

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE FARMACIA

**DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS PRESENTE EN LA PULPA DE *COCOS*
NUCIFERA (COCO) SOBRE EL *STAPHYLOCOCCUS*
*AUREUS***

KARINA TORRES AGÜERO

TUTOR: LIC. JAVIER RODRIGO ALPÍZAR CORDERO

SAN JOSÉ, COSTA RICA

NOVIEMBRE, 2019

AGRADECIMIENTO

Primero que todo, quiero agradecer a Dios por brindarme la oportunidad de culminar este sueño que desde niña siempre anhelé; gracias por darme las fuerzas para continuar y las muchas bendiciones que me regaló en estos años de universidad.

A la empresa Chaso del Valle y a mi amiga Adriana Fonseca; ellos me brindaron sus instalaciones de la mejor manera posible, ayudándome en todo momento sin ningún costo.

A mis padres Xinia Agüero Araya y Alexis Torres Torres, quienes fueron mis pilares en todo este camino universitario por segunda vez. Estaré enormemente agradecida por todo el esfuerzo que hicieron para que yo cumpliera este sueño.

A mi hermano, por su apoyo incondicional, su cariño, y estar ahí cuando ocupaba algún favor.

Gracias al Lic. Javier Rodrigo Alpízar Cordero, por ser un excelente profesor, estar dispuesto a brindarme su tiempo y guiarme en este proyecto final de graduación.

DEDICATORIA

Este trabajo final de graduación es dedicado a las dos personas más importantes para mí, que son mis padres; ellos siempre han estado ayudándome y apoyándome incondicionalmente; definitivamente no me alcanzará la vida para agradecerles; los amo con todo mi corazón.

Por último, se lo quiero dedicar a mis dos abuelas, Sara y Olga, por ser tan especiales conmigo, siempre apoyándome y dándome su cariño.

Contenido

RESUMEN	18
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	19
Planteamiento del Problema	19
Hipótesis de Investigación	21
Hipótesis Nula	21
Objetivos	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	22
Justificación	22
Proyecciones	24
Antecedentes	24
Antecedentes Históricos	24
Antecedentes Internacionales	24
Antecedentes Nacionales	28
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	30
Generalidades de las Bacterias	30
<i>Estafilococos</i>	33
<i>Staphylococcus aureus</i>	33
Factores de virulencia	35
Aspectos patogénicos	37
Evolución de la Resistencia Bacteriana del <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos	39
Producción de una enzima que inactiva al antibiótico	39

Disminución de la penetración del antibiótico al lugar de acción	40
Modificación del lugar de acción del antibiótico.....	40
Producción de Bombas de Expulsión	40
Infecciones producidas por <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Síndrome de piel escaldada	42
Síndrome del shock tóxico.....	42
Impétigo	43
Celulitis.....	43
Forúnculos	44
Intoxicaciones alimentarias	44
Pruebas para el diagnóstico en infecciones por <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Frotis	45
Cultivo	45
Prueba Catalasa.....	45
Prueba Coagulasa.....	46
Tratamientos Utilizados.....	47
Análisis microbiológicos para <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Agar Baird-Parker.....	49
Agar Manitol-Sal	50
Agar Sangre	51
Agar Müller Hinton	52
Fitofármacos	53
Métodos de extracción.....	54
Maceración.	54
Percolación.	55

	10
Extracción Soxhlet.....	55
Generalidades del coco	55
Taxonomía	58
Fitoquímica de la planta.....	58
<i>Actividad farmacología.</i>	59
Tamizaje Fitoquímico.....	61
Metabolitos secundarios	62
Alcaloides.	62
Terpenos.	63
Flavonoides.....	63
Cumarinas.....	64
Antraquinonas.....	64
Taninos.	65
Aceites esenciales.	66
Pruebas de Identificación de Metabolitos Secundarios	66
Prueba de Dragendorff.....	66
Prueba de Shinoda	66
Prueba de KOH.....	67
Prueba de Borntrager-Kraus	67
Prueba de Taninos.....	67
Identificación de Terpenos por medio de Cromatografía de capa fina.....	68
Prueba de Espuma.....	68
Prueba de Benedict: Identificación de azúcares reductores.....	68
Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos.....	68
Pruebas de Dilución de Caldo.....	69

