio de los extractos vegetales esto fue posible con la invención del microscopio y el avance en la química. (Batz, Cardona, Castillo, Godoy y Jom, 2014)

La medicina herbaria se le denomina al uso terapéutico de plantas medicinales para que sustituyan las medicinas farmacéuticas o también se tienden a la combinación de ambas prácticas. Lo más utilizado son los extractos de las distintas plantas para la fabricación de las alternativas terapéuticas y así mejorar la vida de los pacientes. También se establece que según la OMS los medicamentos herbarios abarcan las hierbas, material herbario,

preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, o todos aquellos que poseen principios activos de plantas o algún tipo de material vegetal, con uso conocido y ampliamente eficaz. (Gallegos, 2016)

Según Torres, Ortiz y Valdivia (2012), la calidad de la materia prima es fundamental para la industrialización de las plantas medicinales, sin embargo, en algunos casos es necesario el cultivo racional de las mismas para poder justificar la recolección de drogas vegetales de buena calidad y en cantidades suficientes, a partir de plantas silvestres. También es importante, efectuar la recolección en el momento adecuado y un esmerado procesamiento post-cosecha, especialmente en lo que se refiere a la desecación y al almacenamiento, así como un conocimiento certero de las características farmacobotánicas.

### **Byrsonima crassifolia (Nance)**

La planta cuyo nombre científico es *Byrsonima crassifolia*, conocida comúnmente como Nance, pertenece a la familia Malpighiaceae, el cual presenta aproximadamente 63 géneros y 1100 especies, posee un fruto con sabor agridulce de exquisito sabor, aunque es utilizado de distintas formas en la industria. Este árbol es originario de América tropical y se considera nativo de México específicamente. (Moreno, 2015.p.2)

Este árbol mide aproximadamente 2 a 15 metros de altura, presenta una copa abierta, redonda o extendida, el tronco es cilíndrico con diámetro normal de 30 a 40 cm, con ramas ascendentes; la corteza presenta escamas de color café que oscila entre oscuro y claro, que contrarresta con la externa que es un color más rosado. Las hojas generalmente son alargadas, de 5 por 2 hasta 15 por 7.5 cm, tiene forma elíptica, margen entero, la punta aguda o redondeado color verde oscuro. (Moreno, 2015. p.3)

El nance es un árbol de amplia distribución, sin embargo, este recurso frutícola de Mesoamérica es poco estudiado. Contiene hojas comúnmente alargadas, decusadas, simples y elípticas, de dimensiones variables, con margen entero, ápice agudo o redondeado y base aguda. Su consistencia es coriácea y el envés está cubierto por tricomas grisáceos o rojizos. Los pecíolos varían de 5 a 25 mm de largo, con yemas de 3 a 7 mm, agudos y cubiertos por dos estípulas ferruginosas. Poseen una estípula intrapeciolar ovada, de 2 a 5 mm de largo, pubescente y persistente. (Avitia et al, 2010. p.15)

## Hojas

Histológicamente, la hoja está formada por tres sistemas de tejido: dérmico, fundamental y vascular. Microscópicamente se observa la Epidermis que está constituida por células epidérmicas, células oclusivas de los estomas, acompañadas o no de células subsidiarias, tricomas, etc. Los estomas también presentan diversas formas tales como anomocíticos, anisocíticos, paracíticos y diacíticos. El Mesófilo ocupa la parte media de la hoja y sus límites son la epidermis. Puede ser homogéneo o diferenciado en un parénquima en empalizada y esponjoso. Además, el sistema vascular presenta traqueadas y vasos como elementos conductores y los tejidos de sostén: formado por colénquima. (Avilés, 2015)

Se define su consistencia, si son duras, blandas, coriáceas, membranáceas, papiráceas, carnosas o suculentas y su forma observando el ápice, base, borde, contorno, nerviación, simetría, presencia o ausencia de pecíolo, simple o compuestas, anexos, según clasificaciones botánicas. La superficie de la lámina determinando si es lisa, sedosa, áspera, glabra pubescente, rugosa, ondulada, hirsuta o verrucosa. El pecíolo, si está presente, puede ser estriado, liso, rugoso, piloso o alado. (Avitia et al, 2010)

Las hojas, son opuestas tienen peciolo, de 8 a 15 mm de largo, la parte inferior es ocre pálido con limbos coriáceos, las hojas son ovales u oblongo-elípticas, de 8 a 20 cm de largo y de 4 a 7 cm de ancho, pero variables en medida. En algunos casos son agudas o acuminadas, redondeadas y apiculadas en el ápice, agudas u obtusas en el envés y esparcidas o densamente tomentosas, laxas de pelos rojos o grisáceos. (Avilés, 2015)

La copa es amplia y abierta o irregular. con hojas alargadas, decusadas, simples; láminas de 5 a 15 cm de largo por 2 a 7.5 de ancho, elípticas con el margen entero; verde oscuras y casi glabras en el haz y verde amarillentas grisáceas pubescentes en el envés. Algunas propiedades diuréticas y antigonorréicas, eritema, erisipela, estomacal, vómito de sangre, hemorroides, dolor de cabeza y garganta, purgante, desinflamatoria, hipoglicemiante. (Avitia et al, 2010)

El té hecho con pequeñas hojas es usado como antidisentérico, afrodisíaco, astringente y para tratar infecciones de la piel, fiebres y hepatitis. Los extractos en alcohol etílico de frutos y hojas han demostrado tener actividad in vitro contra *Eschechia coli* y

*Staphylococcus aureus*. Además, de las hojas se han descrito, saponinas, esteroides insaturados, cardenólido, bufadienólidos, flavonoides, leucoantocianinas, taninos, triptenoides y polifenoles. (Avilés, 2015)

### **Corteza**

El árbol de nance, además de ofrecer frutos deliciosos y formar parte de nuestra tradición y economía, es también una especie muy importante en el medio natural, con una variedad de usos muy interesantes tales como antiparasitaria, astringente, antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiinflamatoria, antitusiva y antipirética. (Torres, Ortiz y Valdivia, 2012)

Es un árbol o arbusto perenne, caducifolio, que habita en bosques secos, es de rápido crecimiento, alcanzando tamaños desde 5 hasta 10 m de altura, con una copa generalmente amplia, hojas simples, verde oscuras, con margen entero, de 5 a 15 cm de largo. La superficie externa puede ser lisa, irregular, estriada; mientras que la interna puede ser estriada, fibrosa, con puntuaciones debidas a la presencia de cristales. Además, el olor y sabor será característico de la especie analizada. (Delgado et al, 2013)

Microscópicamente puede observarse la peridermis que está constituida por una o varias capas de súber, en este último caso se observa el ritidoma, el felógeno y la felodermis. El floema primario y secundario el cual el primero es poco aparente y el secundario presenta radios parenquimáticos y constituye un valor diagnóstico por la gran cantidad de fibras, cristales de oxalato de calcio, esclereidas, estructuras secretoras, conductos laticíferos, etc. (Torres, Ortiz y Valdivia, 2012)

La decocción de corteza es activa contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *T. rubrum*. De cinco órganos del árbol, se demostró que la corteza es la más activa contra bacterias y el etanol el mejor solvente por bioactividad y rendimiento; las bacterias más sensibles fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella flexneri* y *Streptococcus pyogenes*. El extracto de la planta completa no tiene actividad insecticida. El extracto etanólico tiene buena actividad nematocida. (Pastor, 2014)

La tintura de la corteza es activa contra *Salmonella flexneri* y *S. typhi*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* y *S. pyogenes*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* y los mejores disolventes para la extracción son etanol y acetona. Estos contienen entre el 26 y 28 por ciento de taninos, ácido oxálico, glucósidos, flavonoides, saponinas, sesquiterpenlactonas, triterpenos y sustancias solubles en alcohol. (Pastor, 2014)

### **Extracción**

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente aromáticos y generalmente ligeros, con una densidad inferior a la del agua. A diferencia de los aceites vegetales son volátiles y su textura no es grasa. Son insolubles en agua y otros disolventes polares, pero solubles en alcohol y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Estos aceites no son sustancias puras, sino una mezcla de compuestos orgánicos volátiles y de carácter aromático que se pueden encontrar en algunas familias de plantas. Normalmente, las plantas que se usan con mayormente para la obtención de estos aceites contienen de media en torno al 0,5 -5% en masa de aceite respecto a toda la planta. (Casado, 2018)

Según Venegas (2016), en muchos casos el procedimiento comprende el proceso de extracción y uno de recuperación del disolvente utilizado, donde este último (destilación o arrastre químico), es el más difícil de recuperar que la misma extracción. La separación de una mezcla de sólidos en el cual uno de los compuestos es soluble en un disolvente, se puede realizar añadiendo la misma en un extractor, en frío, o en caliente, agitar o triturar y separar por filtración la disolución final que contiene el producto extraído, así como también la fracción que contiene las impurezas. Existe una extracción sólido- líquido continuo y discontinuo siendo la última mucho más eficiente.

Generalmente se distinguen 5 métodos de extracción diferente: arrastre por vapor, destilación agua-vapor, hidrodestilación, extracción con solventes y extracción por prensado. El método de arrastre por vapor se lleva a cabo con vapor sobrecalentado que penetra la materia vegetal a presión, la misma que rompe las células de la planta y arrastra los volátiles que se condensan al atravesar el condensador donde se distinguen la presencia de dos fases inmiscibles, una acuosa y otra orgánica. Una condición importante en este método es que el componente volátil sea insoluble en agua, para que de esa forma el producto destilado forme dos fases al condensarse. (Venegas, 2016)

En la destilación agua-vapor se emplea vapor húmedo que proviene de agua en ebullición el cual traspasa el material que se encuentra suspendido encima y apoyado sobre una malla. En este método se pueden utilizar hojas, tallos, rizomas y raíces. El rendimiento es bueno y el costo es bajo, por lo que es la técnica más usada en la industria de aceites esenciales. Caso contrario sucede con la hidrodestilación, la cual se diferencia porque la materia por destilar se sumerge por completo en el agua y la generación del vapor se produce del recipiente de destilación. Los aceites producidos bajo este proceso, son coloreados y con cierto olor a quemado, por lo que es recomendable una etapa de refinación posterior a la extracción. (Venegas, 2016)

Para la extracción con solventes es necesario solventes con puntos de ebullición bajo, ya que así se evita la degradación de la muestra. Además, en este proceso, el material por utilizar ya sea sólido, líquido, o ambos, debe estar en agitación, para lograr una mejor eficiencia en la operación. Los disolventes utilizados en este método, se filtran y se evaporan a presión de vacío y los restos de estos, se deben separar a muy baja temperatura. La principal característica en la extracción por prensado es que el vegetal es sometido a presión en prensas continuas con un tornillo a alta o baja presión, un extractor expeller y rodillos de prensa. (Venegas, 2016)

### **Maceración**

Según Peña (2019), para realizar un análisis de las propiedades medicinales en una droga vegetal, es necesario la implementación de técnicas más complejas las cuales permitan incorporar métodos reproducibles para cuantificar principios activos. Un ejemplo de lo anterior, es la maceración, la cual consiste en método sólido-líquido donde la materia vegetal, es soluble en el líquido de extracción y además es cortado en trozos más pequeños, para ser colocados en recipiente con el solvente indicado según su polaridad. (p.58)

Los solventes que se utilizan para el método de maceración se deben dejar en reposo o en agitación continua a una temperatura ambiente durante los días que sean necesarios según la materia vegetal que se extrae (generalmente de 5 a 7 días). Además, otra de las formas de obtener la extracción, es realizando la combinación de distintos solventes, tales como: Metanol, cloroformo y hexano, los cuales pueden hacer el método para obtener la muestra de forma directa. (Peña, 2019, p.58)

### **Destilación a Presión Reducida (Rotavapor)**

Otro de los métodos que se utilizan para la optimización de la muestra es la destilación a presión reducida, la cual se lleva a cabo en un equipo llamado rotavapor, donde se genera vapor mediante las variaciones de temperatura y/o presión y así poder aumentar las concentraciones del soluto presentes en el líquido. Además, para conseguir un mejor desempeño se utiliza una bomba de vacío, con el fin de reducir la presión dentro del matraz de destilación, de ese modo es posible realizar el paso de una muestra líquida al estado gaseoso utilizando una temperatura menor. (Peña, 2019, p.61)

**Figura 6. Equipo de Destilación a Presión Reducida Mediante el Rotavapor.**



Fuente: Tomado de <https://www.southernlabware.com/yamato-re301-aw-rotaryevaporator-bm-500-water-bath-4l-glassware-a-115v-12a.html>

### **Liofilización**

La liofilización es una técnica compleja donde el material utilizado puede almacenarse a temperaturas altas como la temperatura ambiente y no sufre degradación. Además, puede ser operado en un ambiente controlado, por lo que disminuye considerablemente la probabilidad de contaminación. Ya que los productos liofilizados poseen una elevada superficie, la reconstitución de estos se puede realizar de manera eficaz y veloz, lo que facilita su administración inmediata en vacunas y anticuerpos de emergencia. (Ramos, 2017, p.59)

El proceso de liofilización inicia con la etapa de congelación en la cual se empieza enfriando las bandejas sobre las cuales se colocan los viales de muestras a una temperatura de congelación deseada y constante para mantener el equilibrio. La muestra se enfría hasta que se produzca la nucleación del hielo, donde posteriormente los cristales del hielo comienzan a aumentar de tamaño para finalmente originar la congelación de la muestra. Una vez terminado el enfriamiento, la mayor parte del agua se ha separado del soluto, por lo que se dice que la etapa de congelación, es el mayor proceso de deshidratación en la liofilización. Generalmente esta etapa es la que afecta el rendimiento y la calidad del producto final. (Ramos, 2017, p.60)

Seguidamente se da la etapa de sublimación del agua, la cual se puede realizar mediante dos formas de secado: primaria y secundaria. La mayor cantidad de agua se extrae en la primera etapa, ya que se reduce la presión en la cámara y se eleva la temperatura de la bandeja, para generar el calor que se eliminó en la sublimación del hielo transfiriendo el vapor del agua al condensador, donde es retenido por placas frías por cristalización. La etapa secundaria es donde se seca el agua no congelable que no se eliminó en el proceso anterior. La misma se debe suprimir por desorción a temperaturas altas que rondan entre los 20 a 40 grados celsius. (Ramos, 2017, p.61)

La extracción de metabolitos presentes en materias primas vegetales es cada vez más aplicada por la ciencia por su valor como fármacos o alimentos y el pensar en utilizarlos en la formulación de bebidas funcionales dará un valor adicional a las mismas. La importancia de los compuestos fenólicos y su demostrada efectividad como agentes antioxidantes es considerada como un aporte en la nutrición de las personas. (Alcívar, Bravo, Dueñas, Sacon y Villanueva, 2016)

### **Técnicas de Identificación y Cuantificación de Fitoquímicos**

Estas técnicas son de mucha importancia para la determinación de los componentes químicos que presentan las plantas, esto con el fin de establecer y confirmar una posible actividad farmacológica como antimicrobiana. Para esto se utilizan diferentes técnicas instrumentales para realizar la separación, identificación y cuantificación de principios activos en mezclas o extractos. (Cevallos, 2018, p.38)

## **Métodos Químicos**

### **Tamizaje fitoquímico**

A pesar de que se ha ido modernizando métodos que se utilizan para identificar los metabolitos que se encuentran en las plantas, las técnicas clásicas como los ensayos fitoquímicos constituyen una forma segura para estas determinaciones al poder realizar análisis cualitativo de los extractos, esto porque se pueden obtener datos preliminares acerca de su composición. El tamizaje fitoquímico se trata de obtener extractos de las plantas con los disolventes correctos. Después de la extracción se realizan las reacciones necesarias como coloración las cuales son las más sensibles, reproducibles y de menor costo. (Peña, 2019, p.62)

#### **1. *Taninos***

Es un grupo de compuestos químicos que presentan alto peso molecular, pueden contener azúcares. Tienen la capacidad de unión a las macromoléculas que esto ocasiona que precipiten la celulosa, pectinas y proteínas, además también precipitan las glicoproteínas que se encuentran en la saliva y esto ocasiona que desaparezca su acción lubricante, lo que proporciona su propiedad astringencia y aspereza al unirse con las proteínas de la piel de los animales, lo que evita su putrefacción y la convierte en cuero. (Lima y Morales, 2014, p.16)

#### **2. *Almidón***

Se considera un glúcido complejo y es el más importante de los que fabrican los vegetales, además de catalogarse como la principal fuente de reserva de carbohidratos de las plantas. Tiene como característica importante que es insoluble en agua cuando está frío, pero si se aumenta su temperatura esta se hincha y se convierte en el denominado engrudo. (Lima y Morales, 2014, p.16)

#### **3. *Alcaloides***

Los alcaloides son química y biológicamente muy heterogéneas, son las sustancias secundarias más representativas, numerosas y diversas de las plantas. Estas sustancias son nitrogenadas, con características básicas, origen vegetal y acción fisiológica medicinal o

venosa. Son utilizados en el área farmacológica como estimulante cardíaco y cerebrales, sin embargo, se debe tener cuidado porque si la dosis aumenta la actividad motora disminuye y termina ocasionando sueño. (Lima y Morales, 2014, p.17)

#### **4. Flavonoides**

Es uno de los dos grandes grupos de compuestos fenólicos junto con los ácidos fenólicos, Son compuestos de flavonas y sus derivados. Estos son los encargados de proporcionar el pigmento amarillo que se observa en las secciones verdes de la planta junto a la clorofila y los carotenoides. Como características farmacológicas se establecen en el fortalecimiento de capilares sanguíneos, cardiotónico, hemostático y antiinflamatorio. (Lima y Morales, 2014, p.17)

#### **5. Saponinas**

Son derivados terpénicos que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas. Estos compuestos generalmente se emplean como agentes limpiadores y como espumantes y son excelentes emulsivos. Un aspecto en el que se debe de tener cuidado, es que presentan como desventaja el producir hemólisis de glóbulos rojos si se inyectan directamente en sangre. (Lima y Morales, 2014, p.18)

#### **Prueba de Sólidos Totales**

Esta prueba está elaborada para determinar la cantidad de sólidos totales que están contenidos en la materia disuelta o suspendida y que se encuentran presentes en el agua o en algún otro tipo de solvente después de la evaporación de una muestra y su consecutivo secado en estufa a temperatura definida. Se debe tener en cuenta es que los datos obtenidos se pueden ver afectados tanto por la temperatura, así como por la duración de la desecación. Esta prueba se basa en una medición cuantitativa del incremento de peso que experimente una cápsula previamente tarada tras la evaporación de una muestra y secado a peso constante entre 103 a 105°C. (Argandoña y Macías, 2013, p.33)

### **Secado en estufa**

El secado en estufa se da gracias a un aumento de la temperatura que incrementa sensiblemente la presión de vapor en el aire, por esto posibilita que una mayor cantidad de agua presente en la muestra permanezca en fase vapor. Además, manteniendo el volumen constante de muestra, la parte acuosa presenta menor humedad relativa conforme se aumenta la temperatura. Si a lo anterior se le agrega la recirculación forzada que puede introducirse en una estufa de secado, todo esto favorece al intercambio de humedad y provoca el secado de la muestra por analizar. (Di Maio, Píttori, Taus y Villagrán, 2012, p.120)

*Figura 7. Estufa*



Fuente: Tomado de <http://sudelab.cl/marketing/mailling-oct-2013/oferta-oct.pdf>

### **Método de Identificación de Espectroscopia Infrarroja**

Esta técnica infrarroja (IR), se utiliza para analizar lo que es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética infrarroja y la materia. El principio básico es la interacción de la radiación infrarroja con una molécula, la energía incidente a una frecuencia específica se absorbe cuando coinciden con la frecuencia de vibración de un movimiento molecular específico, produciendo vibración en los enlaces químicos de la materia, lo que genera un cambio neto en el momento dipolar intrínseco de la molécula. (Blanco y Caballero, 2015, p.32)

Se conoce que los átomos dentro de una molécula están en constante movimiento unos respecto de otros, siempre vibrando alrededor de los enlaces que los unen a frecuencias

constantes y específicas conocidas como estados de vibración. Un aspecto por tomar en cuenta es que mientras más pequeña sea la masa del átomo, mayor será la frecuencia de sus vibraciones. Los enlaces que caracterizan los grupos funcionales tienen frecuencias específicas a las cuales absorben y bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro. (Blanco y Caballero, 2015, p.32)

Lo anterior genera un espectro de absorción característico para una molécula dada, como si fuera una huella digital que revela información detallada acerca de la estructura y composición de una muestra, ya que no existen dos compuestos que absorben exactamente en la misma forma. Por consiguiente, la absorción o la falta de absorción en la región infrarroja se puede usar para identificar los tipos de grupos funcionales presentes en una molécula. (Blanco y Caballero, 2015, p.33)

### **CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO**

En esta sección se describen las técnicas que se emplearán para realizar la recolección de datos, también se define el tipo de investigación que se va a desarrollar, además, de establecer cuál será el enfoque, diseño, variables, instrumentos y los procesos de recopilación de datos que presentará este trabajo.

#### **Enfoque**

Según Baptista, Hernández y Fernández (2014), se establece el enfoque de la investigación como cuantitativo, donde describe:

En el enfoque cuantitativo el orden es riguroso, aunque desde luego, podemos redefinir alguna fase. Parte de una idea que va acotándose y, una vez delimitada, se derivan objetivos y preguntas de investigación, se revisa la literatura y se construye un marco o una perspectiva teórica. De las preguntas se establecen hipótesis y determinan variables; se traza un plan para probarlas (diseño); se miden las variables en un determinado contexto; se analizan las mediciones obtenidas utilizando métodos estadísticos, y se extrae una serie de conclusiones respecto de la o las hipótesis. (p.4)

Como lo establecen estos autores, esta investigación es de tipo cuantitativo esto porque es una idea que se va desarrollando hasta alcanzar una perspectiva teórica. En este trabajo se desea realizar la extracción de la corteza y hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance), con el fin de poder analizar y evaluar ambas extracciones mediante datos numéricos, que se obtendrán por pruebas específicas que se le realizarán y así determinar su posible actividad antimicrobiana y antifúngica. Luego de la elaboración de este estudio se pretende poder darle respuesta tanto a la pregunta de la investigación como a su hipótesis.

### **Diseño**

El diseño de esta investigación es de tipo experimental, donde Baptista, Hernández y Fernández (2014) definen:

La esencia de esta concepción de experimento es que requiere la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados. Una acepción particular de experimento, más armónica con un sentido científico del término, se refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador. Los experimentos manipulan tratamientos, estímulos, influencias o intervenciones (denominadas variables independientes) para observar sus efectos sobre otras variables (las dependientes) en una situación de control. (p.129)

Según lo establecido por los autores mencionados, el método experimental es el adecuado para poner a prueba hipótesis de relaciones causales. Esto se llevará a cabo en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una situación o acontecimiento particular, en este caso, determinar la capacidad antimicrobiana y antifúngica en la corteza y hojas del Nance y además determinar si es posible categorizar el extracto con mayor sensibilidad, como de amplio espectro.

El alcance con que cuenta esta investigación es explicativa, según Baptista, Hernández y Fernández (2014) establecen:

Los estudios explicativos van más allá de la descripción de conceptos o fenómenos o del establecimiento de relaciones entre conceptos; es decir, están dirigidos a responder por las causas de los eventos y fenómenos físicos o sociales. Como su nombre lo indica, su interés se centra en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta o por qué se relacionan dos o más variables. (p.91)

El estudio explicativo proporciona un sentido de entendimiento del fenómeno en estudio, ya que, procura entender una o varias causas y solucionar el problema general, así como también, generar pruebas confiables de la relación con el fenómeno, y dar una respuesta fidedigna al tema de interés central en el que se desarrolla la investigación. Este diseño se orienta a expresar el evento y por qué esto ocurre, así como los aspectos que tengan que ver con él.

### Variables

Objetivo Específico	Variable	Definición conceptual	Indicador	Instrumento
Verificar la capacidad antimicrobiana de los extractos de corteza y hojas del Nance frente a bacterias Gram negativas: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> y Gram positivo: <i>Staphylococcus aureus</i> , para la valoración de su actividad mediante el método difusión en agar.	Capacidad antimicrobiana	Es la capacidad con que cuenta una sustancia para ya sea inhibir el crecimiento microbiano conocido como poder bacteriostático o eliminar algunos de ellos el cual sería un poder bactericida	Concentración mínima inhibitoria medida en g/mL  Halo de inhibición en mm	Método del Epsilon test  Difusión de agar

<p>Determinar su actividad antifúngica frente al hongo de <i>Candida albicans</i> para la calificación de su sensibilidad, mediante prueba de Agar.</p>	<p>Actividad antifúngica</p>	<p>Se le puede denominar a la actividad antifúngica a toda aquella sustancia que elimina o evita el crecimiento de hongos, que pueden ocasionar enfermedades en la población. Si inhibe el crecimiento de los hongos cuenta con un poder fungistático y si por el contrario los elimina su poder es fungicida.</p>	<p>Concentración mínima inhibitoria medida en g/mL</p>	<p>Método del Epsilon test  Difusión en agar</p>
<p>Estimar la actividad antibacteriana y antifúngica que presentan los extractos de hojas y corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i> (Nance), para la categorización de amplio espectro.</p>	<p>Amplio espectro</p>	<p>Se cataloga a un antibiótico como de amplio espectro cuando este ataca tanto a bacterias gram positivas como gram negativas por igual.</p>	<p>Halo de inhibición en mm</p>	<p>Difusión agar</p>

### Proceso de Recolección de la Planta

La materia prima tanto de corteza como de hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance), se obtuvieron de una misma zona geográfica correspondiente a Esparza y esta se extrajo de un árbol longevo y otro joven. Se priorizó que el material que se utilizara fuera de un árbol sano, que no tuviera indicios de ningún tipo de plaga, por lo que su mantenimiento debe ser constante.

## Hojas

Con respecto a las hojas se realizó una búsqueda en los árboles seleccionados para la recolección y se escogieron las hojas maduras como tiernas que mostraban mejor aspecto, buena coloración y que no se evidenciara sequedad en ninguna parte de ellas. Una vez realizado lo anterior se desprendieron de las ramas, se procedió a realizarles un lavado con agua unidad por unidad para asegurarse de eliminar cualquier impureza externa. Posteriormente al lavado, se le realizó un secado de hoja por hojas con toallas de papel esto con el fin de quitar el exceso de agua que pudieran presentar. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente por un periodo de 12 horas.

Por último, se trituró manualmente las hojas para que adquirieran un menor tamaño y así poder maximizar su rendimiento al momento de la extracción por maceración.

**Figura 8. Muestra de Hojas de *Byrsonima crassifolia***



Fuente: Elaboración propia, 2020.

## Corteza

Para la obtención de la otra materia prima, se extrajo la muestra de los mismos árboles que en el caso anterior, esto con el fin de proporcionar un mejor análisis. Una vez obtenido este material, se realizó la separación de la capa externa del tronco la cual corresponde a la corteza. Posteriormente se disminuyó el tamaño de la muestra cortándolo en trozos aproximados de 2 centímetros, y los mismos se dejaron reposar por 12 horas, para la obtención del extracto por medio de maceración

**Figura 9. Muestra de Corteza de *Byrsonima crassifolia***



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### **Materiales y Técnicas**

A continuación, se describen los materiales y equipos utilizados para la obtención de los extractos etanólico al 95% y acuoso de corteza y hojas de Nance.

#### **Materiales**

- 2 probetas de 1000 mL
- 8 beakers de 2000 mL
- 2 termómetros de mercurio
- 2 soportes para termómetros de mercurio
- 2 calentadores-agitadores marca corning
- 1 balón de 1000 mL
- 4 coladores
- 2 embudos
- 4 embudos de espiga larga

- Algodón
- 1 pizeta con agua destilada
- 1 beaker de 150 mL
- 7 beakers de 250 mL
- Papel toalla
- Papel parafilm
- Papel aluminio
- 2 Balanzas granatarias con capacidad de 2000 g marca Ballar RAD WAG
- 1 tabla de picar
- 4 botellas color ámbar con capacidad de 4 litros
- 2 pinzas largas
- 2 agitadores de vidrio
- 1 bureta de 50 mL
- 1 balanza analítica con capacidad de 250 g marca Adam
- 10 tubos de ensayo
- 1 soporte para bureta
- 3 probetas de 5 mL
- 8 goteros
- 1 espátula acanalada
- 4 viales pequeños
- 3 pinzas para tubo de ensayo
- 2 pipetas graduadas de 1 mL

- 2 peras
- 20 viales de 1.5 mL

#### Equipos

- Rotavapor marca Yamato
- Mangueras de caucho para conexiones
- Bomba de inmersión para recirculación de agua por el condensador
- Liofilizador: marca VirTis Sp Scientific, modelo Sentry 2.0
- Autoclave

#### Reactivos

- Etanol al 95%
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico al 2%
- Dragendorff
- Metanol
- Limaduras de magnesio
- Ácido Clorhídrico concentrado
- Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ )
- Lugol (Disolución de  $\text{I}_2$  / KI)

#### **Método de Extracción por Maceración de Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

- Una vez que se extrajo la corteza del árbol, se procedió a picarla con el fin de reducirla a trozos más pequeños.
- La corteza picada, se dejó reposar 12 horas a temperatura ambiente.
- Una vez transcurridas las 12 horas, se pesó la corteza en dos beakers de 2000 mL, a uno de ellos se le agregó 774,25g y al otro 900g del material

- Una vez pesada, cada muestra se colocó en una botella de color ámbar con capacidad de 4L.
- Al recipiente que contenía la muestra de 774,25 g se le adicionó como solvente 1936 mL de agua y a la muestra de 900 g se le vertió 2250 mL de etanol al 95%
- Seguidamente se cubrió con papel aluminio de forma que abarcara todo el contenedor y se dejó reposar la que contiene agua por un lapso de 3 días y la de etanol por 7 días, ambas muestras se dejaron en reposo el total de tiempo correspondiente a temperatura ambiente.

**Figura 10. Trozos de Corteza de *Byrsonima crassifolia***



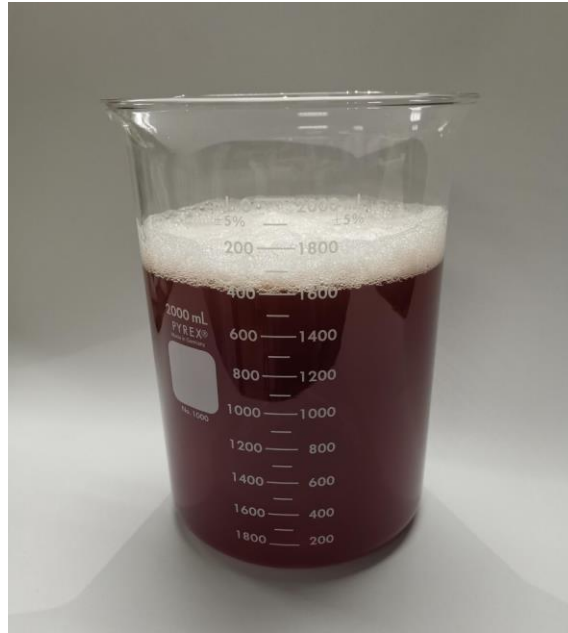
Fuente: Elaboración propia, 2020

#### **Extracto acuoso corteza**

- Una vez transcurridos los 3 días, se procedió a separar la corteza del agua mediante el uso de un embudo y algodón.
- Luego se filtró la muestra de agua con ayuda de un embudo y algodón, para eliminar la mayor cantidad de material insoluble presente.
- Inmediatamente se pasteurizó la muestra obtenida, para realizarlo esta se colocó en un beaker de 2000 mL, el cual se calentó en una plantilla a una temperatura de 80°C por 10 minutos, posterior a esto, se enfrió la muestra llevándola a refrigeración a 9°C para evitar el crecimiento de microorganismo.
- Posterior a estos de estos procedimientos se obtuvo 1600 mL de extracto acuoso de corteza.

- Se colocó en un beaker, cubierto por parafilm y se guardó en refrigeración a una temperatura de 9°C por 3 días.

**Figura 11. Extracto Acuoso de Corteza de *Byrsonima crassifolia* Después de 3 Días de Reposo**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### **Extracto etanólico corteza**

- Una vez transcurridos los 7 días, se procedió a retirar la corteza del etanol, mediante el uso de un embudo y algodón.
- Luego se filtró la muestra de etanol con ayuda de un embudo y algodón, para eliminar la mayor cantidad de material insoluble.
- Se obtuvo 1885 mL del extracto.
- Se colocó en un beaker, se cubrió con papel parafilm y se conservó en refrigeración a una temperatura de 9°C.

**Figura 12. Extracto Etanólico de Corteza de *Byrsonima crassifolia* Después de 7 Días de Reposo**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Método de Extracción Por Maceración de Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

- Una vez recolectadas las hojas, se le realizó un lavado manual a cada una de ellas para quitar la mayor cantidad de impurezas.
- Posteriormente se secó unidad por unidad con ayuda de papel toalla, para eliminar el exceso de agua.
- Seguidamente se dejó reposar la muestra vegetal por un lapso de 12 horas.
- Una vez transcurrido el lapso de reposo, se procedió a triturar las hojas de forma manual para reducir su tamaño.
- Se dividió la muestra en 700 g y 543,92 g, las cuales se incorporaron cada una a dos botellas ámbar de 4 L de capacidad.
- Posterior a lo mencionado, se le adicionó 2110 mL de agua a la botella que contenía 543,92 g de la muestra y 2000 mL de etanol al 95% a la que contenía de 700 g.
- Seguidamente se cubrió con papel aluminio la totalidad de las botellas y se dejaron reposar a temperatura ambiente, la etanólica por 7 días y la acuosa por 3 días.

**Figura 13. Trozos de Hojas de *Byrsonima crassifolia***

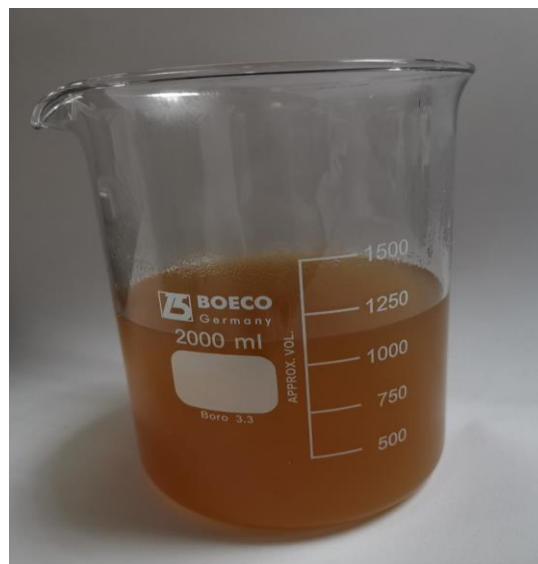


Fuente: Elaboración propia, 2020

#### **Extracto acuoso de hojas**

- Luego de transcurridos los 3 días, se eliminó, con ayuda de un embudo y algodón, la materia sólida, se recolectó solamente el líquido y así poder descartar todo el material insoluble de la muestra.
- Posteriormente el filtrado se colocó en un beaker de 2000 mL, se situó sobre una plantilla a una temperatura no mayor de 80 °C y por un lapso de 10 minutos.
- Se obtuvieron 1150 mL del extracto acuoso de hojas.
- Finalmente se cubrió y se guardó en refrigeración a una temperatura de 9°C por 3 días.

**Figura 14. Extracto Acuoso de Hojas de *Byrsonima crassifolia* Después de 3 Días de Reposo**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### Extracto etanólico de hojas

- Una vez transcurridos los 7 días, se separó el extracto obtenido de las hojas.
- Posteriormente se filtró la muestra de etanol con ayuda de un embudo y algodón, para eliminar el material insoluble.
- Luego de este filtrado se obtuvo 1300 mL del extracto, el cual se tapó con papel parafilm y se guardó en refrigeración a una temperatura de 9°C.

**Figura 15. Extracto Etanólico de Hojas de *Byrsonima crassifolia* Después de 7 Días de Reposo**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### Método de Destilación a Presión Reducida (Rotavapor)

Se utilizó este método para trabajar los cuatro extractos con el fin de eliminar la mayor cantidad de solvente de la muestra, esto fue empleado tanto para los extractos acuosos como para los etanólicos.

**Figura 16. Equipo de Destilación a Presión Reducida Mediante el Rotavapor.**



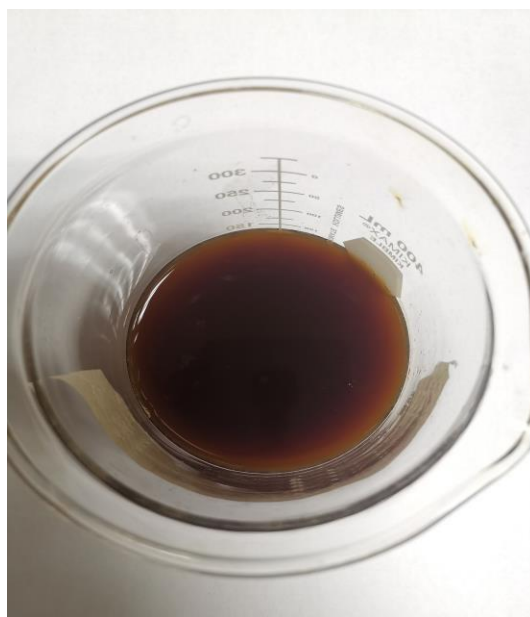
Fuente: Elaboración propia, 2020.

A continuación, se detalla cada uno de estos extractos:

### **Extracto acuoso de hojas**

- Se colocó el extracto acuoso de hojas en este equipo por 4 horas a una temperatura de 100 °C para eliminar la mayor cantidad de solvente posible.
- Una vez terminada la destilación del agua se obtuvo 150 mL de este extracto acuoso.
- Posteriormente se tapó la muestra con papel parafilm y se cubrió con papel aluminio completamente, se refrigeró por un periodo de un mes.

**Figura 17. Extracto Acuoso de Hojas de *Byrsonima crassifolia* Reposado Por un Mes.**

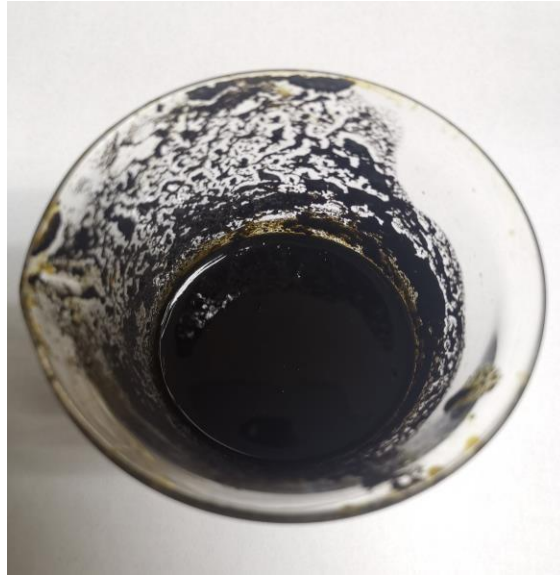


Fuente: Elaboración propia, 2020

### **Extracto etanólico de hojas**

- Para la muestra del extracto etanólico de hojas, se colocó en el rotavapor por un periodo de 3 horas a una temperatura de 80 °C para eliminar la mayor cantidad del solvente utilizado.
- Una vez eliminado este solvente se obtuvo 125 mL del extracto.
- El extracto obtenido se tapó en un beaker con papel parafilm, cubriéndolo con aluminio y se refrigeró por un mes.

**Figura 18. Extracto Etanólico de Hojas de *Byrsonima crassifolia* Reposado Por un Mes**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

#### **Extracto acuoso de corteza**

- Se colocó el extracto acuoso dentro del equipo, por un lapso de 10 horas a una temperatura de 100 °C para eliminar la mayor cantidad posible del solvente utilizado.
- El extracto resultante con un volumen de 178 mL se tapó en un beaker con papel parafilm, además de cubrirse con papel aluminio y se guardó en refrigeración por un mes
- Posterior a esto se pasó a un liofilizador para secar totalmente la muestra. Esto se realizó hasta obtener un polvo fino.
- Una vez secado totalmente se obtuvo una masa de 5,7210 g del extracto.

**Figura 19. Extracto Acuoso de Corteza de *Byrsonima crassifolia* Luego del Liofilizado**



Fuente: Elaboración propia, 2020

#### **Extracto etanólico de corteza**

- Se colocó el extracto en el rotavapor por 3 horas a una temperatura de 80 °C, esto con el fin de eliminar lo máximo posible del solvente utilizado.
- Una vez terminado este proceso, se obtuvo 200 mL del extracto etanólico.
- Este extracto se tapó en un beaker con papel parafilm, aparte de cubrirse con papel aluminio y se guardó en refrigeración por un mes.

**Figura 20. Extracto Etanólico de Corteza de *Byrsonima crassifolia* Reposado Por un Mes**



Fuente: Elaboración propia, 2020

## **Pruebas Físico-Químicas de los Extractos**

### **Prueba Alcaloides**

#### *Extracto etanólico y acuoso de corteza y hojas*

- Se midieron 2 mL del extracto etanólico en una probeta y se adicionaron a un tubo de ensayo.
- Posteriormente se le incorporó 1.5 mL de HCl al 2%
- Luego se le agregaron 2 gotas del reactivo de Dragendorff y se esperó a que hubiera un cambio de color, precipitado o algún grado de turbidez, etc.

### **Prueba Flavonoides**

#### *Extracto etanólico y acuoso de corteza y hojas*

- Se midieron 2 mL de cada uno de los extractos en una probeta y se adicionaron a un tubo de ensayo.
- Luego se adicionó 1 mL de metanol a cada una de las muestras.

- Posterior a esto se le agregó una punta de espátula de limaduras de magnesio a cada tubo.
- Por último, se llevaron las muestras a la capilla de extracción y a cada una se le adicionó 1 mL de HCl concentrado, hasta observar un burbujeo violento.
- Se observó si hubo cambio de coloración, formación de precipitado, turbidez o algún otro cambio.

### **Prueba Taninos**

#### *Extracto etanólico y acuoso de corteza y hojas*

- Se tomaron 2 ml de cada extracto y se colocaron en un tubo de ensayo.
- A cada una de las muestras se le adicionó 1 mL de agua, a una temperatura de 60°C y previamente medidos en una probeta.
- Luego se agregaron 5 gotas de FeCl<sub>3</sub> a cada uno de los tubos con las muestras.
- Cada muestra se observó para determinar si ocurría cambio de coloración.

### **Prueba de almidón (Lugol)**

#### *Extracto etanólico y acuoso de corteza y hojas*

- Se adicionaron 2 mL de cada extracto a cada uno de los 4 tubos de ensayo.
- A cada tubo se le agregó gota a gota el reactivo de Lugol (máximo 2 mL), hasta que se observó una coloración azul.
- Se observó para determinar si había cambio o no de coloración.

### **Prueba para saponinas (Espuma)**

#### *Extracto etanólico y acuoso de corteza y hojas*

- Se adicionaron 2 mL de cada extracto a cada tubo de ensayo, se tapó cada tubo con papel parafilm, se agitó y se dejó reposar por 20 minutos.
- Posterior al tiempo se observó si había espuma.

### **Prueba de Sólidos Totales**

Se realizó esta prueba por medio de la utilización de una estufa para los extractos etanólicos de la corteza y las hojas, así como acuoso de las hojas, por el contrario, para el extracto acuoso corteza, se llevó a cabo por medio de un liofilizador.

- Se tomaron 3 viales previamente pesados.
- A cada uno de estos viales se les agregó 2 mL de cada uno de los extractos tanto acuoso como etanólico.
- Posterior a esto se procedió a llevar las muestras contenidas en los viales sin tapa a una estufa por un periodo de 2 horas a una temperatura de 80°C o hasta observar que la muestra se encontrara seca.
- El vial frío con la muestra se pesó. A este peso se le restó el peso del vial solo, esto con el fin de determinar la cantidad total de sólidos en un volumen conocido.

### **Prueba de Sólidos Totales (Polvo Liofilizado)**

- En el caso de la muestra de extracto acuoso de corteza se le realizó un procedimiento extra el cual fue su liofilizado.
- A este equipo se le adicionó 178 mL el cual secó totalmente la muestra hasta obtener 5.7210g

### **Pruebas Antimicrobianas y Antifúngicas de los Extractos Etanólicos y Acuosos de las Hojas y de las Corteza Frente a las Bacterias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y Contra el Hongo de *Candida albicans*.**

En este apartado se analizó el posible poder antimicrobiano de los extractos etanólicos y acuosos tanto de corteza como de hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance) contra distintas bacterias y su valoración antifúngica frente al hongo *Candida albicans*. Las cepas tanto de bacterias como la del hongo fueron facilitadas por el Laboratorio Microlabs, bajo la supervisión del microbiólogo Dr. Roldan Ajun. De igual forma, los análisis microbianos se llevaron a cabo en este mismo Laboratorio, contando siempre con la vigilancia del Dr. Ajun. Los materiales necesarios para llevar a cabo las pruebas fueron facilitados por este laboratorio.

Como control positivo para las cuatro bacterias se utilizó el antibiótico de Levofloxacino, y en el caso del hongo analizado (*Candida albicans*) se contó como control positivo el Fluconazol. Otro aspecto por resaltar es que en cada análisis se evaluó también como blanco, los dos solventes que se utilizaron para realizar la extracción, en este caso se analizó el alcohol al 95% y el agua destilada.

## **Reactivos y Equipo Para Realizar las Pruebas Microbiológicas**

### **Equipo**

- Placas de Petri con agar estándar
- Papel toalla
- Regla con escala métrica
- Cámara de flujo laminar horizontal
- Micropipeta de 5 $\mu$ L
- Puntas estériles para micropipeta de 5 $\mu$ L
- Incubadora

### **Reactivos**

- Alcohol
- Cepa de *Staphylococcus aureus*
- Cepa de *Klebsiella pneumoniae*
- Cepa de *Escherichia coli*
- Cepa de *Pseudomona aeruginosa*
- Cepa de *Candida albicans*
- Extracto acuoso de la corteza

- Extracto acuoso de las hojas
- Extracto etanólico de la corteza
- Extracto etanólico de las hojas
- Disolución de Levofloxacino (control positivo del hongo)
- Acetonitrilo (Universidad Internacional de las Américas, Diluyente)
- Disolución de Fluconazol (control positivo del hongo)
- Ácido Acético Glacial (Universidad Internacional de las Américas, Diluyente)
- Alcohol 95% (Universidad Internacional de las Américas, Control)
- Agua destilada (Universidad Internacional de las Américas, Control)

### **Cultivos de las Distintas Cepas de las Bacterias, Así Como del Hongo**

Las cepas de las cuatro bacterias necesarias para realizar este análisis, fueron colocadas por un periodo de 24 horas para su correcto crecimiento, y asegurar una concentración elevada de ellas. De igual manera fue colocado el hongo; sin embargo, este último necesitó de un lapso mayor para crecer correctamente este fue de aproximadamente de 3 días. Posterior a esto se realizaron los distintos cultivos, tal y como se describe a continuación:

- En una cámara de flujo laminar se procedió a colocar el agar estándar en cada uno de los cinco platos petri, dejándolos reposar por un periodo de 5 minutos para la solidificación.
- Una vez transcurrido este tiempo, cada placa se dividió y rotuló en siete partes de tamaño lo más semejantes posible, teniendo la precaución de dejar un espacio de alrededor de un centímetro del extremo de la placa, esto para que la incorporación de los extractos tanto como los medios de control se realizarán de una manera sencilla.
- Posterior a esto, se tomó una punta de microtubo y se realizaron siete agujeros a cada placa, para poder adicionar los cuatro extractos, el control positivo, así como los dos blancos (agua destilada y etanol al 95%).

- Luego se procedió a realizar 4 rayados en forma de zigzag en cada placa con las bacterias y el hongo (una placa para cada bacteria y hongo). Para esta etapa se utilizó una torunda estéril para cada bacteria y otra para el hongo. Esta torunda se introdujo en el tubo de ensayo que contenía cada una de las bacterias y el hongo y se realizó las estrías en el agar con mucho cuidado de no romperlo.
- Seguidamente con ayuda de una micropipeta de 5 $\mu$ L, se adicionó cada extracto en el agujero que se había realizado. Se debe recordar que cada vez que se adicione un extracto a la placa se debe cambiar la punta de la micropipeta para así minimizar el riesgo de una contaminación cruzada. A todas las placas se les adicionó la misma cantidad de los extractos, así como el control positivo correspondiente en cada caso y los blancos, todos ellos en la misma posición en la misma placa para facilitar la lectura.
- Por último, se taparon cada una de las placas, y se procedió a introducirlas en una incubadora por un lapso de 48 horas. Una vez pasado este tiempo, se observaron y realizaron las lecturas de las placas.

**Prueba de Aumento al Doble, Cuádruple y Séxtuple de la Concentración Original del Extracto Acuoso de Corteza Para la Evaluación de su Posible Actividad Antimicrobiana Frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli* y Contra el Hongo de *Candida albicans***

- Se realizó el mismo procedimiento descrito correspondiente al crecimiento de las bacterias y el hongo.
- En esta ocasión se realizaron únicamente tres agujeros rotulados en la placa petri, esto porque solo se pretendió analizar el extracto acuoso de la corteza más concentrado. Por lo que en una posición se colocó el blanco correspondiente, en otro el control positivo para cada ocasión y por último el extracto concentrado.
- Las placas se prepararon de la misma forma que se describió para las pruebas con los extractos obtenidos sin el aumento a dos, cuatro y seis veces la concentración.
- Finalmente, al igual que en las muestras de concentración no aumentada, los cultivos se dejaron reposar por 48 horas, y se leyeron al final.

**Prueba de Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Extractos Etanólicos y Acuósos de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance) Empleando el Método del Epsilon test Frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans***

- Se tomaron dos papeles filtro, se cortaron en un total de 13 tiras pequeñas de un ancho de 1 cm y un largo de 7 cm.
- Las tiras se colocaron en un tubo con tapa rosca, y se esterilizaron mediante autoclave, luego se dejó reposar por 24 horas para el secado de las tiras.
- Posterior a esto, se tomó cada una de estas tiras con una pinza esterilizada y se colocó cada una en placas petri limpias y vacías.
- Seguidamente, se les adicionó 5 microlitros de cada una de las 5 diluciones realizadas a cada extracto, teniendo en cuenta que es una tira por extracto y los mismos se colocaron de mayor a menor concentración, de afuera hacia dentro de la placa.
- Se dejó reposar por 24 horas para asegurarse que estas estuvieran lo más secas posibles.
- Luego se inoculó como se menciona, placas distintas con cada bacteria y hongo, para colocarle encima cada tira. En cada placa se colocaron 3 tiras con los extractos impregnados que mostraron actividad, a excepción de la placa que contiene *Staphylococcus aureus* a la cual se le colocaron 4 tiras.
- Por último, se observó y midió el halo que presentó cada uno de ellos, para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)

#### **CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS**

En este capítulo se exhiben los resultados obtenidos durante el desarrollo de la investigación, junto con el análisis correspondiente. Para el desarrollo de esta sección se consideraron las variables derivadas de los objetivos planteados y que fueron expuestos en la introducción de este trabajo. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

##### **Recolección de la Muestra de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia***

Inicialmente se obtuvo cada muestra a partir de árboles previamente seleccionados, con el fin de utilizar unos que estuvieran sanos y con los cuidados necesarios para obtener resultados confiables y seguros esto basándose en que no se observarán plagas que pudieran

interferir en los resultados. Un aspecto importante que se tomó en cuenta, fue que se tomaron dos árboles de distinta edad para la obtención del material vegetal, ya que se observó que, al ser de mayor edad, la corteza era de un grosor superior y más abundante, esto favoreció porque se obtuvo una cantidad mayor de material así como se aumentó la posible obtención del extracto. Ambas muestras se recolectaron en el mes de noviembre del 2019.

Una vez obtenido el material vegetal, se procedió a realizar una selección de las partes de interés de la planta, que en este caso sería la recolección de las hojas y la parte externa del tronco, la cual correspondía a la corteza necesitada y el resto de materiales se desechó ya que no eran de utilidad para este trabajo. En lo concerniente a las hojas y corteza, se les realizó un lavado con agua para eliminar la mayor cantidad de impurezas que pudieran contener, posterior a esto se removió el exceso de agua con papel toalla y se permitió secar la materia extendida a temperatura ambiente para que se eliminara más fácilmente el agua durante de 12 horas.

Es importante recalcar que la muestra de hojas se trituró a mano esto con el fin de evitar al máximo posible la posible oxidación de los metabolitos que pudiera contener la planta y así generar el mayor rendimiento al momento de extraerlos. Otro método que se pudo haber empleado corresponde a la utilización de instrumentos de plástico para evitar esta reacción, esto porque los utensilios de metal degradan a una velocidad mayor estas sustancias.

### **Extracción del Material Vegetal**

Primeramente, se preparó y dividió tanto la corteza como las hojas en dos muestras de cada una, esto con el fin de obtener el material vegetal adecuado para realizar las cuatro extracciones planeadas. Se utilizó etanol como solvente para dos de las muestras (una de corteza y otra de hojas) y de igual manera se utilizó agua como disolvente para las otras dos muestras. El uso de estos dos disolventes tuvo como propósito establecer cuál de ellos brinda mejores resultados en el proceso de extracción de metabolitos activos.

En la selección de los solventes para el análisis se tomó como referencia el trabajo de Guerra y Pozo (2013), donde se utilizó etanol y agua para realizar cada una de las extracciones. Estas dos sustancias se catalogan como reactivos relativamente fáciles de adquirir, con poca o nula peligrosidad, y en los que se ha observado presentan mejor

desempeño en para cada uno de los procedimientos. Además, los autores mencionan que el método de extracción por maceración es el que mejor rendimiento ha presentado. A continuación, se detalla cada una de ellas:

### **Extracto acuoso de la corteza**

Para realizar este extracto se utilizó una masa inicial de material vegetal de 774,25 g, a los cuales se le agregó una cantidad adecuada de solvente, esto se determinó de acuerdo con lo establecido por Guerra y Pozo (2013), quienes mencionan la masa y el disolvente adecuado para realizar la extracción. Por esta razón se procedió a emplear una operación matemática conocida como regla de tres, en la cual al conocer la masa de la muestra por usarse aplicó dicha operación para conocer la cantidad adecuada por utilizar de solvente. Pasado el tiempo de reposo, se extrajo la parte líquida la cual se mostró de color rojizo y consistencia viscosa. Esta se pasteurizó para minimizar o evitar la proliferación de microorganismos no deseados en el extracto.

Una vez pasteurizado el extracto, se dejó reposar por un periodo de 5 días. Al cabo de este tiempo, el exceso de agua se eliminó mediante destilación a presión reducida empleando un rotavapor. Este equipo tiene como característica que permite realizar destilaciones rápidas, sencillas y sin afectar de manera drástica el compuesto, esto es gracias a su poder de evaporación y condensación de los disolventes empleados. La destilación se lleva a cabo, con ayuda de un balón evaporador rotativo bajo vacío (Leiva, 2015). En el rotavapor por medio de baño maría se procedió a evaporar la mayor cantidad del agua posible, a una temperatura de 100°C. Se obtuvo un volumen final del extracto de 178 mL, el cual mostró una consistencia mucho más viscosa que el inicial (antes del uso del rotavapor) y con partículas suspendidas.

Finalmente, al extracto anterior se le eliminó el agua por completo mediante liofilización, proceso que originó una muestra en forma de polvo fino, color café claro y una masa final de 5,7210 g.

### **Extracto acuoso de las hojas**

Para este extracto se utilizó una masa de 543,92 g de muestra vegetal, donde se le agregó la cantidad de agua necesaria para obtener la extracción. De igual manera que para el extracto acuoso de la corteza, se dejó reposar por tres días para lograr la extracción. Una vez

pasado este tiempo se visualizó la muestra, la cual tenía un color café, de consistencia bastante viscosa. Al igual que para el extracto de la corteza se colocó en un rotavapor para eliminar la mayor cantidad de agua por medio de la destilación a presión reducida. Una vez finalizado este proceso se obtuvieron 150 mL remanentes del extracto que mostró abundantes partículas en el medio.

#### **Extracto etanólico de la corteza**

En la obtención de este extracto se utilizó una muestra inicial de 900,00 g, a la cual se le adicionó 2250 mL del solvente, en este caso etanol. Una vez reposado, se obtuvo un extracto líquido de color rojizo oscuro y con una consistencia viscosa. Se procedió a eliminar la mayor cantidad de solvente por medio del rotavapor, se obtuvo un volumen total de 200 mL. Cabe destacar, que el extracto adquirido, se dejó reposar por un mes, por lo que la consistencia final estaba mayormente concentrada y con una apariencia más viscosa en su totalidad, así como abundantes partículas dispersas en él.

#### **Extracto etanólico de las hojas**

Para esta extracción se partió de una muestra vegetal de 700,00g, a la cual se le adicionó un volumen de 2000 mL de disolvente y se dejó reposar por 7 días. Se obtuvo un extracto con una coloración verde oscura y grumosa, además de presentar una consistencia viscosa. Posteriormente se eliminó la mayor cantidad posible de etanol mediante el rotavapor, lo que generó un volumen remanente de 125 mL. El extracto se dejó reposar por un mes, luego de este periodo se evidenciaron numerosas partículas en el medio.

**Tabla 6. Resumen de la Información de los Extractos Etanólicos y Acuosa de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

Variable o Característica	Parte del material vegetal / Disolvente empleado			
	Hojas / Agua	Hojas / Etanol 95%	Corteza / Agua	Corteza / Etanol 95%
Masa inicial del material vegetal (g)	543,92	700,00	774,25	900,00
Volumen empleado del disolvente (mL)	2110	2000	1936	2250
Volumen de extracto sin concentrar (mL)	1150	1300	1600	1885
Volumen de extracto después de concentrado mediante Rotavapor (mL)	150	125	178	200
Color de extracto	Café	Verde oscuro	Rojizo	Rojizo oscuro
Consistencia	Bastante viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa
Presencia de partículas suspendidas	Sí, abundante	Sí	Sí	Sí

Fuente: Elaboración propia, 2020.

### **Pruebas de Caracterización del Extracto**

Una vez que obtuvieron los extractos tanto acuosa como alcohólicos de la *Byrsonima crassifolia* (Nance), la siguiente etapa correspondió a su caracterización tanto fisicoquímica como espectroscópica, esto con la finalidad de determinar si hubo evidencia de la presencia de metabolitos específicos.

#### **Pruebas Fisicoquímicas**

A continuación, se detallarán los resultados obtenidos en el tamizaje físico químico realizado a la corteza y hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance), la cual se efectuó tanto a los extractos etanólicos y acuosa, en donde se evaluó si se contaba con la presencia de taninos,

flavonoides, saponinas, almidón y alcaloides. Se tomó como referencia para realizar estas pruebas el Manual del Curso de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Costa Rica (Calvo, 2018)

### **Identificación de Alcaloides.**

#### ***Prueba con el reactivo de Dragendorff a los extractos etanólicos de corteza y hojas.***

Para determinar la presencia de alcaloides en los extractos alcohólicos, tanto de corteza como de hojas, se realizó la prueba con el reactivo de Dragendorff, en la cual se considera un resultado positivo si se genera un precipitado color naranja o rojo ladrillo o grado de turbidez (Calvo, 2018). Esta prueba se consideró positiva para el extracto etanólico de corteza debido a que se observó un cambio de coloración y apareció un precipitado abundante. Para descartar la interferencia del disolvente o falso positivo en la prueba, esta se realizó al disolvente sin el extracto (denominado blanco en las imágenes), lo que generó un resultado que se consideró negativo debido a la ausencia de cambio. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 21.

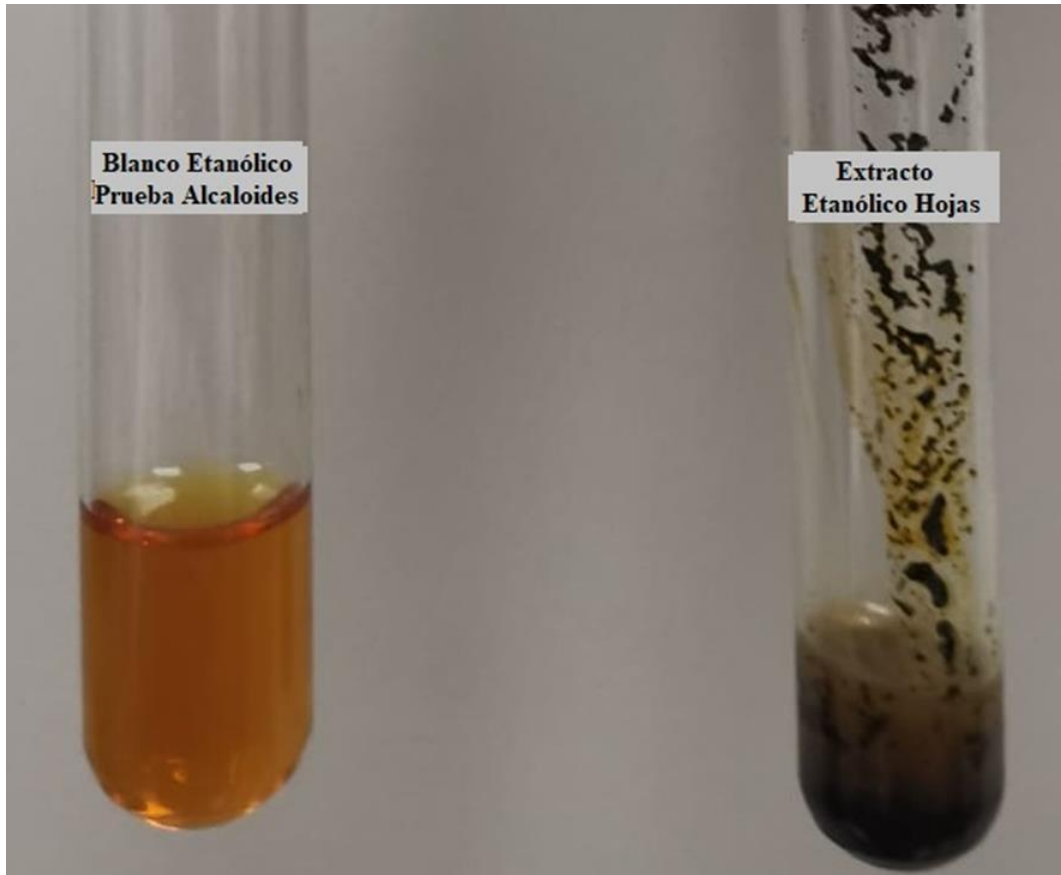
**Figura 21. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Etanólico de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

De forma análoga a la prueba de alcaloides descrita para los extractos etanólicos de corteza, se analizaron los etanólicos obtenidos de las hojas, los que mostraron un resultado negativo. Los resultados se muestran en la figura 22, en la que se observa una turbidez y un ligero precipitado en la prueba realizada al extracto, sin embargo, este no es de color naranja ni rojo por esta razón se consideró que no había la presencia de este metabolito en la muestra.

**Figura 22. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Etanólico de las Hojas**

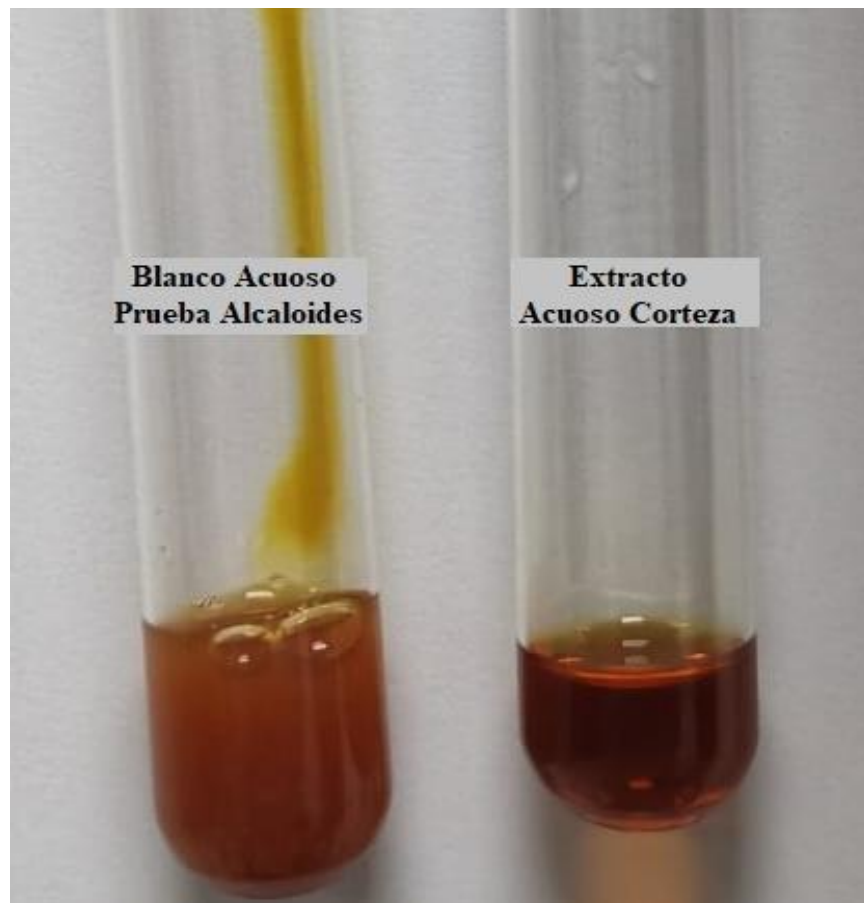


Fuente: Elaboración propia, 2020

***Prueba con el reactivo de Dragendorff a los extractos acuosos de corteza y hojas.***

La determinación de la presencia de alcaloides en los extractos acuosos de corteza y hojas se realizó de forma similar a la descrita para los etanólicos. Como se observa en la figura 23, que corresponde al resultado del ensayo al extracto acuoso de corteza, en la que se presentó un cambio de coloración importante con respecto al blanco, sin embargo, no presenta mayor grado de turbidez ni precipitado. El cambio de coloración puede ser positivo a alcaloides, no obstante, se considera que es ocasionado por el reactivo utilizado ya que este presentó una coloración naranja prominente lo cual pudo alterar la tinción del medio, y por esta razón la prueba se consideró como negativa.

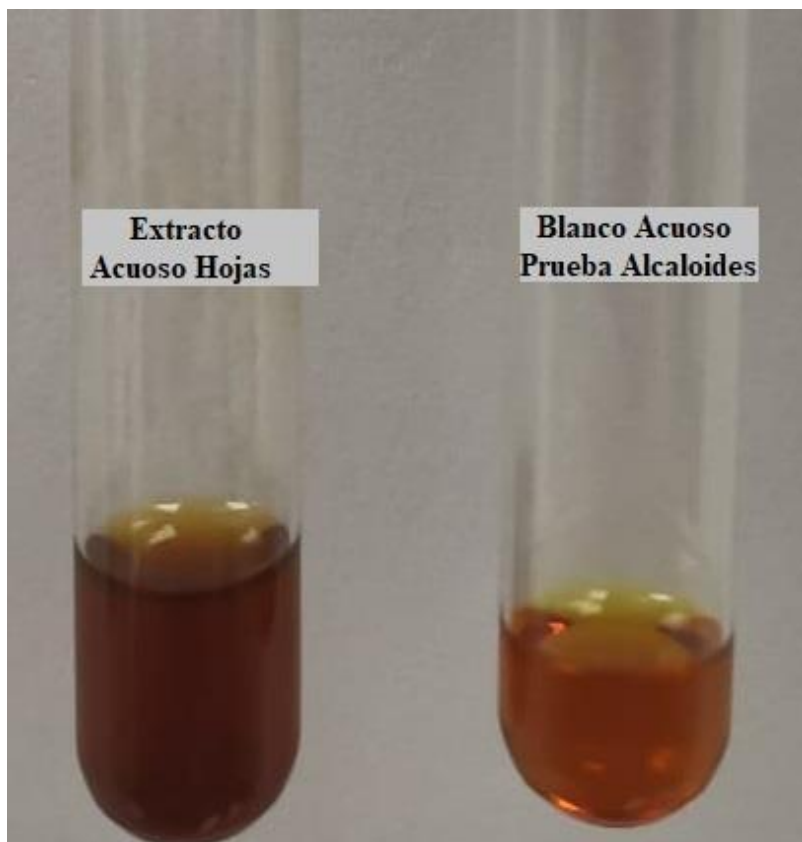
**Figura 23. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Acuoso de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

Al igual que en la prueba anterior, el extracto acuoso de las hojas mostró un resultado considerado negativo ya que se observan características semejantes: ausencia de cambio evidente entre los resultados del blanco y la muestra, porque la pequeña variación observada podría deberse a la adición del reactivo y no a la presencia del metabolito. Los resultados obtenidos en este punto se muestran en la figura 24.

**Figura 24. Prueba Para la Identificación de Alcaloides del Extracto Acuoso de las Hojas**



Fuente: Elaboración propia, 2020

Se puede deducir lo obtenido en estas pruebas, que los alcaloides presentes no son fácilmente extraíbles con el agua pero sí con el etanol, lo que podría atribuirse a la diferencia de polaridad que existe entre estos disolventes. A pesar de que ambos disolventes son polares, es probable que los alcaloides con grupos que le inducen polaridad, como los nitrogenados, le confieren la polaridad necesaria para ser solubles en el etanol; sin embargo, esta polaridad no es la suficiente para lograr su solubilidad en el agua.

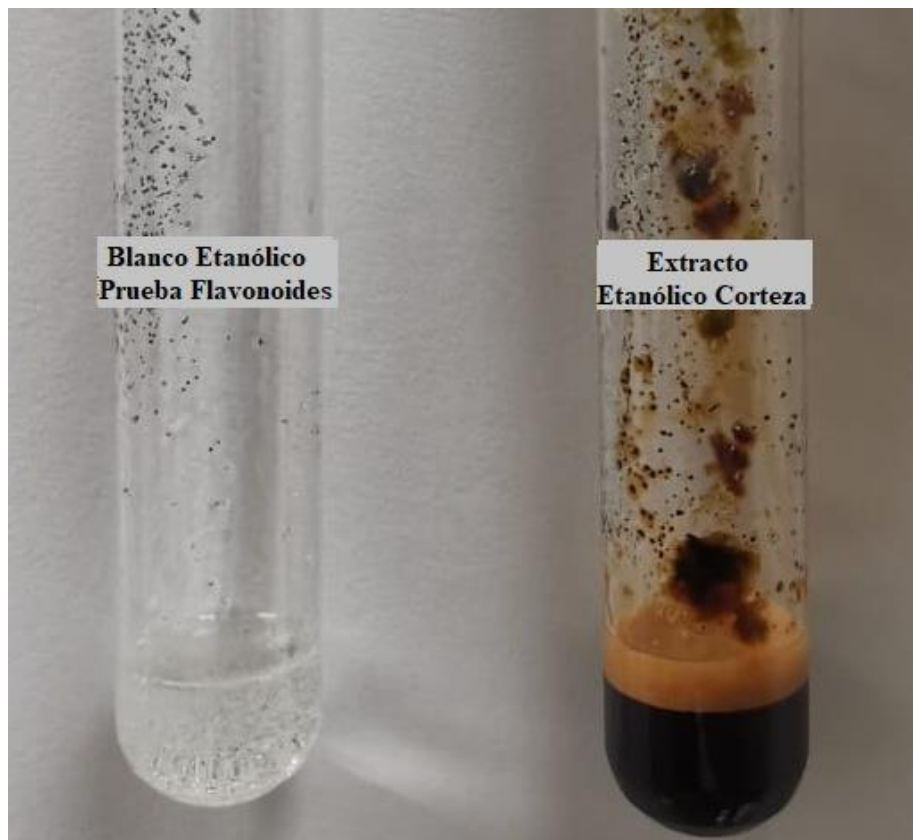
### **Identificación de Flavonoides**

#### ***Prueba de Shinoda a los extractos etanólicos de corteza y hojas.***

En la determinación de la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de la corteza y de las hojas del nance, se efectuó la prueba con el reactivo de shinoda, donde debe presentar un cambio de coloración a rojo a vino o inclusive naranja, además formación de precipitado o turbidez, según lo indica Peña en el 2019.

La prueba realizada se estimó positiva para el extracto etanólico de corteza, ya que se visualizó un cambio de color de naranja a vino. Para evidenciar esta variación se le efectuó la prueba al disolvente (blanco) utilizado en la reacción, que como se observa en la figura 25, la reacción fue nula. El resultado obtenido se generó debido a la reacción del ácido clorhídrico y el magnesio, esto porque el gas originado por esta reacción, provoca una reducción del ión flavilo, el cual otorga este cambio de color. (Peña, 2019)

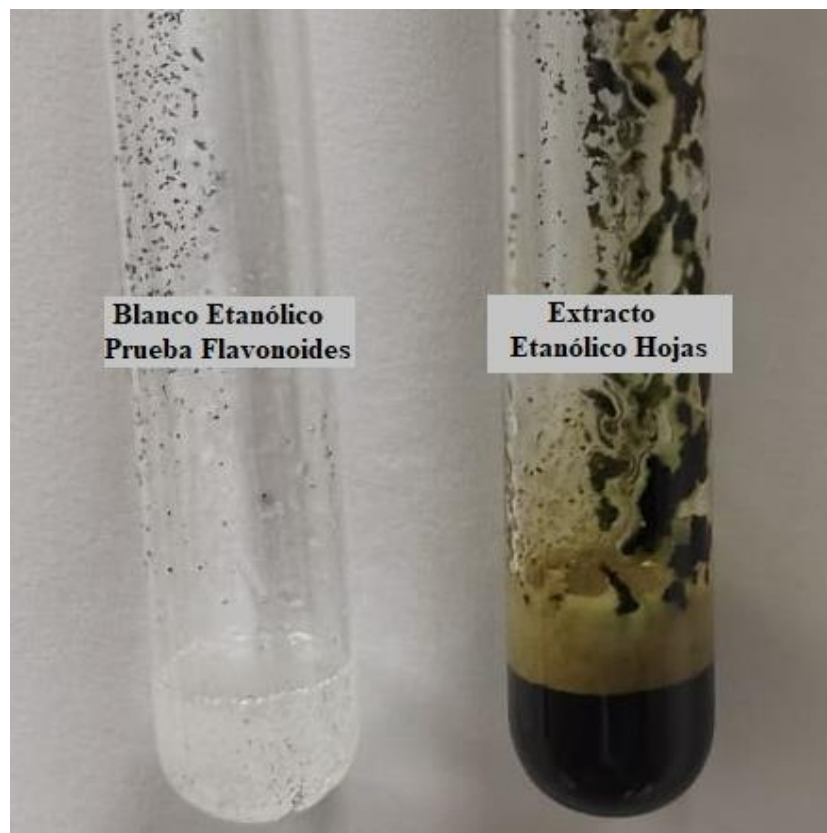
**Figura 25. Prueba para la Identificación de Flavonoides del Extracto Etanólico de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

En el extracto correspondiente al etanólico de las hojas, se realizó el mismo procedimiento descrito para el de corteza, en donde se observa un resultado negativo debido a que no se evidenció un cambio de coloración entre el extracto y la adición del reactivo, además se elimina la posibilidad de la interferencia con el disolvente, al realizar la prueba al blanco de generó un resultado igualmente negativo por la ausencia de cambios. Los resultados descritos se evidencian en la figura 26.

**Figura 26. Prueba para la Identificación de Flavonoides del Extracto Etanólico de las Hojas**

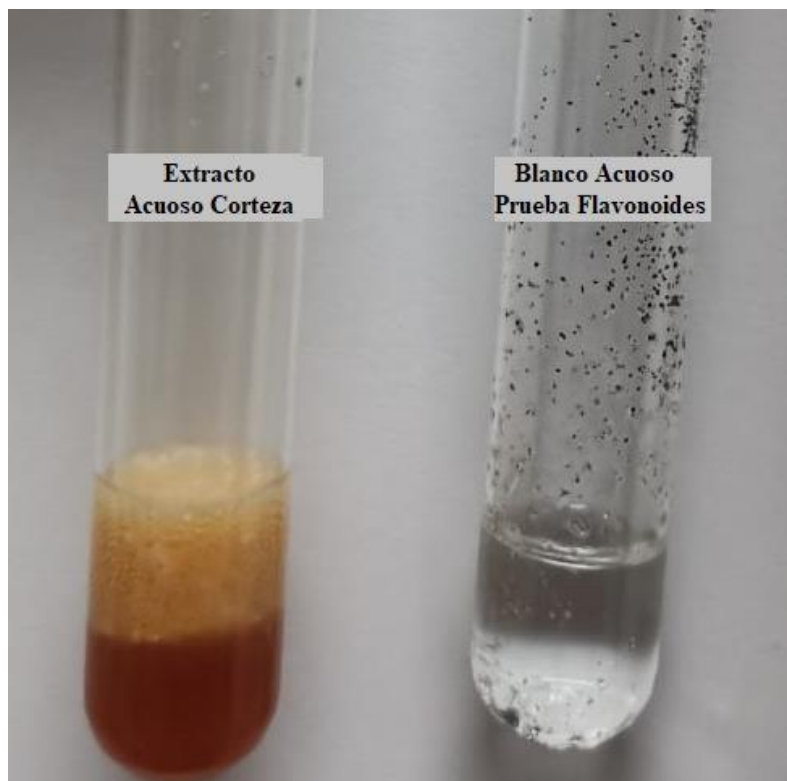


Fuente: Elaboración propia, 2020

***Prueba de Shinoda a los Extractos acuosos de corteza y hojas***

En esta ocasión de igual manera se le adicionó el reactivo de shinoda a los extractos acuosos de la corteza y de las hojas. En la figura 27 se demuestra que la prueba para el extracto acuoso de corteza dio un resultado positivo debido al cambio de coloración de rojo a naranja, el cual fue inexistente en el momento de compararla con el blanco. Lo anterior corrobora lo mencionado en la literatura por Peña, 2019.

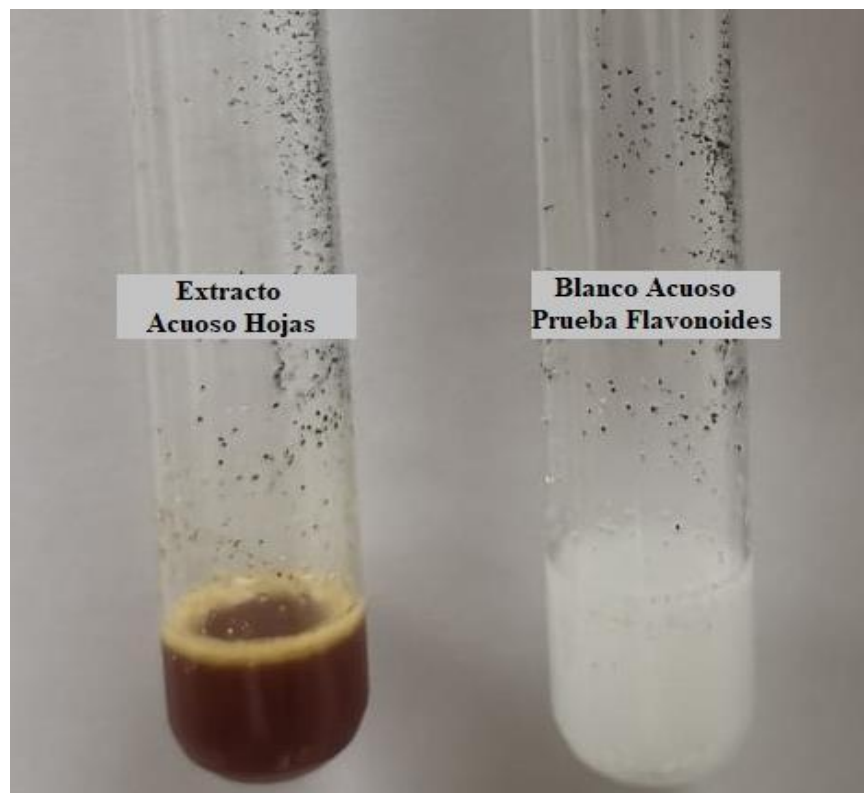
**Figura 27. Prueba Para la Identificación de Flavonoides del Extracto Acuoso de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

Al aplicar el mismo procedimiento de la prueba realizada anteriormente, el extracto acuoso de hojas presentó un resultado negativo, ya que no se observó ningún cambio en la apariencia del color del extracto original, al que se obtiene después de agregar el reactivo correspondiente. Esto se observa en la figura 28.

**Figura 28. Prueba Para la Identificación de Flavonoides del Extracto Acuoso de las Hojas**



Fuente: Elaboración propia, 2020

Como se demuestra en lo obtenido en estas pruebas, los flavonoides que se identifican por medio de la prueba de shinoda, no están presentes en las hojas del nance. Esto se puede deducir porque los resultados que se produjeron, muestran la ausencia de estos metabolitos, ya que sin importar el solvente utilizado (etanol o agua), no se dio su avistamiento en la prueba. Caso contrario al visto en la corteza donde se presentan tanto en los extractos etanólico como acuosos.

#### **Identificación de Taninos.**

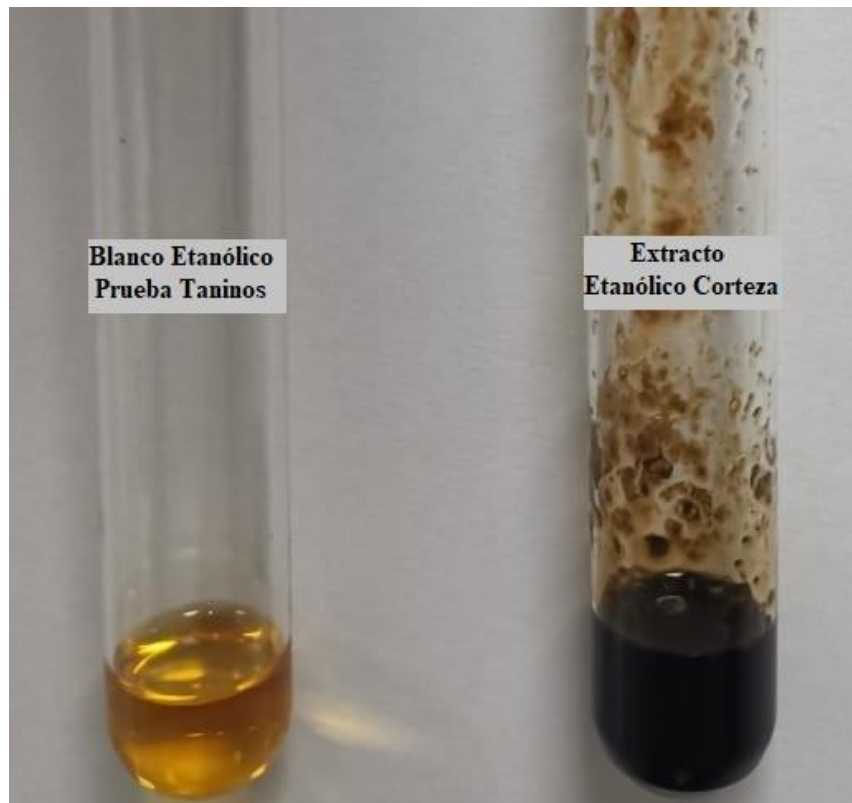
##### ***Prueba con el Cloruro Férrico a los extractos etanólicos de corteza y hojas.***

Para señalar la presencia de taninos en los extractos alcohólicos de la corteza y de las hojas, se efectuó la prueba con el reactivo de cloruro férrico, en donde según lo indica Peña en el 2019, los hidroxilos fenólicos presentes en este metabolito, precipitan en presencia de este reactivo. Lo anterior es producto del ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno

del grupo hidroxilo que genera una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro. Por lo mencionado una coloración azul oscuro indica la presencia de taninos.

Bajo la premisa descrita el extracto etanólico de la corteza, mostró un cambio de coloración inmediato al adicionar el cloruro férrico, este tomó un color negro que evidencia la presencia de taninos gálicos como lo menciona Sharapin, 2000. Esta tinción se da por la unión del color del extracto (rojo) y del reactivo (café rojizo). En la comparación con el blanco utilizado para la extracción, se descarta un falso positivo en los resultados de la prueba debido a la falta de cambios ocasionados. Esto se demuestra en la figura 29.

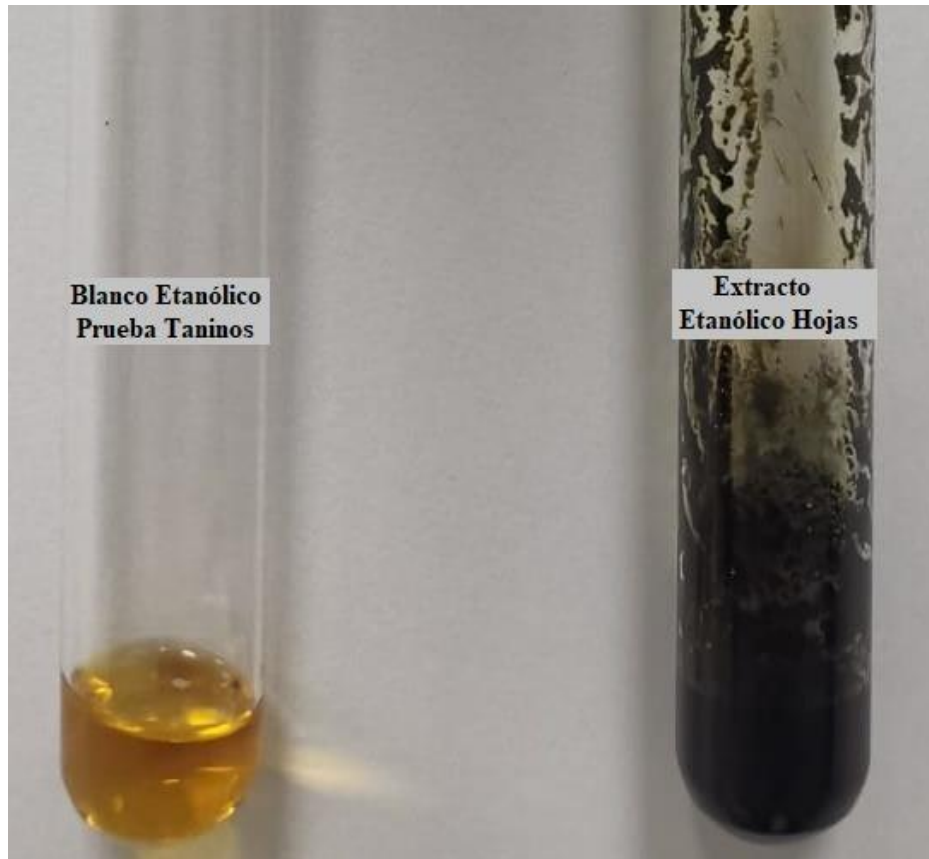
**Figura 29. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Etanólico de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

En lo referente a la prueba realizada al extracto etanólico de hojas, siguiendo la misma premisa anterior. En la figura 30, se visualizó un resultado positivo debido al cambio abrupto de coloración el cual fue de verde a negro., reafirmando de igual manera que en las hojas se cuenta con taninos gálicos.

**Figura 30. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Etanólico de las Hojas**

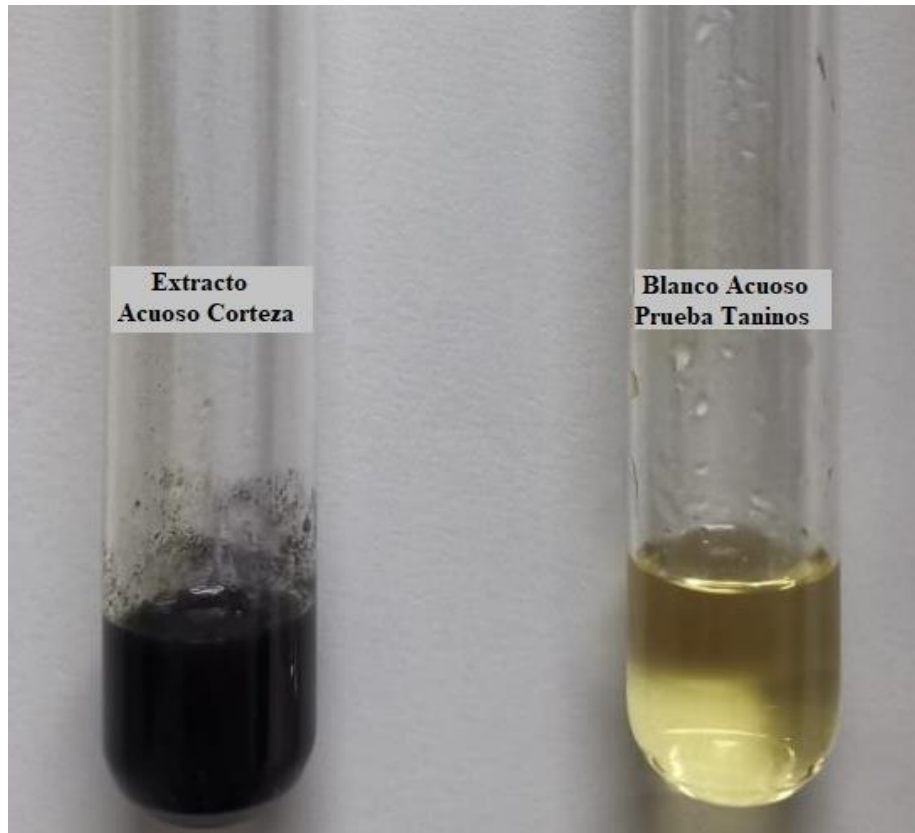


Fuente: Elaboración propia, 2020

***Prueba con el Cloruro Férrico a los extractos acuosos de corteza y hojas.***

La determinación de la presencia de taninos en los extractos acuosos de corteza y de las hojas, se realizó de forma análoga a la referida para los extractos etanólicos. En la figura 31, correspondiente al extracto acuoso de corteza, se observa un cambio de coloración evidente de rojizo a negro, lo que muestra la disposición de este metabolito en el medio, asimismo se evidencia un contraste importante con el blanco, por lo cual se establece que este no interfiere en el resultado.

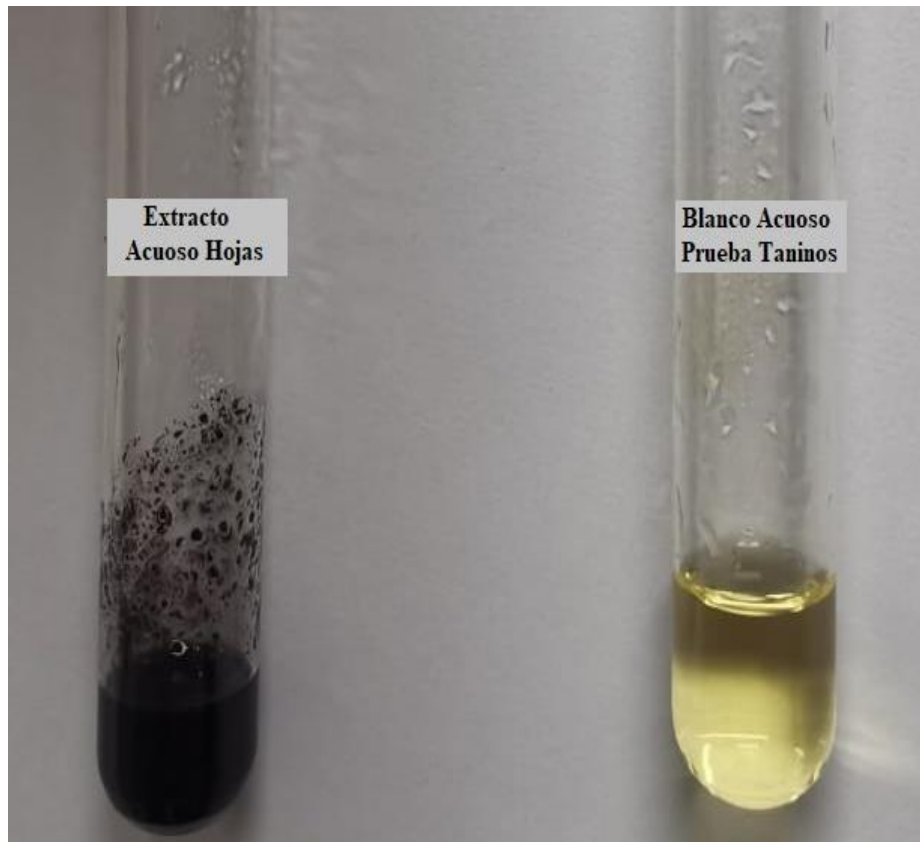
**Figura 31. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Acuoso de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

En la figura 32 la cual hace referencia al extracto acuoso hojas, se muestra un resultado positivo ya que se observaron efectos semejantes a los obtenidos en la prueba anterior, donde se manifestó un cambio de coloración congruente con este metabolito, al observarse una variación de color de café a negro.

**Figura 32. Prueba Para la Identificación de Taninos del Extracto Acuoso de las Hojas**



Fuente: Elaboración propia, 2020

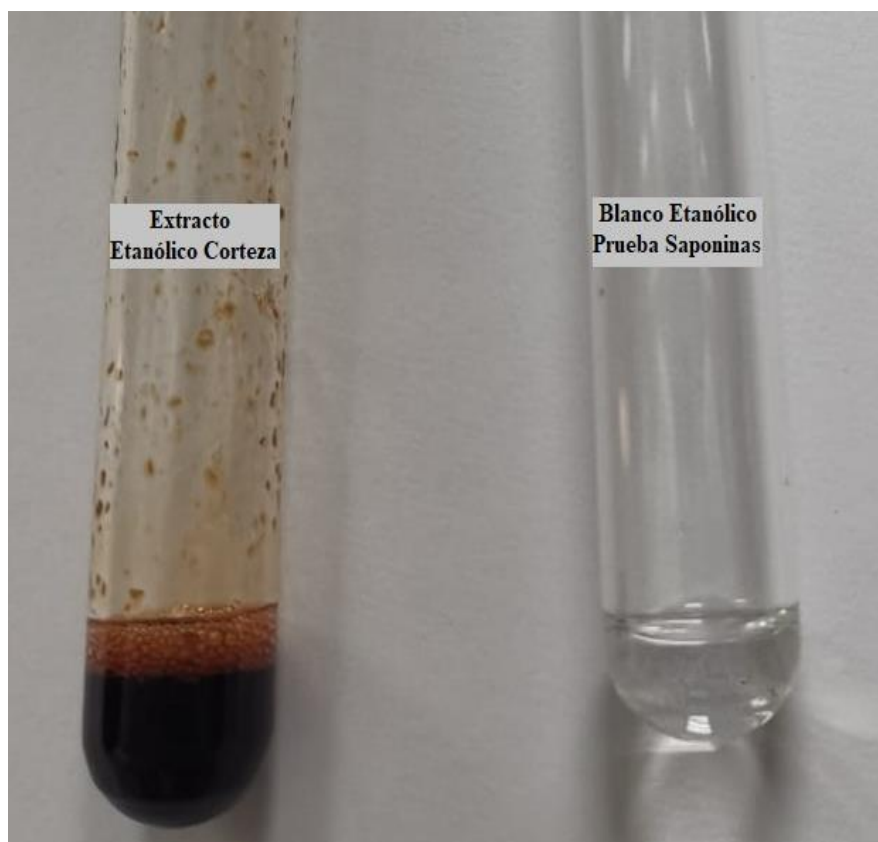
Se deriva de lo anteriormente expuesto, que los taninos presentes en el árbol de *Byrsonima crassifolia*, son extraíbles en los dos disolventes empleados, dado que ambos solventes poseen un grado de polaridad, donde es posible la solubilidad total del metabolito y por esta razón es tan evidente su presencia en las pruebas. Aparte de la coloración negra observada en las cuatro pruebas realizadas, se puede deducir que se cuenta con taninos gálicos en la muestra, esto porque el resultado de la coloración de los taninos es azul y al unirla con la del reactivo de cloruro férrico que es café rojiza, provocan un cambio de tinción a negro.

## Identificación de Saponinas

### *Prueba de espuma a los extractos etanólicos de corteza y hojas.*

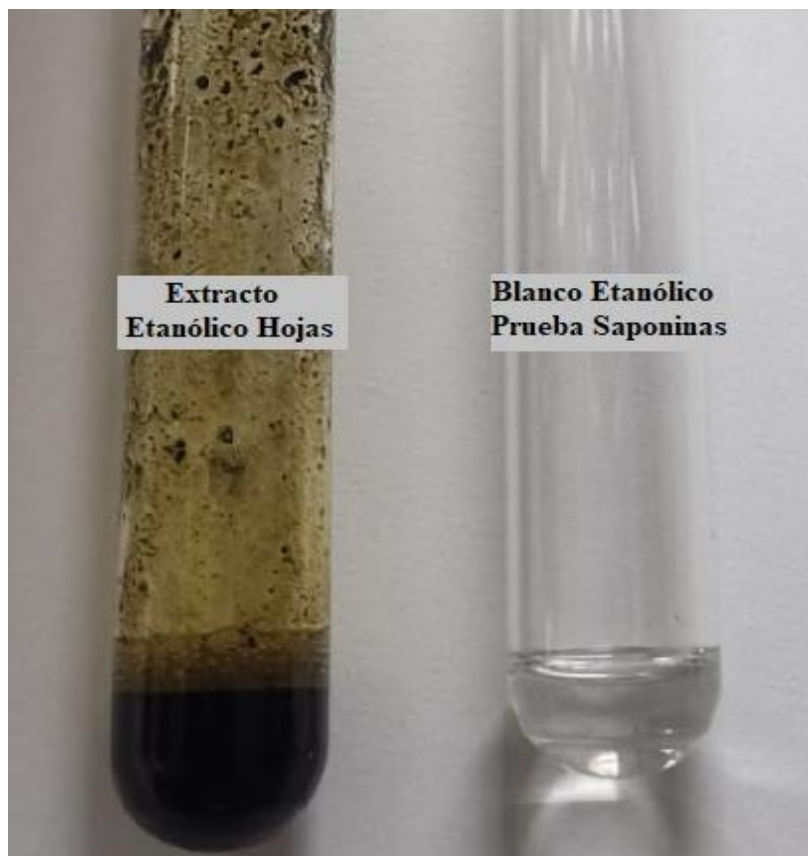
Para que la prueba de determinación de saponinas sea positiva, se establece que se presente y mantenga una espuma en la parte superior del tubo. Como se puede observar en las figuras 33 y 34, se evidencia la presencia de espuma proporcional para ambos extractos, por lo cual se puede asegurar que dicha prueba es positiva para la identificación de este metabolito. Se comparó con un blanco proveniente del disolvente utilizado en la extracción, donde se corrobora que esta sustancia no alteró los resultados presentados ya que se muestra que es negativa.

**Figura 33. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Etanólico de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

**Figura 34. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Etanólico de las Hojas**

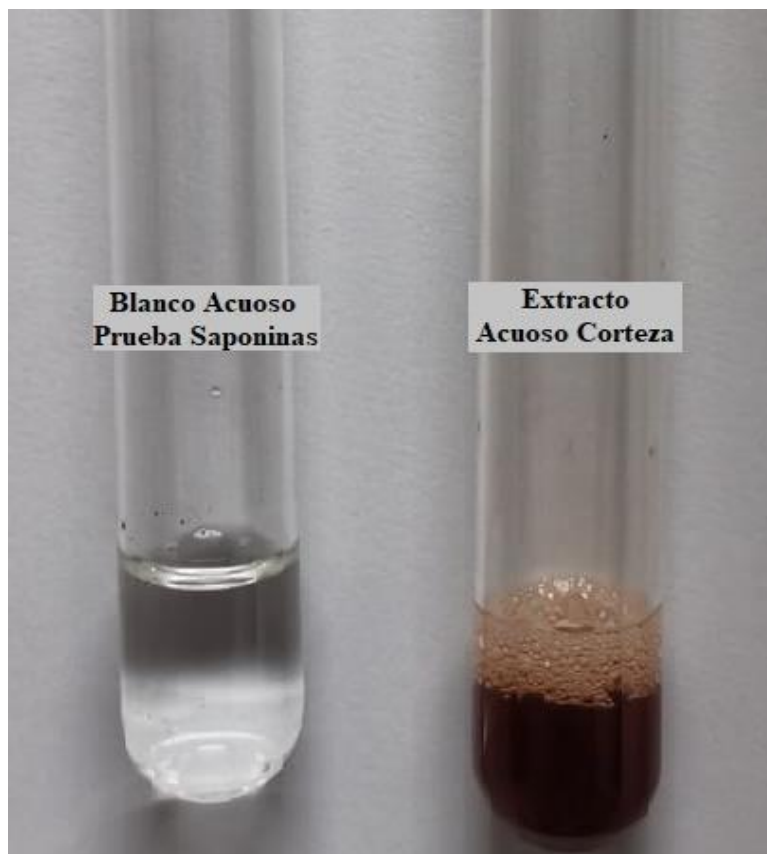


Fuente: Elaboración propia, 2020

***Prueba de espuma a los extractos acuosos de corteza y hojas.***

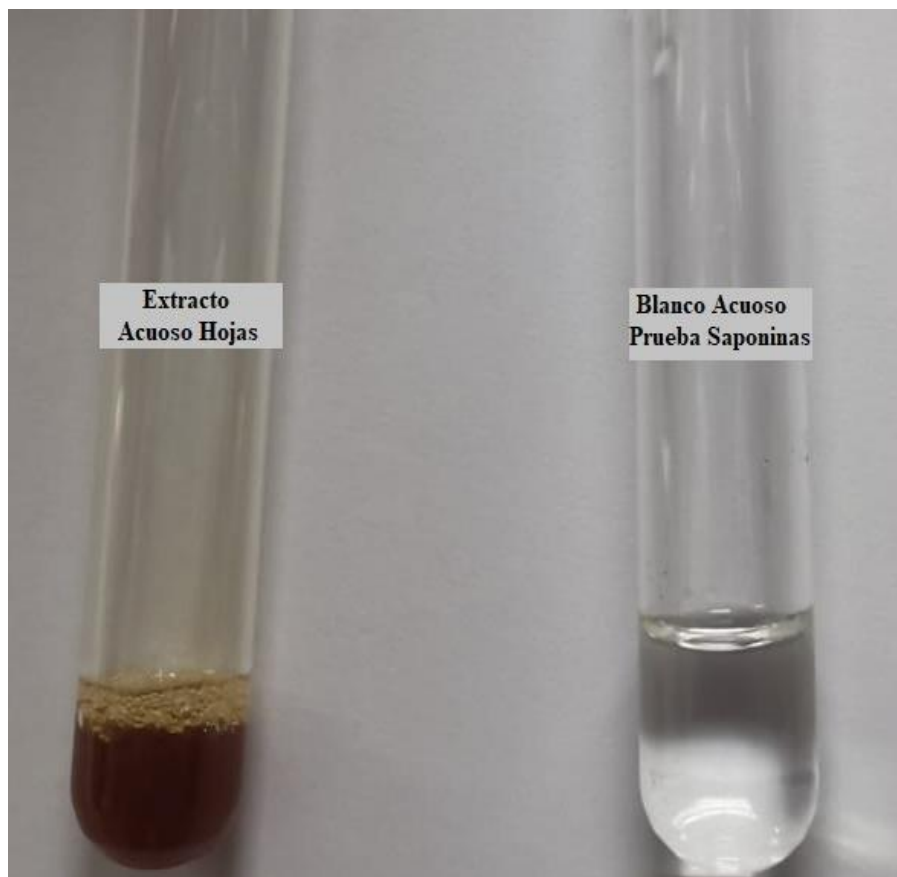
De forma análoga con los extractos etanólicos, esta prueba ejecutada a los extractos acuosos de corteza y de las hojas es igualmente positiva para este metabolito, ya que se puede visualizar espuma en las muestras. Sin obviar un aspecto que es importante mencionar, donde en la figura 35 la espuma presente es mayor que la observada en la figura 36. Al igual que en el caso anterior se comparó con el blanco, y se obtuvo la misma deducción, que el solvente no alteró el resultado producido.

**Figura 35. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Acuoso de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

**Figura 36. Prueba Para la Identificación de Saponinas del Extracto Acuoso de las Hojas**



Fuente: Elaboración propia, 2020

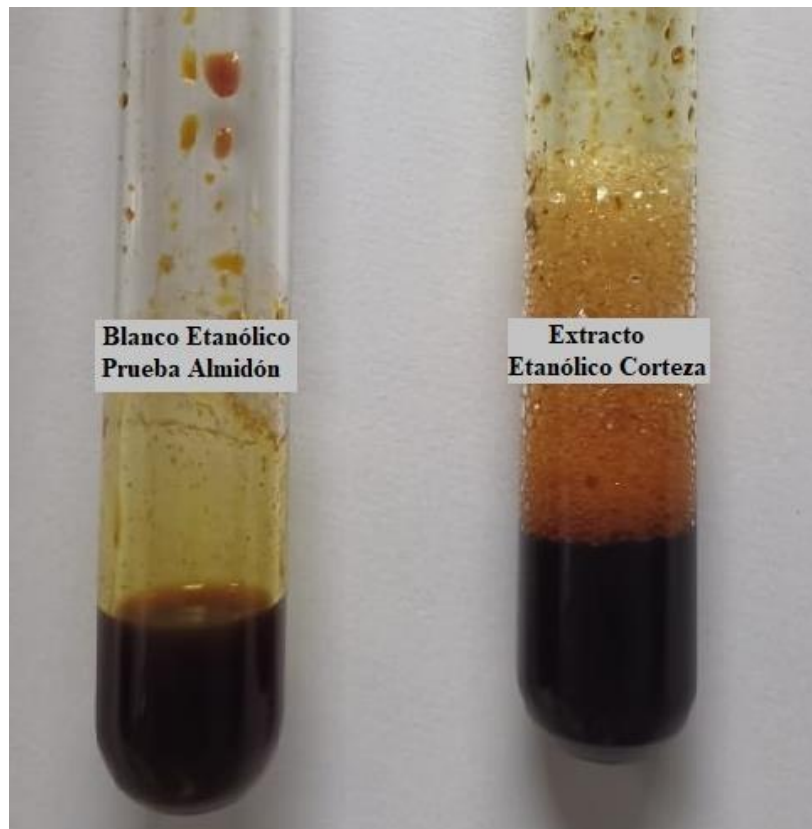
Se conjetura de los resultados obtenidos, que la presencia de saponinas es evidente en todas las muestras, debido a la presencia de espuma en los extractos, que aunque en algunos casos fue más evidente que en otros, siempre estuvo presente.

### **Identificación de Almidón**

#### ***Prueba de lugol para los extractos etanólicos y acuosos de corteza y hojas***

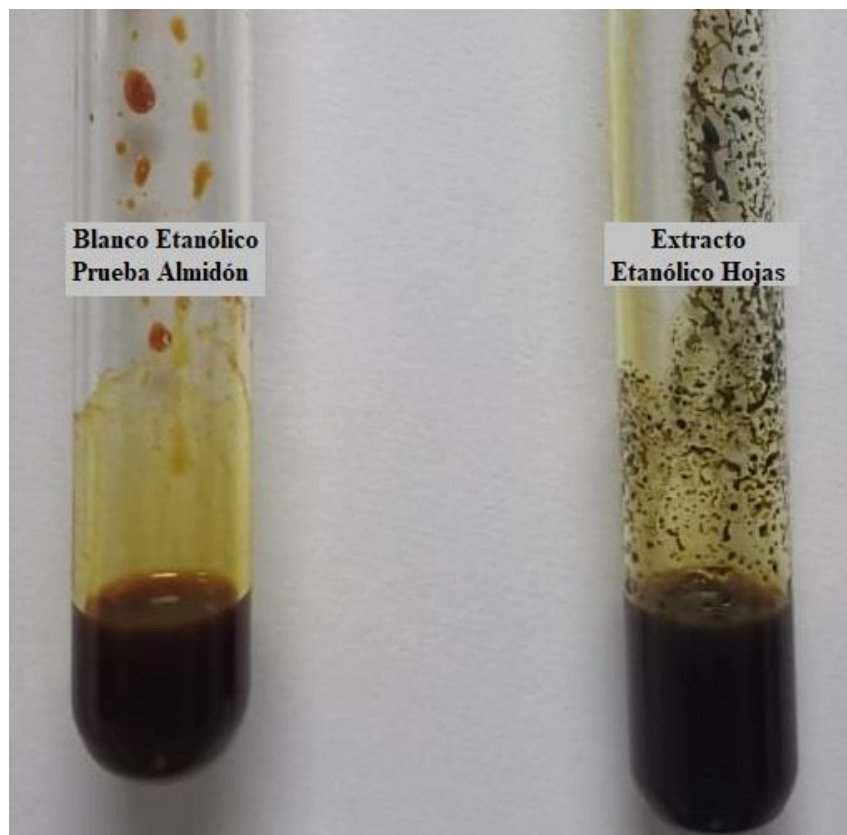
Los extractos en esta prueba deben presentar un cambio de coloración que tiende al azul para que la misma se considere positiva. Una vez realizado la prueba para las cuatro muestras, se determinó que en todos los casos es negativa, ya que no se observa una variación importante en el cambio de tono en el medio hacia esta tinción. Sin embargo, las alteraciones mínimas que se pueden ver se deben a la utilización del reactivo el cual es de una coloración anaranjada, lo mencionado se aprecia en las figuras 37, 38, 39 y 40.

**Figura 37. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Etanólico de la**

**Corteza**

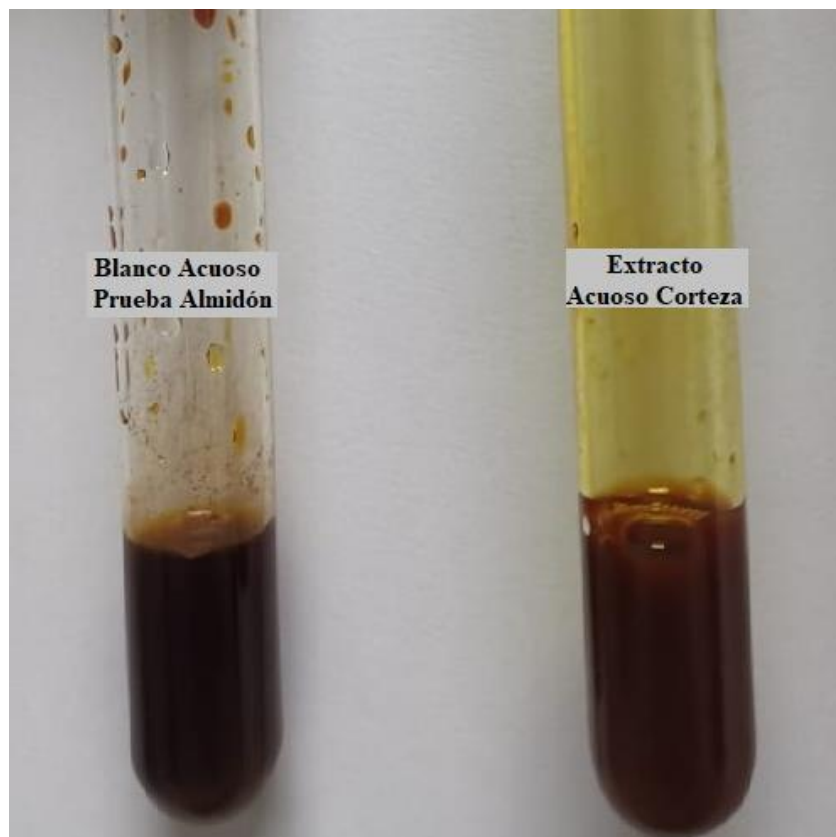
Fuente: Elaboración propia, 2020

**Figura 38. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Etanólico de las Hojas**



Fuente: Elaboración propia, 2020

**Figura 39. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Acuoso de la Corteza**



Fuente: Elaboración propia, 2020

**Figura 40. Prueba Para la Identificación de Almidón del Extracto Acuoso de las Hojas**



Fuente: Elaboración propia, 2020

**Tabla 7. Resumen de Resultados de la Pruebas Físicoquímicos realizadas a los Extractos Etanólicos y Acuosos de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

Prueba	Hojas Acuoso	Hojas etanólico	Corteza acuoso	Corteza etanólico
Alcaloides	-	-	-	+
Flavonoides	-	-	++	++
Taninos	+	+	+	+
Saponinas	+	+	++	+
Almidón	-	-	-	-
+ : Positivo                      ++ :Positivo muy evidente                      - : Negativo				

Fuente: Elaboración propia, 2020

## **Prueba de Sólidos Totales**

Para realizar este procedimiento se tomó como referencia el documento presentado por María Noemí Caiza Ugalde, en la Escuela Politécnica Nacional en Quito en el año 2018.

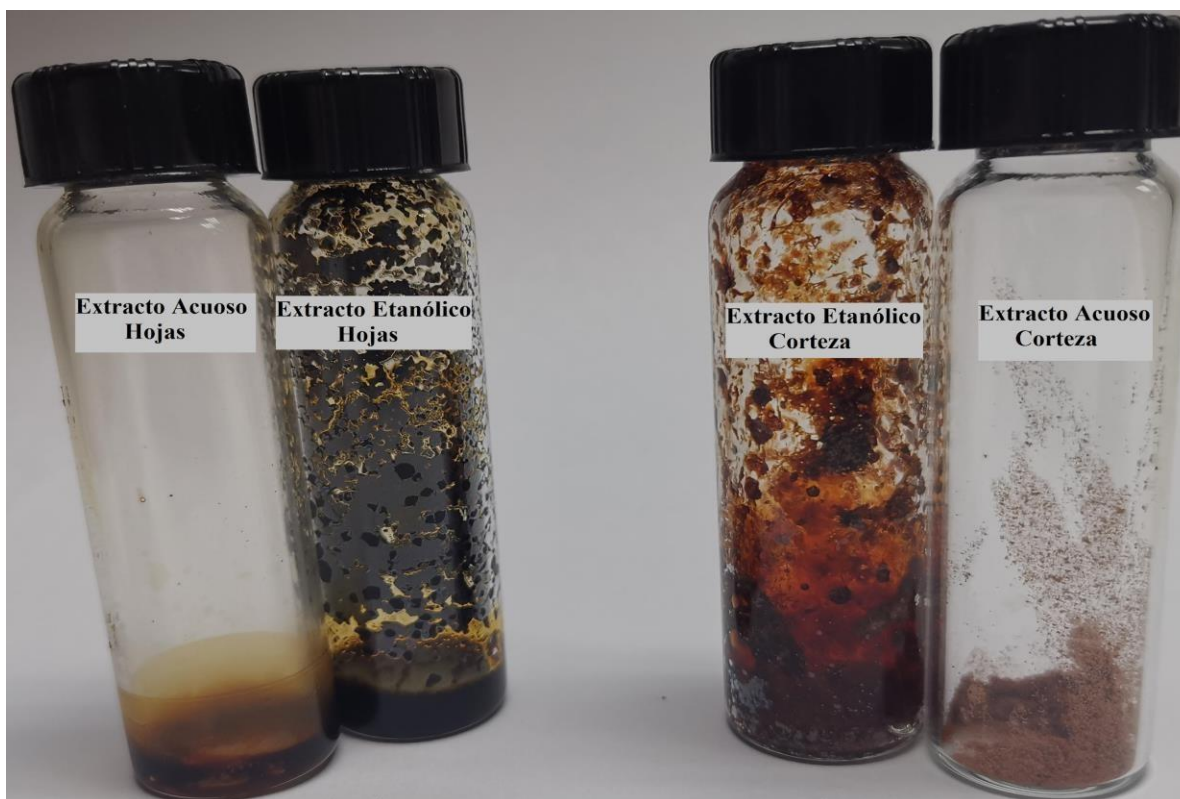
Este procedimiento consistió en eliminar todo el solvente que había en una muestra de cantidad exactamente conocida y tomada del extracto inicial. Lo anterior se realizó para conocer la cantidad específica de sólidos totales que se encuentran disueltos en el medio por analizar o extracto. Para su elaboración se debe conocer tanto el volumen obtenido en la extracción, así como el que se utiliza para llevar a cabo específicamente la prueba.

En la figura 41, puede observarse la apariencia de los sólidos obtenidos de la prueba de sólidos totales realizada a cada extracto, donde de izquierda a derecha se tiene: extracto acuoso de hojas, extracto etanólico de hojas, extracto etanólico de corteza y extracto acuoso de corteza respectivamente. Adicionalmente en la tabla 8, se muestran los datos necesario para determinar la cantidad de sólido presente por unidad de mezcla líquida, lo que podría asumirse como la concentración del extracto madre.

Un aspecto relevante de este dato es que se pudo determinar la concentración a la que se encontró el extracto madre luego de la extracción. Esto porque se pudo extrapolar la concentración a la que se hallaba la muestra contenida en el vial al volumen total alcanzado. Estos datos se utilizaron para determinar el punto de partida en lo referente a las diluciones necesarias para la identificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada bacteria y el hongo. Sin olvidar que esto también sirvió para guiarse con los halos de inhibición que presentaba cada microorganismo, así como la Candida utilizada.

Un aspecto importante por recalcar está relacionado con el extracto acuoso de corteza, ya que este en específico se le realizó un tratamiento diferente luego de su obtención. A esta muestra en particular, se le eliminó el disolvente mediante liofilizado, lo que produjo un sólido con aspecto de polvo fino. Con este método se obtuvo la concentración final ya que el volumen era totalmente conocido antes de efectuar la misma.

**Figura 41. Muestras Resultante de la Prueba de Sólidos Totales de los Extractos Etanólicos y Acuoso de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 8. Información Obtenida para el Cálculo de Sólidos Totales en la Prueba Realizada a los Extractos Etanólico y Acuoso de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

Masa	Hojas Acuoso	Hojas etanólico	Corteza acuoso	Corteza etanólico
Vial vacío (g)	9,7788	9,8022	----	9,8665
Vial + 2 mL de extracto (g)	11,7087	11,9719	----	12,0612
Vial + muestra seca (g)	9,9702	10,8626	----	10,3775
Sólidos en la muestra (g)	0,1914	1,0604	5,7210	0,5110
Concentración final vial (g/mL)	0,0957	0,530	----	0,256

Fuente: Elaboración propia, 2020

### **Caracterización Espectroscópica Infrarrojo Agilent technologies**

Una vez realizadas las pruebas de caracterización fitoquímicas, la siguiente etapa consistió en la identificación espectroscópicas de las muestras de los cuatro extractos de *Byrsonima crassifolia* (nance). Los resultados se evidencian en las figuras 42, 43, 44 y 45 así

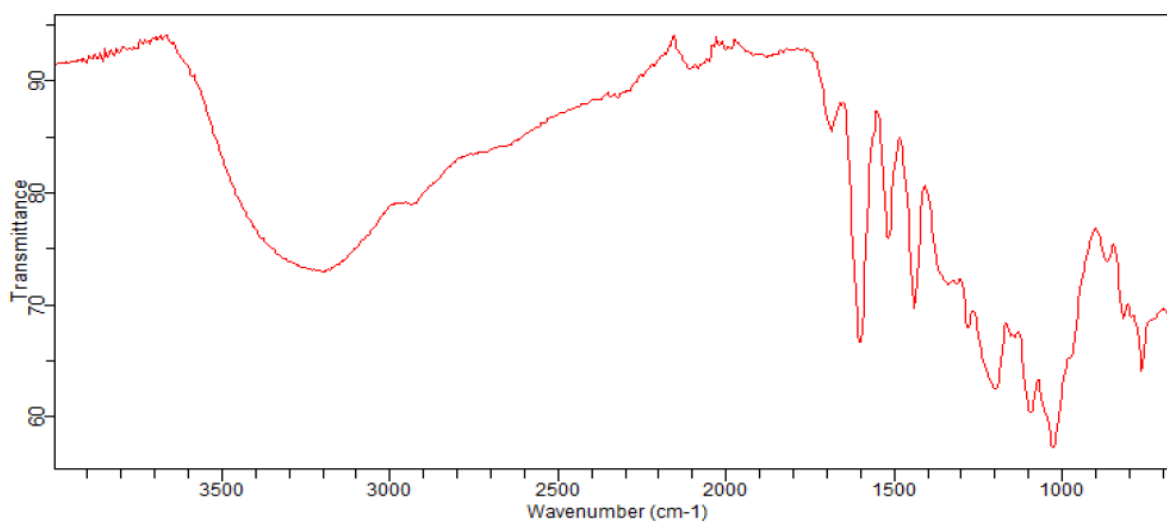
como el resumen de las señales en las tablas 9 y 10. Este estudio se llevó a cabo según lo establecido por Skoog (2015), en la tabla de principios de análisis instrumental.

### **Caracterización Espectroscópica de los Extractos Etanólicos de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance)**

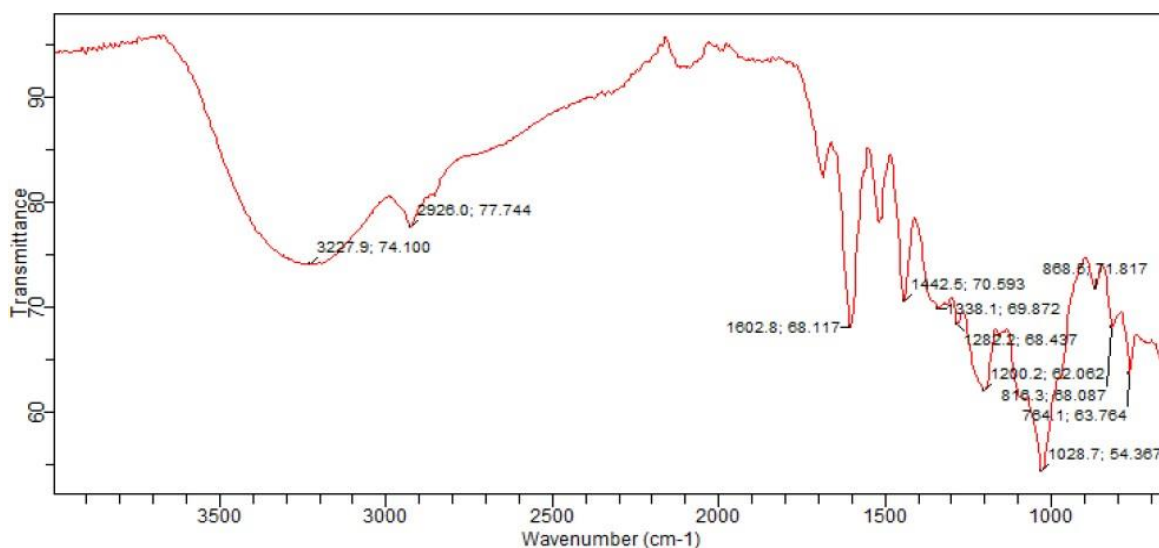
Se inició con el extracto de corteza utilizando etanol como disolvente, donde en la figura 42, se observa el espectro obtenido en el cual puede percibirse alrededor de los 3300  $\text{cm}^{-1}$  una señal ancha e intensa, que fue atribuible a los grupos O-H, además a los 1500 - 1600  $\text{cm}^{-1}$  se observaron dos señales que fueron características de la tensión C-C aromático, y estas representaron las señales más evidentes dentro del espectro. Estas señales coincidieron con los grupos fenólicos que implican tener el grupo O-H y el grupo aromático, lo que fue consistente tanto con los flavonoides, alcaloides, taninos y saponinas, ya que, en estas pruebas, los resultados obtenidos fueron positivos.

La prueba también se le realizó al extracto etanólico de las hojas que corresponde a la figura 43, donde se observó que a los 3228  $\text{cm}^{-1}$  se mostró una señal importante, ancha e intensa asignada a los grupos O-H, una señal a los 2926  $\text{cm}^{-1}$  que fue característica de la tensión C-H alifática y que pudo deberse a los grupos alcanos que se encuentran entre las moléculas, además señala la de 1500-1600  $\text{cm}^{-1}$  que al igual que en la muestra descrita de los extractos etanólico de la corteza, se pudo asignar a la tensión C-C del aromático, también indicándose que logró identificarse en estos grupos aromáticos presentes o reportados en los taninos, flavonoides y saponinas. En la tabla 9 se muestra un resumen de las señales para ambos extractos etanólicos.

**Figura 42. Espectro Infrarrojo del Extracto Etanólico de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



**Figura 43. Espectro Infrarrojo del Extracto Etanólico de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 9. Caracterización Espectroscópica de los Extractos Etanólicos Para la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

Extracto de corteza		Extracto de hojas	
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional Asignado	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional Asignado
3300	Tensión O-H	3228	Tensión O-H
2930	Tensión C-H alifático	2926	Tensión C-H alifático
1900	Sobretonos del aromático	1900	Sobretonos del aromático
1500 – 1600	Tensión C-C aromático	1603 - 1500	Tensión C-C aromático
1025 – 1100	Tensión C-O	1028	Tensión C-O

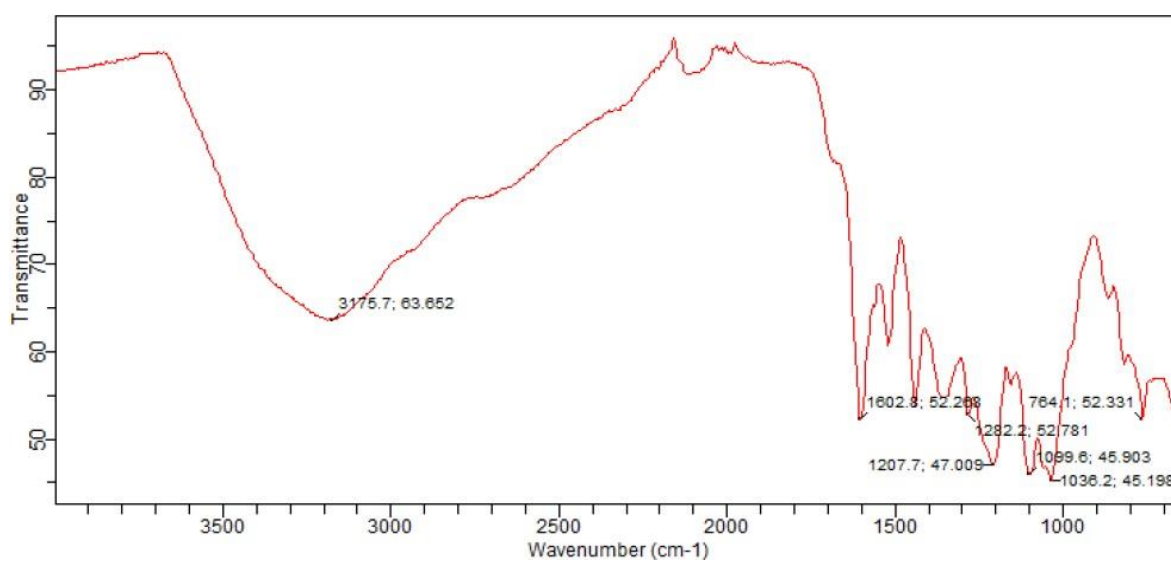
Fuente: Elaboración propia, 2020.

### **Caracterización Espectroscópica de los Extractos Acuosos de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance)**

Primeramente, en la figura 44 se estableció que, en el extracto de corteza obtenido al utilizar agua como solvente, se observó una señal en el espectro alrededor de 3175 cm<sup>-1</sup> la cual correspondió a la tensión O-H, en torno a 1600 cm<sup>-1</sup> correspondiente a la tensión C-C aromático y en 1099 cm<sup>-1</sup> una tensión C-O. Las señales anteriores concordaron con los grupos pertenecientes a los metabolitos de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas, en los cuales se observó la presencia de grupos fenólicos, hidroxílicos y aromáticos.

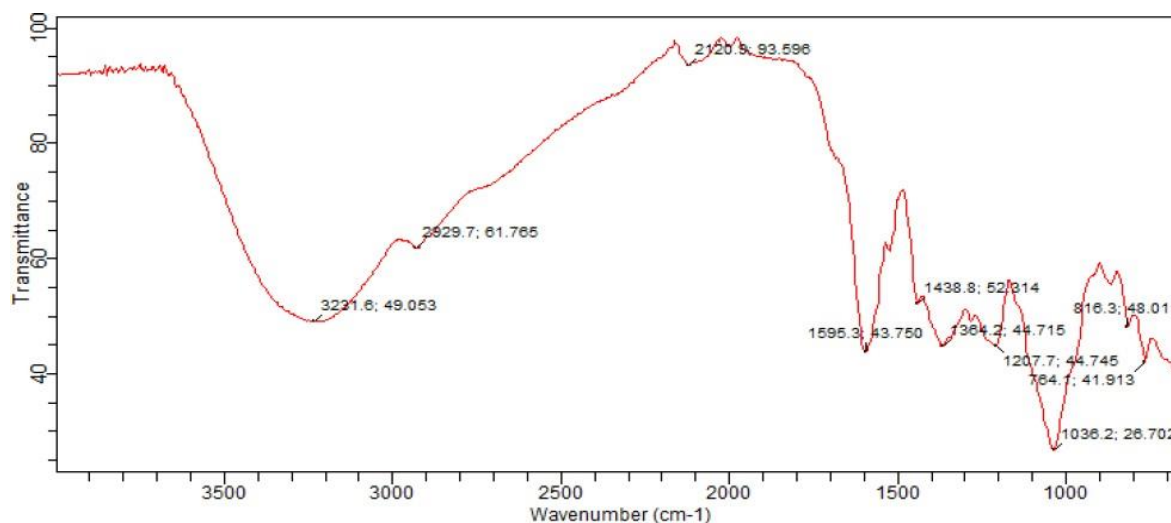
En el caso de la prueba realizada al extracto acuoso de las hojas, se obtuvo una señal ancha a los  $3232\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión O-H, otra señal a los  $2930\text{ cm}^{-1}$  que evidenció la tensión C-H alifática concerniente a los grupos alcanos. En el espectro mostrado a los  $1595\text{ cm}^{-1}$  se atribuyó a la tensión C-C aromático perteneciente a los grupos aromáticos y además se mostró la señal de tensión C-O a los  $1036\text{ cm}^{-1}$ . Las señales expuestas en la figura 45 fueron congruentes con las estructuras de los metabolitos activos presentes en ambos extractos, los cuales correspondieron a flavonoides, taninos y saponinas. En la tabla 10 se manifiesta el resumen de las señales obtenidas del extracto acuoso.

**Figura 44. Espectro Infrarrojo del Extracto Acuoso de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Figura 45. Espectro Infrarrojo del Extracto Acuoso de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 10. Caracterización Espectroscópica de los Extractos Acuosos Para Tanto Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

Extracto de corteza		Extracto de hojas	
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional Asignado	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo Funcional Asignado
3175	Tensión O-H	3232	Tensión O-H
2100	Sobretonos del aromático	2930	Tensión C-H alifático
1600	Tensión C-C aromático	2120	Sobretonos del aromático
1099	Tensión C-O	1595	Tensión C-C aromático
		1036	Tensión C-O

Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Prueba de Actividad Antimicrobiana de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance) Mediante Pruebas In Vitro Frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* por Medio de Difusión Agar**

Posterior a la caracterización química de los cuatro extractos, se procedió a probar cada uno frente a las distintas bacterias y el hongo. Los microorganismos fueron obtenidos en el Laboratorio Microlabs y colocados para crecer durante 48 horas. Posterior a esto cada bacteria además del hongo, se cultivó en el medio conocido como agar estándar en el cual pueden desarrollarse adecuadamente.

A continuación, se detalló por separado cada uno de los microorganismos y el hongo, donde se observó el montaje de la cepa de cada bacteria en el medio agar estándar y se evaluó la efectividad de los extractos. Aparte de estos extractos, se utilizó agua destilada y etanol al 95% como blancos, que fueron los empleados para la extracción, con el fin de evidenciar que la actividad mostrada por los extractos no dependía de estas sustancias, sino, de la actividad propia del Nance. Además, se efectuó un control positivo para generar una comparación entre la sustancia utilizada y el antibiótico con efecto conocido, donde se utilizó un medicamento de amplio espectro llamado levofloxacino para las bacterias gram positivo y gram negativo, y en el caso del hongo se empleó el antifúngico fluconazol.

Cada extracto se colocó en una parte específica en la placa previamente identificada para facilitar la lectura y evitar posibles confusiones entre los extractos. Las muestras que se utilizaron para realizar esta prueba, se tomaron del extracto madre para determinar el grado de inhibición del mismo y así obtener un punto de partida de la posible concentración mínima inhibitoria (CMI) contra la bacteria.

### ***Staphylococcus aureus***

En la tabla 11, se observa la medición de los halos de inhibición de cada una de las sustancias utilizadas contra el *Staphylococcus aureus*, mostraron actividad los extractos etanólicos de la corteza y de las hojas y el extracto acuoso de hojas, exceptuando el extracto acuoso de corteza que se catalogó como inactivo al presentar una variación nula en la placa.

Como ya se mencionó, se utilizaron dos blancos para descartar que la inhibición se debiera a estas sustancias en vez de a los extractos nombrados. En las muestras alcohólicas se utilizó como blanco etanol al 95%, donde se observó una clara inhibición de la bacteria siendo esta fue de 9mm. Sin embargo, se puede descartar que toda la actividad que presentó tanto el extracto etanólico de la corteza y etanólico de las hojas (18mm y 19mm respectivamente), se debió solo al etanol, debido a que la inhibición del extracto supera el doble en ambos casos a la del blanco. Debido a esta comparación, se puede establecer que estos dos extractos alcohólicos si presentaron un grado de inhibición contra esta bacteria.

Seguidamente se realizó el mismo procedimiento, utilizando agua como blanco ya que corresponden a los extractos acuosos. En esta ocasión el disolvente no presentó ningún grado de inhibición, por lo tanto, la actividad que mostraron los dos extractos se debió totalmente a la materia vegetal empleada, donde se observó que el halo de inhibición del extracto acuoso de las hojas fue de 11 mm. En lo referente al análisis del blanco, se estableció una acción antibacteriana completa por parte de las hojas del nance, caso contrario, el extracto acuoso de la corteza, no demostró ningún grado de actividad frente al *Staphylococcus aureus*, señalando que para los extractos acuosos solo las hojas presentaron inhibición frente a esta bacteria.

Al mismo tiempo se realizó un control positivo para determinar la inhibición que provocó el antibiótico frente a la bacteria, mediante la utilización de levofloxacino. En este caso en particular, se observó un halo de inhibición de 19 mm demostrando su sensibilidad frente al microorganismo. Lo anterior se resume en la tabla 14.

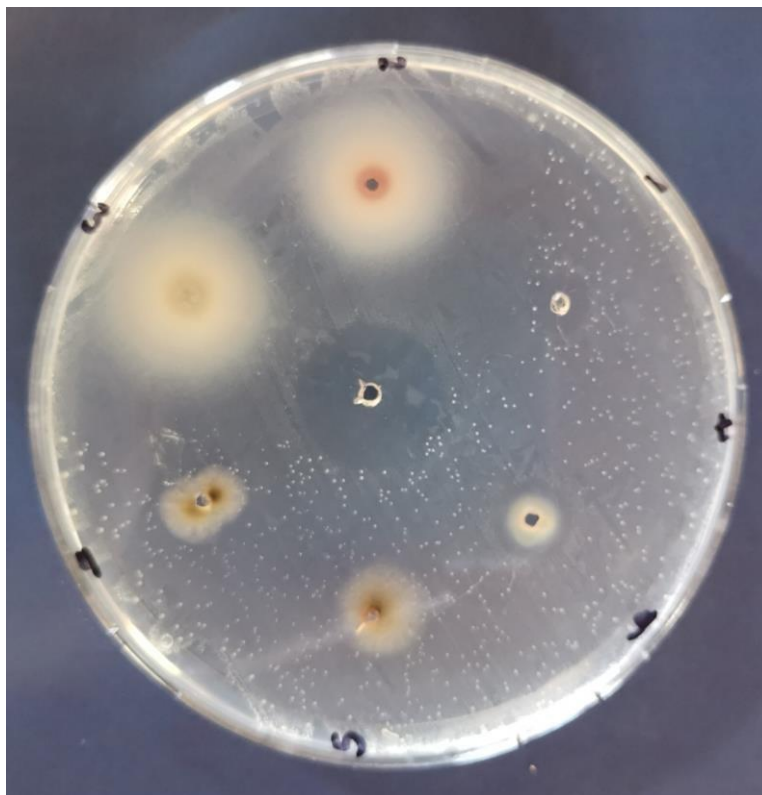
Aunque se puede establecer que existe un grado de actividad por parte de los extractos, estos no se pueden catalogar como sensibles o resistentes con respecto a la bacteria

por presentar inhibición, para esto se cuentan con rangos específicos en los cuales se verifica esta información, por lo que en este caso se utilizan los parámetros correspondientes al control positivo de levofloxacino.

En la tabla 14, se demostró el rango específico de sensibilidad del *Staphylococcus aureus*, donde estableció que para que esta bacteria sea catalogada como sensible, debe ocasionar un halo superior o igual a 17mm. En este caso se clasificó el microorganismo como resistente, ya que una parte de la actividad mostrada se le atribuyó al etanol utilizado para extraer la parte alcohólica, el cual pudo haber interferido en los resultados finales, en vista de que al analizar el blanco se presentó una inhibición de 9mm lo que ocasionó que se disminuyera de manera importante la actividad de estas muestras. En la tabla 11 se exponen los resultados obtenidos para los extractos etanólicos, donde se presentó una inhibición de 18 y 19 mm, y el rango fijado para resistente es menor o igual a 13 mm.

De igual forma, se catalogó como resistente en la inhibición provocada por el extracto acuoso hojas, ya que esta fue de 11 mm y se encontró por debajo del valor mínimo de resistencia. Todo lo anterior se observa en la figura 46.

**Figura 46. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *S.aureus* Frente a Extracciones Etanólicas y Acuosas de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### *Escherichia coli*

De igual manera se valoró la actividad antimicrobiana de los extractos contra esta bacteria, se establecieron los halos de inhibición de cada uno de ellos en la tabla 11. Se observó que solo los extractos etanólicos presentaron un grado de inhibición visible en la placa, caso contrario con los extractos acuosos que no manifestaron ningún tipo de actividad. Un aspecto importante, es que en esta ocasión ninguno de los blancos utilizados mostró inhibición, por consiguiente, se puede decir que la actividad manifestada se da debido a las hojas y corteza empleada para realizar el extracto.

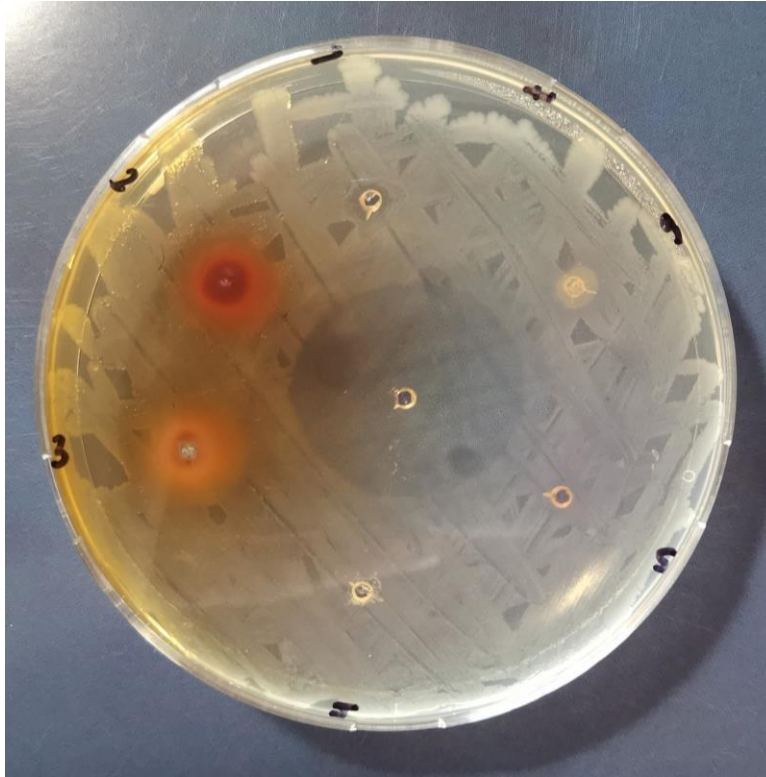
De forma específica el extracto etanólico de la corteza mostró un halo de 6mm de inhibición, el cual es un poco menor al que presentó el extracto etanólico de las hojas que generó un valor de 8mm. Este microorganismo presentó un comportamiento similar al anterior, ya que se observó que los extractos etanólicos son los que presentaron mayor actividad contra la bacteria.

En esta ocasión se utilizó el mismo medicamento como control positivo, debido a que es considerado un antibiótico efectivo contra la *Escherichia coli*. Tal como se observa en la figura 47, el halo provocado presentó una extensión de 30 mm, por lo que se puede deducir que este microorganismo es muy sensible frente a esta quinolona como se muestra en la tabla 14.

Se demuestra que frente a esta bacteria, los extractos acuosos a la concentración madre, no presentaron ningún tipo de sensibilidad al no observar acción. Sin embargo, en los extractos etanólicos, sí se evidenció un grado de inhibición, ya que cumplieron con la premisa mencionada por Guerra y Pozo (2013), la cual establece que la planta *Byrsonima crassifolia*, si muestra actividad antibacteriana frente esta bacteria.

Esta bacteria se considera resistente para los extractos que mostraron actividad, los cuales fueron etanólico de la corteza y etanólico de las hojas, debido a que esta inhibición fue insuficiente para alcanzar el rango necesario para catalogarse como efectiva. Lo anterior se observa en los resultados que se muestran en la tabla 11, que están por debajo del mínimo aceptable que corresponde a un valor mayor o igual a 17mm para catalogarse sensible (tabla 14).

**Figura 47. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *E.coli* Frente a las Extracciones Etanólicas y Acuosas de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

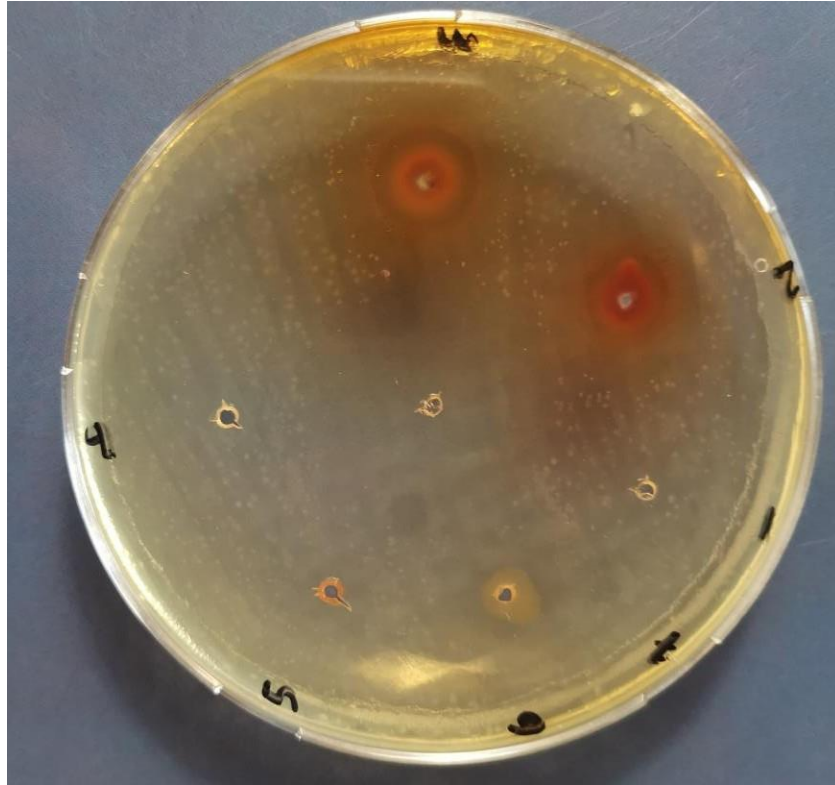
### ***Pseudomona aeruginosa***

Como se evidencia en la figura 48, se observa la actividad antimicrobiana que presentó cada una de las muestras evaluadas. En la tabla 11, se postulan los datos obtenidos luego de la medición de cada uno de ellos. En este caso la conducta que se probó es análoga a la presentada por la *Escherichia coli*, ya que solo los extractos etanólicos mostraron actividad, distinguiéndose en sus halos de inhibición.

De forma específica, la concentración madre utilizada para ambos extractos acuosos en este análisis, no presentó ninguna variación visible en la placa, por lo tanto se catalogan como inactivos. Por el contrario, los extractos etanólicos demostraron un grado de inhibición, siendo el halo del extracto etanólico de la corteza de 12 mm y el etanólico de las hojas de 13 mm. Esta actividad de inhibición se le atribuyó en su totalidad al nance, ya que se descarta el solvente utilizado en la extracción (etanol), al no presentar alteración una vez que fue analizado junto con el extracto.

Asimismo, se utilizó levofloxacino como control positivo, se observó una inhibición de 30 mm (sensible) y conforme lo establece la tabla 14, ambos extractos secatalogan como resistentes porque el halo mostrado es de 12mm y 13mm, lo cual es menor e igual a este parámetro.

**Figura 48. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *P. aeruginosa* de las Extracciones Etanólicas y Acuosa de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### ***Klebsiella pneumoniae***

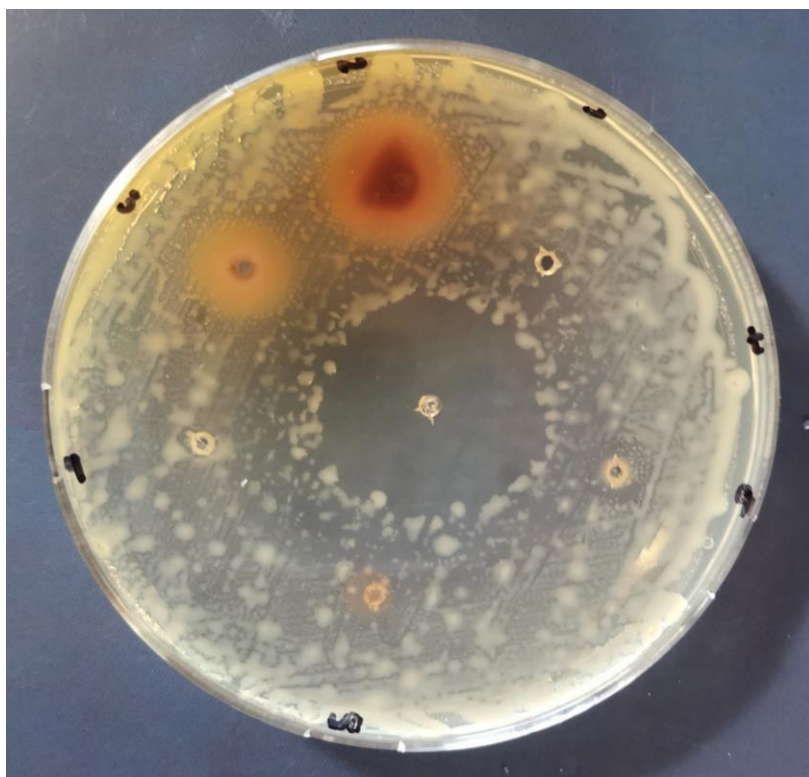
Tanto en la figura 49 como en la tabla 11, se muestran los datos que se obtuvieron posterior a la investigación realizada a esta bacteria. En los mismos se puede visualizar, que este fue el único microorganismo donde no se presentó actividad apreciable de ninguno de los extractos tanto los etanólicos como acuosa, ya que no se logró observar ningún halo alrededor, posterior a la aplicación de los mismos.

Sin embargo, sí se evidenció inhibición por parte del antibiótico (levofloxacino) en la placa, presentó un halo de 30 mm, se estableció que este microorganismo sí tiene un comportamiento de sensibilidad importante, de acuerdo con los datos de la tabla 14.

Aunque no se puede decretar de forma precisa porque se dio esta conducta, Aguayo et al (2017) indican que la *Klebsiella pneumoniae* produce una sustancia denominada carbapenemasa, la cual le otorga la característica de aumentar su capacidad de resistencia o

la susceptibilidad disminuida a carbapenémicos en enterobacterias.

**Figura 49. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *K.pneumoniae* Frente a Extracciones Etanólicas y Acuosas de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 11. Datos de la Medición de los Halos de Inhibición de las Bacterias Utilizadas Para la Investigación**

Número de ubicación	Sustancia utilizada	<i>Staphylococcus Aureus</i> (mm)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (mm)	<i>Escherichia Coli</i> (mm)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (mm)
1	Etanol	9	-	-	-
2	Extracto etanólico corteza	18	-	6	12
3	Extracto etanólico hojas	19	-	8	13
4	Agua	-	-	-	-
5	Extracto acuoso corteza	-	-	-	-
6	Extracto acuoso hojas	11	-	-	-
7	Levofloxacino	19	28	30	30

Fuente: Elaboración Propia, 2020

### *Candida albicans*

Este es el hongo empleado para realizar la evaluación de los extractos de *Byrsonima crassifolia* y así poder determinar su posible actividad antifúngica. Para valorarlo, se siguió el mismo procedimiento efectuado con las bacterias mencionadas.

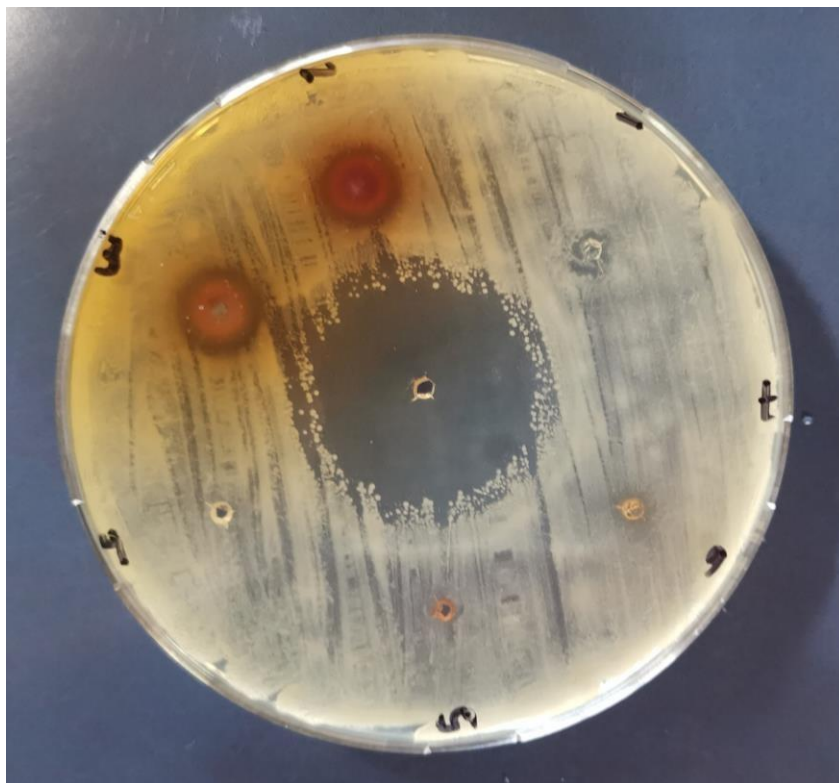
Los datos obtenidos en el análisis de este hongo se muestran en la tabla 12, en donde se aprecia que los blancos de agua destilado y etanol al 95%, no se interpusieron para detectar la actividad de los extractos, ya que su inhibición fue nula como se observa en la figura 50. De igual manera se mostró que comparte su conducta con la mayoría de las bacterias analizadas, donde solo los extractos etanólicos presentaron algún grado de actividad, y los extractos acuosos son inactivos contra la *Candida albicans* a la concentración madre.

En esta ocasión tanto el extracto etanólico de la corteza y de las hojas presentaron el mismo grado de inhibición, donde el halo visualizado fue de 11 mm en ambos casos, lo que demostró que sí existe un porcentaje de actividad antifúngica del nance.

La diferencia en relación con las bacterias, se basa en el medicamento utilizado para realizar el control positivo. Esto es debido a que en este caso, se debió emplear un fármaco antifúngico para que realizara esta función, como lo es el fluconazol. Medicamento que posee buena actividad frente a la *Candida albicans*, el cual mostró un halo de 33 mm, que de acuerdo con la tabla 16 lo cataloga como sensible

Posteriormente los dos extractos que mostraron actividad, provocaron un halo de inhibición similar de 11mm. Este diámetro al ser comparado con los datos mostrados en la tabla 16, estableció como resistentes a los extractos etanólico de las hojas y etanólico de la corteza, ya que el halo se encuentra por debajo de 14 mm

**Figura 50. Prueba de Sensibilidad Antifúngica de *C.albicans* Frente a Extracciones Etanólicas y Acuosas de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 12. Datos del Halo de Inhibición del Hongo *Candida albicans* Utilizado Para la Investigación.**

Número de ubicación	Sustancia utilizada	<i>Candida albicans</i> (mm)
1	Etanol	-
2	Extracto etanólico corteza	11
3	Extracto etanólico hojas	11
4	Agua	-
5	Extracto acuoso corteza	-
6	Extracto acuoso hojas	-
7	Fluconazol	33

Fuente: Elaboración propia, 2020

**Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Acuoso de la Corteza de *Byrsonima crassifolia* Concentrado al Doble, Cuádruple y Séxtuple Respecto a la Muestra Original Mediante Pruebas In Vitro, Frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* Por Medio de Difusión Agar**

En este caso se procedió a concentrar el extracto acuoso de la corteza original utilizado para realizar el primer procedimiento de sensibilidad. Este método consistió en realizar un incremento de dos, cuatro y seis veces la concentración del extracto madre, para determinar si cumplía con lo establecido por Laca y Pozo (2013), los cuales concluyeron que, al aumentar la concentración de la sustancia utilizada, se elevaba el efecto antimicrobiano del extracto a prueba. Esta técnica se realizó solamente al extracto acuoso de la corteza, por el motivo de que era la única muestra que se encontraba en estado sólido, con apariencia final de polvo fino color café. Esto es posible, porque con anterioridad se evidenció que la muestra obtenida era sumamente soluble en agua, por lo tanto fue factible acrecentar su concentración seis veces.

***Staphylococcus aureus***

En la tabla 13, se observa los datos microbiológicos que se obtuvieron nuevamente en esta bacteria al utilizar las muestras más concentradas en referencia con el extracto madre, y así establecer un comportamiento distinto al mostrado en el procedimiento anterior. Este incremento fue de forma paulatina respetando la capacidad de solubilidad de la solución, por lo que se añadió dos, cuatro y seis veces la concentración original y se obtuvieron variaciones significativas entre ellas.

En la figura 51, se demostró que este microorganismo necesita una concentración más elevada del extracto para evidenciar un mayor grado de actividad, debido a que en la muestra aumentada el doble, se observa un comportamiento similar al presentado por la disolución inicial. Se refleja una conducta distinta en la muestra cuadruplicada, ya que en esta sí se evidenció la inhibición de la bacteria de 11 mm. Además, esta actividad varió significativamente en la solución concentrada a seis veces donde su actividad aumentó a 17 mm.

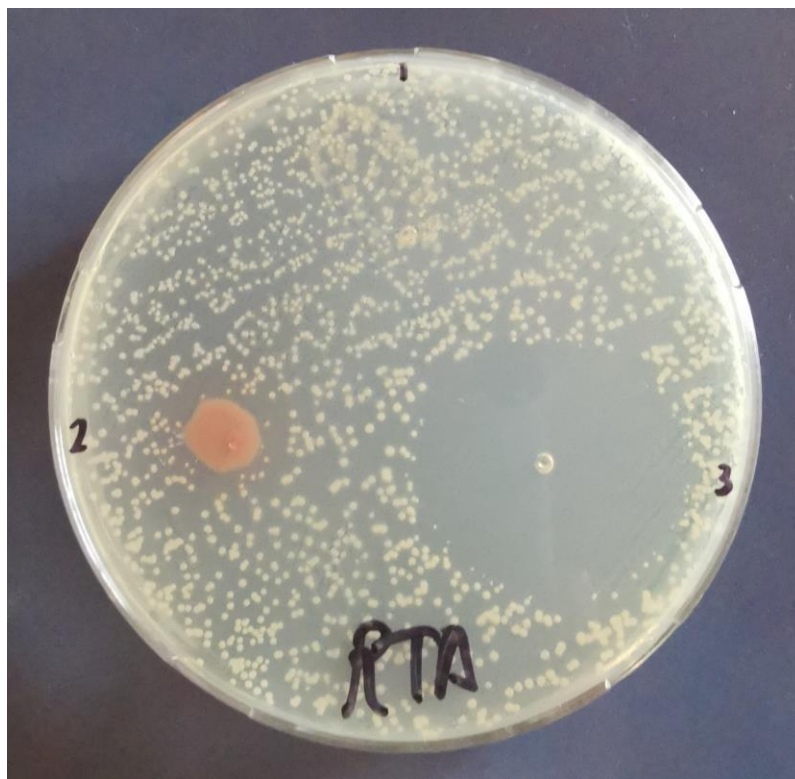
Luego de obtener esta concentración, se buscó determinar por medio de la tabla 14, el grado de sensibilidad con respecto al halo provocado por este extracto. Siguiendo la misma premisa, se toma el control positivo como punto de referencia para estimar el rango y así

poder catalogar la bacteria como sensible, intermedia o resistente.

En el dato mostrado al cuadruplicar la concentración, se clasificó como resistente al presentar un halo de 11 mm, y ser menor al rango establecido de menor o igual a 13 mm.

En el resultado obtenido en la muestra concentrada seis veces más, se observó un halo de 17 mm, lo cual, al compararlo con el rango presente en dicha tabla, se puede aseverar que esta bacteria es sensible a este extracto, debido a que tiene que ser superior o igual a 17 mm cumpliendo cabalmente.

**Figura 51. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *S. aureus* Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

### *Escherichia coli*

En este caso en particular como se demuestra en la figura 52 y tabla 13, se observó que el comportamiento de la bacteria a lo largo de todo el estudio es el mismo, ya que en ninguno de los casos se evidenció algún grado de actividad, a pesar de que se concentró seis veces el extracto original, por lo que se verifica que en este caso sólo el antibiótico inhibe este microorganismo.

**Figura 52. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *E. coli* Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

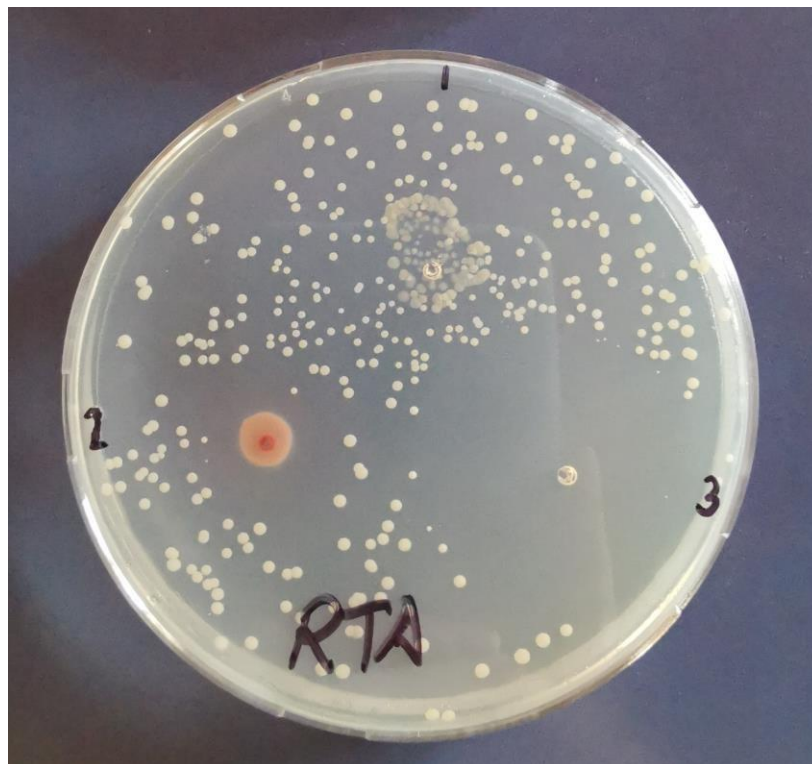
### *Pseudomonas aeruginosa*

En la tabla 13, se observó que conforme se iba aumentando la concentración, la inhibición provocada sobre el microorganismo era cada vez mayor. Esto se puede considerar, porque la muestra concentrada al doble del extracto acuoso de la corteza original, varió de no mostrar ninguna actividad, a provocar un halo de 19 mm, lo cual es un cambio importante en el comportamiento. De igual forma se siguió incrementando esta concentración, y se pudo

comprobar que afirmativamente ocurrió lo planteado, ya que cuanto más concentrado estaba la muestra, mayor inhibición presentaba. En la máxima concentración alcanzada (seis veces), se acrecentó el halo a 22 mm, siempre respetando la solubilidad del extracto. Con lo anterior, se puede decir que la inhibición de esta bacteria es dependiente de la concentración de la sustancia utilizada, como se observa en la figura 53.

Así mismo se analizó el halo obtenido en las muestras concentradas, para observarse el resultado anterior se mantuvo o se modificó y poder catalogar como sensible, intermedio o resistente al extracto, de acuerdo con los rangos proporcionados por el levofloxacinó en la tabla 14. Las tres muestras concentradas una doble, la otra cuatro veces y la última a seis veces, presentaron halos de 19 mm, 20 mm y 22 mm respectivamente. Estas tres pruebas se clasificaron como sensibles para la *Pseudomona aeruginosa*, debido a que el rango establecido tiene que superar o igualar los 17 mm, y en los tres se cumple la premisa, verificando que al aumentar la concentración se incrementaba su capacidad inhibitoria.

**Figura 53. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *P. aeruginosa* Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

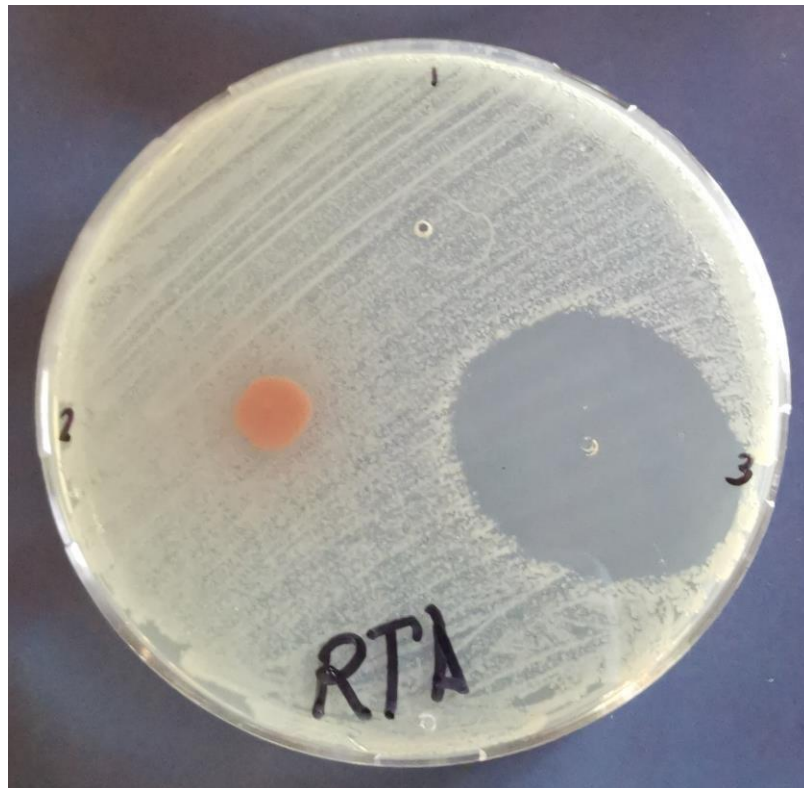


Fuente: Elaboración propia, 2020.

***Klebsiella pneumoniae***

Como se evidencia en la figura 54 y tabla 13, no se demuestra ningún grado de actividad proveniente del extracto utilizado, esto vuelve a ratificar lo obtenido en las primeras pruebas antimicrobianas realizadas, ya que en ellas no se observa que esta bacteria sea sensible a este extracto. Como se mencionó en la prueba realizada a la concentración madre, esto se debe a que esta bacteria tiene una multi-resistencia al producir una sustancia que la protege.

**Figura 54. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *K. pneumoniae* Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 13. Datos de la Medición de los Halos de Inhibición de las Bacterias Utilizadas Para la Investigación con los Extractos Más Concentrados del Extracto Acuoso de la Corteza**

Número de ubicación	Sustancia utilizada	<i>Staphylococcus Aureus</i> (mm)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (mm)	<i>Escherichia Coli</i> (mm)	<i>Pseudomona aeruginosa</i> (mm)
1	Agua	-	-	-	-
2	Extracto acuoso corteza (doble)	-	-	-	19
3	Extracto acuoso corteza (cuádruple)	11	-	-	20
4	Extracto acuoso corteza (séxtuple)	17	-	-	22
5	Levofloxacino	28	26	21	25

Fuente: Elaboración Propia, 2020

**Tabla 14. Clasificación de la Sensibilidad de Acuerdo al Halo de Inhibición de Cada Bacteria con Respecto al Antibiótico Utilizado (Levofloxacino)**

Microorganismo	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$
<i>Escherichia coli</i>	$\geq 17$	14-16	$\leq 13$

Fuente: Picaso, 2013

### *Candida albicans*

Se repite el comportamiento en relación con el hongo, en el cual la actividad mostrada es mayor en la muestra concentrada seis veces frente a la concentración madre. Lo anterior se describe en la tabla 15, donde se observa que la inhibición aumentó a un halo de 15 mm con respecto al resultado de inicial, que no presentó ninguna alteración.

Por lo mencionado se puede deducir que el hongo cuenta con una conducta similar a algunos microorganismos al ser dependientes de la concentración, esto porque se corroboró que al incrementar la misma, la inhibición aumentó de forma semejante, como se observa en la figura 55.

Se tomó como referencia el fluconazol (tabla 16), para comparar los datos obtenidos por este y establecer los valores en los que una sustancia se cataloga como sensible, intermedia o resistente mediante el control positivo.

En esta ocasión se observa que la muestra concentrada al doble presentó una inhibición de 9 mm, la de cuatro veces de 12 mm y la de seis veces de 15 mm. De manera detallada, se observa que la muestra duplicada y cuadruplicada es resistente, ya que están por debajo de 14 mm. Por otro lado, la concentrada seis veces, se encuentra en el rango de 15-18mm, correspondiente a una sensibilidad intermedia. Esto demuestra que, si se aumenta la concentración, se aumenta la sensibilidad de la misma.

**Figura 55. Prueba de Sensibilidad Antifúngica de *Candida albicans* Frente a la Extracción Acuosa de la Corteza Concentrada de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Tabla 15. Datos de la Medición del Halo de Inhibición del Hongo *Candida albicans* Utilizado Para la Investigación con el Extracto Acuoso de la Corteza más Concentrada**

Número de ubicación	Sustancia utilizada	<i>Candida albicans</i> (mm)
1	Agua	-
2	Extracto acuoso corteza (doble)	9
3	Extracto acuoso corteza (Cuádruple)	12
4	Extracto acuoso corteza (séxtuple)	15
5	Fluconazol	35

Fuente: Elaboración propia, 2020

**Tabla 16. Clasificación de la Sensibilidad de Acuerdo al Halo de Inhibición del Hongo con Respecto al Antimicótico Utilizado (Fluconazol)**

Microorganismo	Sensible	Intermedio	Resistente
<i>Candida albicans</i>	$\geq 19$	15-18	$\leq 14$

Fuente: Picaso, 2013

**Prueba de Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance) Mediante el Método del Epsilon Test Frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans***

Se realizó este procedimiento para identificar la concentración mínima inhibitoria de cada uno de los extractos frente a los microorganismos y el hongo utilizado, por medio del uso del método de Epsilon test, según lo establece Picaso (2013), consistía en colocar tiras estériles de filtro en la placa petri, verter en las mismas 5  $\mu$ l de las diluciones realizadas de mayor a menor concentración, empezando por la concentración madre hasta una dilución 16 veces está y posteriormente proceder a establecer la concentración mínima inhibitoria mediante el halo mostrado alrededor de ellas. Un aspecto por considerar, es que únicamente se probó las bacterias y el hongo que presentaron algún grado de actividad en las pruebas de sensibilidad efectuadas, del mismo modo, en cada caso se aplicó los extractos que mostraron dicha acción.

A continuación, se detallada cada uno de las pruebas realizadas.

### ***Staphylococcus aureus***

A este microorganismo fue el único al que se le realizó la prueba con los extractos acuosos y etanólicos de las hojas y de la corteza, ya que estos mostraron sensibilización en las pruebas anteriores. En la tabla 17, se observan las diluciones realizadas a cada extracto para utilizarlos en este método las cuales se colocan de mayor a menor concentración de afuera hacia adentro del papel filtro, en posiciones establecidas.

Como se observa en la figura 56, en la posición uno se cuenta con el extracto etanólico de la corteza, donde en el método de sensibilidad anterior presentó una inhibición importante. En esta ocasión se observa que al analizar los datos obtenidos, se alcanzó una concentración mínima inhibitoria en la dilución de 8 veces la madre, la cual corresponde a un valor de 0,03194 g/mL.

En el caso del extracto ubicado en la posición número dos correspondiente a la muestra etanólica de las hojas, se observa un comportamiento similar al anterior ya que se origina una inhibición hasta la cuarta dilución, la cual de igual manera, se encuentra 8 veces diluida a una concentración de 0.06628g/ml..

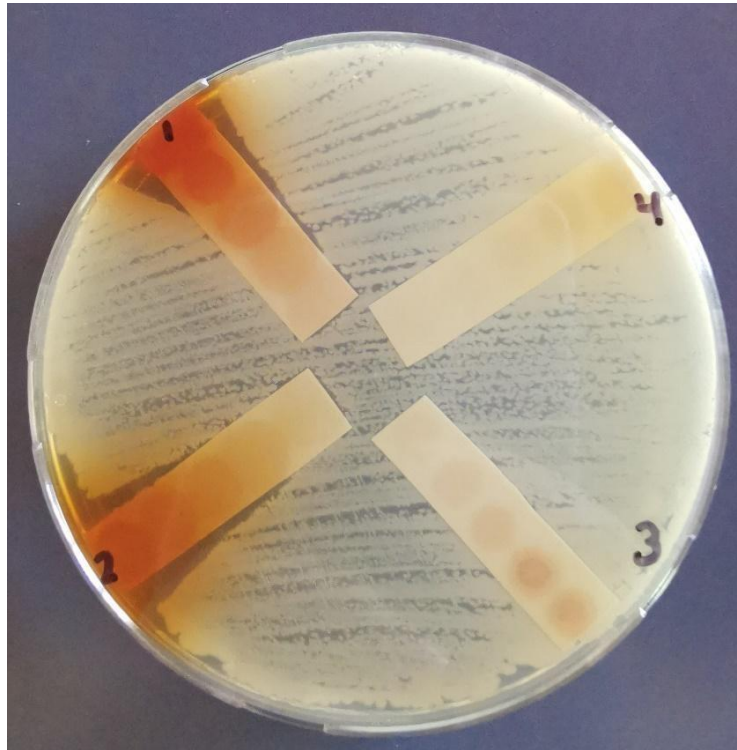
Al realizar este método se reafirma y corrobora lo establecido en los procedimientos anteriores, donde se evidencia que fueron los extractos etanólicos los que presentaron una mayor y más notable actividad con respecto a la inhibición de esta bacteria, así mismo esto conlleva a que la concentración mínima sea más notable a la hora de obtenerla.

El extracto acuoso de la corteza, fue al que se le aumentó la concentración del mismo para observar si acrecentaba su actividad; dio positivo, similar a los resultados de las pruebas pasadas. Por la razón anterior se utilizó la concentración de 6.000g/ml como madre para comenzar el estudio, donde en este caso, se observa una inhibición menor que en los casos anteriores ya que esta fue únicamente a el valor mencionado y no en las diluciones realizadas.

Por último, se analizó el extracto acuoso de las hojas, el cual es importante ya que solo contra el *Staphylococcus aureus* presentó actividad en las pruebas específicas que se realizaron para determinar este dato. Este extracto se colocó en la posición cuatro de la placa petri y como se observa en la figura correspondiente, su actividad solo se presentó en la concentración madre sin observarse ningún otro efecto, lo que se asemeja al caso anterior.

Estos datos obtenidos en los extractos acuosos, reafirman lo mencionado en esta investigación, donde se ha establecido repetitivamente que las muestras acuosas desarrollan una actividad sumamente menor que los obtenidos en las muestras alcohólicas. Por consiguiente, se deduce que en el caso de *Staphylococcus aureus*, la parte etanólica presenta una mayor actividad antimicrobiana.

**Figura 56. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *S. aureus* Frente a los Cuatro Extractos Acuosos y Etanólicos de *Byrsonima crassifolia* (Nance).**



Fuente: Elaboración propia, 2020

### ***Escherichia coli***

En el caso de este microorganismo se emplearon tres extractos, como se observa en la figura 57, puesto que aunque en las pruebas anteriores solo los extractos alcohólicos mostraron actividad, se realizó también la prueba al extracto acuoso de corteza para comparar su actividad.

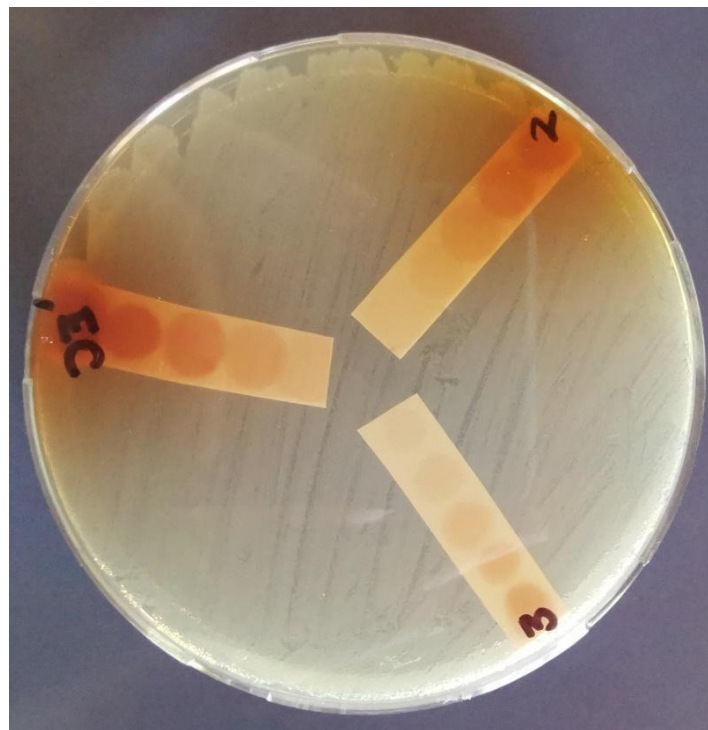
En la posición uno se colocó el extracto etanólico de la corteza que había mostrado actividad en la prueba realizada. En esta ocasión como se ve en la tabla 17, se demostró que

solo el extracto madre 0.2555g/ml mostró actividad, lo cual tiene mucha similitud con el halo obtenido en la prueba de sensibilidad realizada a este mismo extracto, donde fue de un tamaño relativamente pequeño.

El extracto etanólico de las hojas, el cual se observa en la posición número dos, muestra una sensibilidad hasta la segunda dilución, correspondiente a 0.2651g/ml. Esto es congruente con lo obtenido en las pruebas realizadas con anterioridad a esta bacteria, ya que su inhibición no fue muy notoria.

En esta ocasión, se plantea que solo los extractos etanólicos presentan actividad frente a la *Escherichia coli*, debido a que ninguna muestra acuosa evidenció alguna alteración en la placa. Lo anterior se reafirmó en la prueba realizada a este microorganismo con el extracto acuoso de la corteza concentrado seis veces, ya que a pesar de que su concentración fue aumentada, su inhibición siguió siendo totalmente nula, por lo que se establece como inactiva en la tercera posición.

**Figura 57. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *E.coli* Frente al Extracto Acuoso de la Corteza, Etanólico de la Corteza y de las Hojas *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



Fuente: Elaboración propia, 2020

### ***Pseudomona aeruginosa***

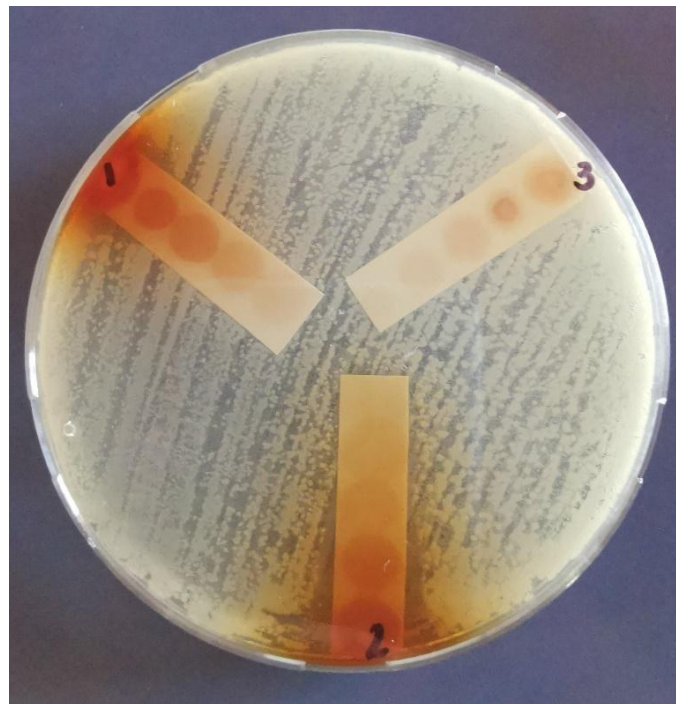
En la figura 58, los extractos etanólicos de la corteza y de las hojas, así como la muestra acuosa de corteza, fueron los utilizados para determinar la concentración mínima de efecto antimicrobiano frente a la *pseudomona aeruginosa*.

Se colocó en el lugar uno el extracto etanólico de la corteza, donde se observó la actividad hasta la segunda dilución, que de acuerdo con la tabla 17, corresponde a 0.1278g/ml, lo cual concordó con los resultados de las pruebas de sensibilidad anteriores.

En la posición dos se evidenciaron los resultados obtenidos con el extracto etanólico de las hojas, en donde se manifestó su actividad hasta la dilución de 0.1326g/ml, correspondiente a la muestra diluida 4 veces. Este resultado es importante ya que se observó una concentración mínima inhibitoria notable para este microorganismo.

Con respecto al extracto acuoso de la corteza, ubicado en la tercera posición, se utilizó la muestra concentrada al séxtuple de la madre, ya que en las pruebas realizadas a esta concentración, aumentó su halo de inhibición para esta bacteria. En este caso se observó que su acción se desarrolló hasta la primera muestra utilizada correspondiente a la concentración madre reconstituida, por lo tanto se deduce que no inhibe a una concentración más diluida.

**Figura 58. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *P. aeruginosa* Frente al Extracto Acuoso de la Corteza, Etanólico de la Corteza y de las Hojas *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



### *Candida albicans*

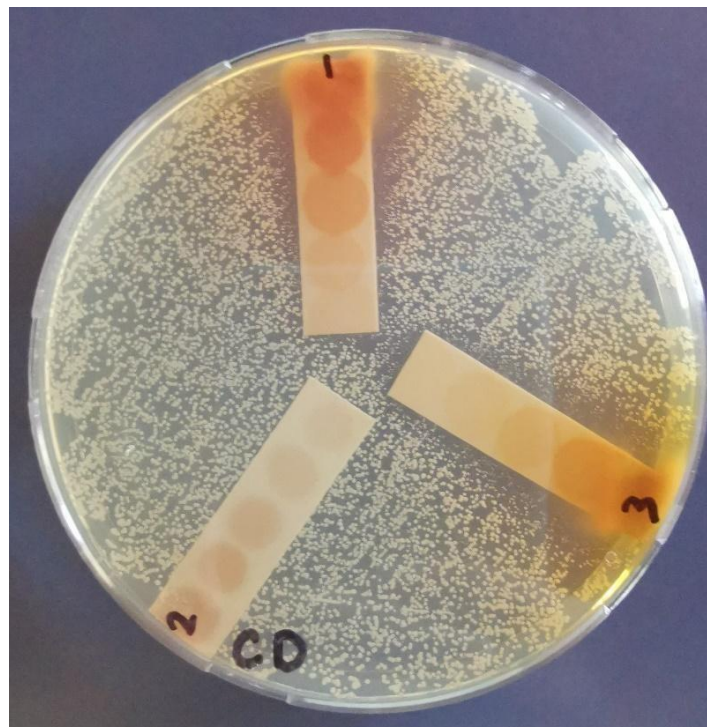
En la tabla 15, se muestran las diluciones de los extractos utilizadas contra este microorganismo, tomando en cuenta que solo se aplicaron las muestras que manifestaron actividad en las pruebas de sensibilidad realizadas anteriormente. (Figura 59)

En el caso del extracto etanólico de la corteza en la posición uno, se observa una notoria inhibición, debido a que se ve un efecto hasta la cuarta dilución correspondiente a 0.03194g/ml, esto es factible con el halo provocado anteriormente.

En segundo lugar, se colocó el extracto etanólico de las hojas, lo que demostró una actividad mucho menor ya que su inhibición sólo ocurrió en la muestra madre a 0.5302g/ml, esto podría significar que al diluir la misma se pierde la capacidad de acción, por ende se infiere que se necesita de una concentración elevada para lograr su efecto inhibitorio.

En las pruebas de sensibilidad realizadas, se incrementó la concentración del extracto acuoso de la corteza, y se demostró que de forma análoga aumentaba la inhibición, por ende se utilizó el concentrado a 6.000g/ml para realizar el procedimiento. Se observó una actividad hasta 0.7500g/ml, de modo que confirma la necesidad de una concentración relativamente baja para que se vea el efecto deseado.

**Figura 59. Prueba de la Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria de *C. albicans* Frente al Extracto Acuoso de la Corteza, Etanólico de la Corteza y de las Hojas *Byrsonima crassifolia* (Nance)**



**Tabla 17. Concentraciones Utilizadas de Cada Extracto Para Realizar la Prueba de Identificación de la Concentración Mínima Inhibitoria del *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y el hongo *Candida albicans***

Etanólico corteza (g/ml)	Etanólico hojas (g/ml)	Acuoso corteza (g/ml)	Acuoso hojas (g/ml)
0.2555	0.5302	6.000	0.09570
0.1278	0.2651	3.000	0.04785
0.06388	0.1326	1.500	0.02393
0.03194	0.06628	0.7500	0.01196
0.01597	0.03314	0.3750	0.005981

Fuente: Elaboración propia, 2020

**Tabla 18. Resumen de la Concentración Mínima Inhibitorio de Cada Extracto Analizado Frente a Cada Microorganismo y Hongo Estudiado**

Sustancia utilizada	Concentración g/mL Extracto etanólico corteza	Concentración g/mL Extracto etanólico hojas	Concentración g/mL Extracto acuoso corteza	Concentración g/mL Extracto acuoso hojas
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.03194	0.06628	6.000	0.09570
<i>Escherichia Coli</i>	0.2555	0.2651	-----	-----
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0.06388	0.1326	6.000	-----
<i>Candida albicans</i>	0.03194	0.5302	0.7500	-----

Fuente: Elaboración propia, 2020

### **Determinación de la Actividad de Amplio Espectro de los Extractos Etanólicos y Acuosos de la Corteza y de las Hojas de *Byrsonima crassifolia* (Nance)**

En la prueba realizada al extracto acuoso de la corteza con una concentración aumentada seis veces de la inicial, se evidenció un crecimiento importante en el halo de inhibición del *Staphylococcus aureus* catalogada como una bacteria gram positiva y la *Pseudomona aeruginosa* clasificada como gram negativo. Por lo anterior, se puede señalar como un extracto de amplio espectro, ya que siguiendo lo mencionado en un artículo publicado por Martín (2015), se atribuye esta cualidad a aquellos antibióticos o sustancias que actúan sobre bacterias tanto gram positivas como gram negativas; ello se debe a que poseen un espectro de actividad más amplio, buena disponibilidad y penetración tisular.

Por esta razón se evidenció que específicamente, la muestra que correspondía al extracto acuoso de la corteza, se pudo registrar bajo la premisa de sensible para este extracto, ya que elimina ambos tipos de microorganismos (el *Staphylococcus aureus* y la *Pseudomona aeruginosa*).

Además, se demostró un comportamiento análogo en lo referente a la *Candida albicans*, ya que al analizar dicho hongo frente al extracto acuoso de corteza, se observó una actividad importante en lo alusivo a su inhibición que generó cierta variación en lo concerniente a su sensibilidad, debido a que se cataloga esta actividad como una sensibilidad intermedia.

En el caso de los resultados obtenidos con los extractos etanólicos se establece que no cumple con los requisitos para ser catalogado como de amplio espectro, porque aún cuando se observa un grado de inhibición en la mayoría de las bacterias, en todos los casos se clasificaron como resistentes, debido a que el halo de inhibición no fue suficientemente extenso. A pesar de presentar este resultado, se puede considerar que al aumentar la concentración del mismo, esta actividad va a incrementar cómo fue en el caso del extracto acuoso de corteza, sin embargo, esto no se puede asegurar hasta ser demostrado mediante las pruebas antimicrobianas necesarias.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este apartado se presentarán las conclusiones más relevantes que se obtuvieron en la realización de este proyecto de investigación. Así como las principales recomendaciones que se pueden implementar para lograr resultados más concretos.

### Conclusiones

- En esta investigación se evidenció mediante las pruebas fitoquímicas y espectroscopias realizados a los extractos acuosos y etanólicos de la corteza y de las hojas del nance, la presencia de metabolitos secundarios como lo son: taninos, flavonoides, alcaloides y saponinas.
- La prueba de sólidos totales realizada a los extractos etanólico corteza, etanólico hojas y acuoso hojas, es útil para establecer la concentración del extracto madre y así poder fijar un parámetro de inicio para efectuar las microdiluciones previas a definir la concentración mínima inhibitoria de cada bacteria y hongo.
- En el caso del extracto acuoso corteza se le realizó una purificación por el método de liofilizado, el cual permitió preparar disoluciones más concentradas y determinar aquella concentración a la que se obtenga actividad comparable al antibiótico de referencia.
- Las muestras de los extractos etanólicos tomadas de la concentración madre, poseen mayor actividad antimicrobiana y antifúngica en comparación con los extractos acuosos, debido a que, según lo mostrado en los resultados, este último presentó únicamente actividad frente al *Staphylococcus aureus*.
- El etanol empleado como blanco en los extractos alcohólicos, solo presentó inhibición frente al *Staphylococcus aureus*; sin embargo, esta actividad fue menor que la mostrada por los extractos obtenidos con este solvente.
- La actividad de los extractos etanólicos frente al *Staphylococcus aureus* depende de la concentración; sin embargo, todas las muestras analizadas muestran una inhibición importante contra el microorganismo, siendo evidente con los halos obtenidos en la placa petri, ya que se demuestra que, si la concentración es mayor, la inhibición por parte del extracto utilizado va a ser superior. Por consiguiente, el extracto madre que mostró una concentración menor el cual correspondió al de acuosa corteza, se cataloga como inactivo frente a este microorganismo.

- En el caso de la *Pseudomona aeruginosa* se observó actividad antimicrobiana en los extractos (etanólico de la corteza y etanólico de las hojas). En esta ocasión, se visualiza una inhibición similar entre las dos muestras analizadas, demostrando así que la concentración de la muestra no se ve afectada, sino la actividad propia que pueda ejercer este.
- La *Escherichia coli* solo muestra actividad frente a los extractos etanólicos. En este caso se demuestra que, aunque los halos no difieren abundantemente entre sí, se establece que el extracto etanólico de las hojas presentó mayor inhibición que el extracto etanólico de la corteza, por lo que cumple con la premisa descrita con anterioridad donde se observa que a mayor concentración del extracto, mayor inhibición.
- También se analizó la *Klebsiella pneumoniae* donde no se evidenció ningún tipo de inhibición de los cuatro extractos utilizados, lo cual demuestra que los mismos son inactivos frente a ella.
- Se demostró que al aumentar la concentración del extracto acuoso de la corteza, se incrementa igualmente la inhibición que este provoca en las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, y en el hongo *Candida albicans*.
- El extracto acuoso de la corteza se cataloga como sensible frente al *Staphylococcus aureus* en la muestra concentrada seis veces (6g/ml), al presentar un halo mayor o igual al teórico.
- La *pseudomona aeruginosa* se ve afectada por el grado de concentración del extracto acuoso de la corteza, ya que al aumentar este, lo hace también la actividad antimicrobiana. Se observó que las tres muestras concentradas superan el rango de mayor o igual a 17mm, por lo que se consideran sensibles.
- Al aumentar la concentración del extracto acuoso de la corteza, se amplía la inhibición de *Candida albicans*, ya que como se evidenció en la incrementada al doble y cuatro veces su concentración, se catalogan como resistentes, mientras la sextuplicada está contenida en el rango de acción intermedia.
- En el caso de los microorganismos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* se demostró que, aunque se aumentara la concentración del extracto acuoso de la corteza

hasta en seis veces, el comportamiento se mantuvo igual al primer análisis al no presentar ningún grado de inhibición.

- El método de Epsilon test es un procedimiento confiable y fácil de realizar para determinar la concentración mínima inhibitoria de sustancias con respecto a diferentes microorganismos que se pretendan analizar.
- Con respecto al *Staphylococcus aureus*, se establece que el extracto etanólico de la corteza fue el que presentó un valor de menos inhibición con respecto a la concentración de las muestras utilizadas ya que esta fue de 0,03194 g/ml.
- En la *Escherichia coli* se mostró que la mayor inhibición fue presentada por el extracto etanólico hojas, aunque esta solo se visualiza hasta la concentración de 0.2651g/ml, lo cual corresponde a la segunda dilución.
- El extracto etanólico de las hojas fue el que presentó mayor inhibición en lo que concierne a la *pseudomona aeruginosa*, la cual corresponde a la concentración de 0.1326g/ml.
- La concentración mínima inhibitoria de *Candida albicans*, presentó un valor inferior de actividad al correspondiente extracto etanólico corteza, ya que su inhibición se desarrolló hasta la muestra diluida 8 veces lo que resultó en 0,03194 g/ml.
- Se cataloga el extracto acuoso de corteza como de amplio espectro, al mostrar una inhibición notable tanto en el *Staphylococcus aureus* (gram positivo) como en la *Pseudomona aeruginosa* (gram negativo).

### **Recomendaciones**

- Para realizar la extracción de las hojas, es recomendable utilizar un recipiente de boca ancha y no agregar demasiada cantidad de material para que no exceda la capacidad del envase.
- Se aconseja utilizar otros métodos de extracción para comparar el rendimiento de cada una de ellos y determinar cual genera un mejor porcentaje de obtención de los extractos.
- Utilizar para la investigación, otras partes de la planta *Byrsonima crassifolia* para así lograr identificar si presenta una mayor actividad antimicrobiana y antifúngica que las estudiadas en este trabajo.

- Purificar en su totalidad todos los extractos utilizados, para así lograr aumentar la concentración de las muestras en el estudio y obtener mejores resultados.
- Se sugiere variar los microorganismos utilizados para realizar este análisis, lo anterior siguiendo lo recomendado en la literatura, para verificar si cuenta o no con actividad.
- Para futuras investigaciones se aconseja utilizar equipos más eficientes para la purificación de la muestra obtenida, como en el caso del rotavapor, que este sea más eficaz al momento de realizar la extracción de solventes. Además, es importante contar con una zona acondicionada para poder realizar los estudios microbiológicos adecuadamente.
- Se recomienda aumentar la concentración de los extractos etanólicos, para obtener un posible mejor rendimiento al aplicar las pruebas de sensibilidad, y así ampliaría el espectro de los extractos.
- Se sugiere realizar pruebas que demuestren el grado de toxicidad al aumentar la concentración de los extractos, para establecer hasta dónde es aceptable realizarlo.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Agudelo, Y., Echeverri, L., Maya, W., Ospina, S y Rueda, Z. (2012). *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Rev Chil Infect* 2012; 29 (2), p. 175

Aguilar, L y Calderón, G (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica* LXXIII 621. pp. 758

Aguilar, S., Aguirre, E., Cifuentes, J., Ulloa, M y Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México *Biodiversidad de hongos en México* 85. P.78

Ahón, K y Rengifo, F. (2019). Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de óxido de zinc sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644PK/5. Tesis para optar por el grado de Biologo - microbiologo. Universidad Nacional de Trujillo. pp.6-7

Alcívar, U., Bravo, L., Dueñas, A., Sacon, E y Villanueva, G. (2016). Determinación de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos a partir de *Chuquiraga Jussieuif* Gmel usando la lixiviación de muestras sólidas.

Alemañy, J., Cedeño, R., Dayamí, R., Marrero, I., Martínez, A y Montes, M (2017) Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Cienfuegos 15(2), 211

Almada, P., Basualdo, W., Campuzano, A., Carpinelli, L., Castro, H., Espínola, C., Gómez, G., Grau, L., Guillén, R., Macchi, M., Ortellado, J., Quiñónez, B., Rodríguez, F., Rodríguez, M., Samudio, G., y Velázquez, G. (2016). *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. *Rev Chilena Infectol* 33 (6): 609

Álvarez, D., Mangwani, S., Martínez, A., Paz, V., Solano, S y Vázquez, R(2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol* 36 (2): 180-181

Álvarez, I y Ponce, J. (2012). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*. 84(2). p. 384

Arenas, R y Rodríguez, P. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 16(2)pp. 166-167

Argandoña, L y Macías, R (2013). “Determinación de sólidos totales, suspendidos, sedimentados y volátiles, en el efluente de las lagunas de oxidación situadas en la Parroquia Colón, cantón Portoviejo, provincia de Manabí, durante el período de marzo a septiembre 2013”. Tesis previo a la obtención del título de Ingeniero químico. Universidad Técnica de Manabí. p.33

Arias, J., Dzul, K., López, K., Lugo, C y Zavala, J (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. *Revista Biomédica*, 128

Avalos, Soto y Zendejas (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 25. p. 130

Ávila, J., Huanca, J Y Jaimes, P (2018). Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de la *Mentha spicata* (hierba buena) contra cultivos de *Candida albicans*. Universidad Interamericana. pp. 18-19-20

Avilés, G (2015). Rico y popular: Importancia y usos tradicionales del nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C, 159.

Avitia, E., Castillo, A., Colinas, M., Corona, T., Lázaro, E., Martínez, E., Medina, R y Terrazas, T. (2010). Caracterización morfológica de hojas de nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K.). Rev. Fitotec. Mex. 33 (4).p.15

Baquero, F, Galán, J y Moreno, A (2014). Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. Rev Esp Salud Pública 88, p.830

Baptista, M., Hernández, R., y Fernández C. (2014). Metodología de la Investigación. México: McGRAW-HILL

Barrera, M y Méndez, Y., (2016). Fisiopatología de la sepsis por gram positivos. Revista Cuarzo - Fundación Universitaria Juan N. Corpas. 22 (1). pp.51-52

Batra, S (2017). *Staphylococcus aureus* – morphology, classification, culture, identification, toxins & laboratory diagnosis. Paramedics World

Batz, S., Cardona, A., Castillo, V., Godoy, C y Jom, R (2014). Uso tradicional de plantas medicinales y de remedios caseros para tratamiento de infecciones en menores de cinco años. Tesis de la Universidad De San Carlos De Guatemala

Berlanga, M y Ricardo Guerrero, R. (2017) La complejidad de lo simple: la célula bacteriana. Revista QuímicaViva 2. pp. 13-14

Betancourt, E (2015). Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Pseudomona aeruginosa* aisladas en pacientes del Hospital Isidro Ayora de la ciudad de Loja, julio - septiembre de 2014. Tesis para optar por el título de Magister en Microbiología Mención Biomédica. p. 16

Blanco, I y Caballero, C (2015). Propuesta de validación del método de espectroscopia infrarroja para la cuantificación de grasas trans en margarina. Trabajo para optar al grado de Licenciada en Química y Farmacia. Universidad en el Salvador. pp.32-33

Canet, J (2016). Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I). Betelgeux. parr.1-2

Canteras, M., García, E., Gómez, J., Hernández, A., Moreno, L., Simón, M., y Yagüe, G., (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Rev Esp Quimioter* 31(2), p.124

Calvo, J y Martínez, L (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*27(1) p. 45

Casado, V (2018). Optimización de la extracción de los aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. Universidad Politécnica de Madrid.

Carvalho, J, Monteiro, K, PomPeu, D, H Rogez, H y Tinti, S (2012). Capacidad antioxidante y cribado farmacológico de extractos crudos de hojas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*. 42(1), pp: 165 – 172.

Cervantes, E., García, R y Salazar, P, (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 61 (1): 28

Cevallos, I (2018). Técnicas de identificación y cuantificación de los principios activos con potencial uso en el sector cosmético encontrados en las especies del género *Opuntia* de la familia Cactaceae. Para optar por el título de Licenciada en Ciencias Químicas con mención en Química Analítica. p.38

Correa, M y Jiménez, J. (2009). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. *Iatreia* 22 (2). p.148

Cruz, A., Dávila, L., Escalona, G., Eslava, C., Giono, S., Hernández, R., Jiménez, Y., López, B, López, F, Ochoa, S y Xicohtencatl, J (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 7 (2). p.140.

Cruz, E (2015). Antibióticos vs. Resistencia bacteriana. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta* 40(2)

Cruz, J., González, A., Moreno, M., Nieves, B., Puig, J y Solórzano, M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de b-lactamasa de espectro

extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. Rev Chilena Infectol 30 (4): 374-380. 374

Cubero, M. (2015). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. Universitat de Barcelona

Cuevas, J. (2016). Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. Revista digital universitaria. 17 (p). pp.3-4

Delgado, F., Díaz, S., López, G., López M., Montes, J., Pío, J., Uribe, M., Willms K. (2013). Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 12, pag. 357

Díaz, J., Estrada, G., Márquez, M y Sánchez, O (2015). Candidiasis bucal en pacientes con tratamiento antineoplásico. MEDISAN 19(9), 1081

Di Maio, A., Píttori, A., Taus, V y Villagrán, Y (2012). Relación entre la velocidad de succión capilar y la velocidad de secado de probetas de Hormigón. La Plata. p.120

Enríquez, J y Solange, E (2019). Evaluación de actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acuoso del rizoma *smilax purhampuy* en *bacillus cereus*, *staphylococcus aureus*, *candida albicans*. Requisito para optar al grado de Químico y Farmacéutico, Universidad de Guayaquil. pp.40-41

Espinoza, J., Rodríguez, M., Sejas, A., Sejas, M y Zurita, B (2016). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* en portadores nasales del personal de enfermería - Hospital Viedma. Revistas Científica Ciencia Médica. p.30

FOOD Y DRUG Administration (FDA) (2019). *Escherichia coli* (E. coli). Recuperado de: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/escherichia-coli-e-coli>

Franco, P., López, L., Orozco, M y Ramírez, L. (2013). Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. Revista Lasallista de la investigación 10 (1). p.91

Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med.* 2016;77(4)

Gellen, L y Silva, E (2016). Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de *Byrsonima crassifolia*. *J. Bioen. Food Sci*, 03(2)pp: 63-71.

Gil, M (2019). Agar cuenta estándar: fundamento, preparación y usos. *Biología*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/agar-cuenta-estandar/>

González, C y Mollinedo, M (2014). Bacterias Gram negativas. *Revista de Actualización Clínica* (49), pp. 2609-2612

Gutiérrez, M y Peña, D (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Mintostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. *Revista Ciencia y Tecnología* 13(3). p.33

Gutierrez, N., Sánchez, P y Muñoz, R. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Revista Spei Domus* 8 (17). p.33.34

Hamers, L (2018). A new antibiotic uses sneaky tactics to kill drug-resistant superbugs. *ScienceNews*

Herrera, J., López, E., Manchón, N y Navarro, A (2014). Componentes funcionales en Nanche (*Byrsonima crassifolia* (L)Kunth). *Universidad Tecnológica de Izúcarde Matamoros*.p. 8

Janon, D (2016). Determinación fenotípica de cepas de *Escherichia coli* resistente a betalactámicos, por la técnica de doble disco, en pollos faenados en seis camales industriales de la provincia de pichincha. Trabajo de Grado presentado para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista. (p.7)

Jima, L (2015). Concentración mínima inhibitoria de cefotaxima frente a *Escherichia coli spp.* aislada en urocultivos de pacientes que acuden a consulta externa del hospital. Tesis para optar por el título de Licenciada por Laboratorio Clínico. *Universidad Nacional de Loja*. p. 15-16

Kuno, A y Vargas, T. (2014). Morfología bacteriana. Revista de Actualización Clínica, 49(2), 2595-2596

Laca, G, Pozo, J y Evaristo, W (2013). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico y acuoso de *Byrsonima crassifolia* "Indano" mediante el método de difusión en agar. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Perú.

Leiva, A (2015). Principio de funcionamiento del rotavapor. parr. 2-3

Lifshitz, A (2011). Las alternativas farmacéuticas. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM . p.46

Lima, W y Morales, R (2014). Caracterización farmacobotánica de *Byrsonima crassifolia* y *Neurolaena lobata*. Tesis por el título de química biólogas. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Lopardo, H (2016). Introducción a la microbiología clínica. Universidad Nacional de la Plata, pp.33 y 271

Luján, D (2014). Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 48 (4), 466.

Madrigal, F (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del producto aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Mancebo, B., Regalado, A y. Sánchez, L (2012). Tratamientos convencionales y medicina alternativa de la úlcera péptica. Revista Cubana de Farmacia 43 (1). p.133

Mata, A (2017). Estudio retrospectivo sobre Resistencia Antimicrobiana de la *Escherichia coli* frente a los Antibióticos de mayor uso para tratar Infecciones del Tracto Urinario en pacientes femeninas del GAM entre enero del 2016 y diciembre del 2016. Trabajo de graduación para optar por la licenciatura en Farmacia en la Universidad Internacional de las Américas

Morejón, M (2013). *Escherichia coli* multirresistentes. Revista Cubana de Urología 2 (1). p 4-5

Moreno, G. (2015). Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante del extracto del fruto del nanche (*Byrsonima crassifolia*). Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias alimentarias. Universidad Veracruzana. p, 2-3

Mora, D y Vargas, S. (2018). Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Cinnamomum verum* (Canela), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Ocimum basilicum* (Albahaca), para su estudio sinérgico y comprobar su efecto en *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2018). E.Coli. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. parr.2-3

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>

Otto, M., (2014). Toxinas de *Staphylococcus aureus*. Opinión actual en microbiología 17. p.32

Parra, R. (2017). Efecto inhibitorio de extracto de *calendula officinalis* vs clorhexidina al 2% sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. . Tesis presentada previo a la obtención del Título de Odontólogo. p.5

Pastor, L. (2014). *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (*Malpighiaceae*): Actividad antimicrobiana y estudio de los metabolitos secundarios. Tesis por el título de licenciado en biología. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. 1

Pemán, J y Quindós, G (2016). Aspectos actuales de las enfermedades invasoras causadas por *Candida* y otros hongos levaduriformes. Revista Iberoamericana de Micología. 3(3):133–139

Peña, A (2019). Análisis comparativo de la actividad microbiológica de los extractos acuosos y metanólicos de *Lippia alba* y su evaluación inicial in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar por el grado de licenciatura en farmacia. Universidad Internacional de las Américas. p.58,62

Pérez, H y Robles, A (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista Médica MD 4 (3), p. 188-190

Picazo, J (2013). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica.

Ramos, G (2017). Optimización del proceso de liofilización de sistemas nanoestructurados de flurbiprofeno para uso oftálmico y su influencia en el comportamiento biofarmacéutico. Universitat de Barcelona. p.59-61.

Ramírez, C y Villalobos, J (2016). Análisis de las bacteremias por *Klebsiella pneumoniae* en pacientes del Hospital México. Acta méd costarric Vol 58 (2). p.63

Rodríguez, C., Sánchez, L y Zarate, A (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. NOVA. 2017; 15 (27). p.120

Simons, M, Reynolds, N y Rocha, C (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 32(1):139-145.

Seija, V y Vignoli, R (2008). Principales grupos de antibióticos. Recuperado de: [www.higiene.edu.uy](http://www.higiene.edu.uy) > cefa > BacteCEFA34. pp. 631-632

Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas. 404

Sosa, J., Sosa, Y y Valdés (2018). *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno de alta prioridad para la fabricación de nuevos antibióticos. Universidad de Ciencias Médicas de Matanzas. Matanzas, Cuba. p. 1272

Torres, M, Ortiz, M y Valdivia, R (2012). Propiedades Medicinales y otros usos del Nanche [*Byrsonima crassifolia* (L.): Revista Fuente Nueva Época 11(4), 18-19.

Martín, S (2015). Antibióticos de última generación. Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. pág. 58-63.

Valverde, J. (2018). Determinación de la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arabica* (café) variedad caturra y catuaí mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana in vitro y su aplicación en la industria farmacéutica. Tesis para optar por el grado de licenciatura. Universidad Internacional de las Américas. (p.26)

Venegas, P (2016). Evaluación de las condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para uso como antioxidante en aceites comerciales. Tesis para optar por el grado de licenciatura. Universidad de Costa Rica.