	11
Método de Gradiente Antimicrobiano	69
Antibiograma	71
Cromatografía para la Detección de Componentes en una Muestra.....	72
Cromatografía de Capa Fina.....	72
Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas	73
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	75
Enfoque de la investigación.....	75
Diseño de la investigación	75
VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN	76
Instrumentos y Técnicas	77
Fraccionamiento de pulpa de <i>Cocos nucifera</i> (coco).....	77
Materiales y Equipos.	77
Reactivos.....	78
<i>Método de extracción para el fraccionamiento de pulpa de Cocos nucifera</i> <i>(coco)</i>	79
Extracción del aceite de <i>Cocos nucifera</i> (coco)	81
Materiales y Equipos	81
Reactivo.	82
<i>Método de extracción para obtener aceite de Cocos nucifera (coco)</i>	82
Tamizaje fitoquímico de la pulpa de <i>Cocos nucifera</i> (coco).....	84
Materiales y Equipo	84
Reactivos.....	85
<i>Método para la extracción de la fase etérea.</i>	86
<i>Extracto acuoso.</i>	87
Pruebas para el tamizaje fitoquímico.....	88

Prueba de Dragendorff (identificación de alcaloides)	88
Prueba de identificación de flavonoides (Shinoda)	88
Prueba de identificación de cumarinas (KOH)	89
Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triperpenos y esteroides)	89
Prueba de Borntrager-Kraus (Identificación de antraquinonas)	90
Prueba de Taninos (Identificación de Taninos)	90
Prueba de Cromatografía de capa fina TLC (Determinación de Terpenos)	90
Prueba de Lugol (Determinación de Almidón)	91
Prueba de Espuma (Determinación de saponinas).....	91
Prueba de Benedict (Determinación de azúcares reductores).....	92
Determinación de composición del aceite de <i>Cocos nucifera</i> por cromatografía de gases acoplado a masas.....	93
Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y aceite de <i>Cocos nucifera</i> (coco)	93
Materiales y Equipo	93
Reactivos.....	94
<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la pulpa y aceite de Cocos nucifera en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas.</i>	95
<i>Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la pulpa y aceite de Cocos nucifera en un laboratorio microbiológico.</i>	97
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	99
Fraccionamiento de la pulpa y extracción del aceite de <i>Cocos nucifera</i>	99
Tamizaje fitoquímico para la identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en la pulpa de <i>Cocos nucifera</i>	104
Determinación de composición del aceite de <i>Cocos nucifera</i> por cromatografía de gases acoplado a masas.....	113

Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de la pulpa y aceite de <i>Cocos nucifera</i>	115
Método de discos	117
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	120
Conclusiones.....	120
Recomendaciones	121
REFERENCIAS	122
ANEXOS	131

Índice de Tablas

Tabla N° 1. Morfología y Taxonomía de la Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Tabla N° 2. Factores de virulencia del <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Tabla N° 3. Clasificación Taxonómica de la planta de coco	58
Tabla N° 4. Composición química del <i>Cocos nucifera</i>	59
Tabla N° 5. Operacionalización de variables	76
Tabla N° 6. Pruebas que se le deben realizar a cada extracto para el tamizaje fitoquímico.....	87
Tabla N° 7. Determinación del porcentaje de extracción obtenido luego del proceso de maceración de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> en hexano, utilizando una balanza analítica para medir las masas	100
Tabla N° 8. Obtención de la masa del extracto acuoso de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i>	102
Tabla N° 9. Masas obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso obtenido de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> por medio de los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo.....	103
Tabla N° 10. Determinación de la presencia de metabolitos secundarios mediante un tamizaje fitoquímico de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i>	106
Tabla N° 11. Metabolitos secundarios presentes detectados por el tamizaje fitoquímico en la pulpa del <i>Cocos nucifera</i>.....	107
Tabla N° 12. Componentes Presentes en el extracto de Aceite de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i>	114
Tabla N° 13. Resultados de las pruebas microbiológicas de los extractos y aceite de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> por ambos métodos.....	119

Índice de Figuras

Figura N° 1. Estructura de una bacteria	31
Figura N° 2. Tipos de clasificación de las bacterias de acuerdo con su morfología	32
Figura N° 3. Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura N° 4. Diana de los antibióticos usados en el tratamiento del <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Figura N° 5. Mecanismos de Resistencia Bacteriana	41
Figura N° 6. Lesión de Impétigo.....	43
Figura N° 7. Ejemplo de Celulitis.....	44
Figura N° 8. Colonias pigmentadas y hemolíticas de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar sangre	46
Figura N° 9. a) Prueba Coagulasa positiva y b) blanco.....	47
Figura N° 10. Colonias de <i>S. aureus</i> en agar Baird-Parker	50
Figura N° 11. Colonia de <i>S. aureus</i> en agar Manitol-Sal	51
Figura N° 12. Colonias <i>S. aureus</i> en Agar Sangre	52
Figura N° 13. Agar Müller-Hinton.....	53
Figura N° 14. Planta de <i>Coco nucifera</i> (Coco)	56
Figura N° 15. Fruto del coco	57
Figura N° 16. Estructura Molecular del Ácido Láurico	61
Figura N° 17. Estructura molecular de un alcaloide (morfina), terpeno (limoneno) y flavonoide (flavona).....	64
Figura N° 18. Estructura molecular de una cumarina (dicumarol), antraquinona (antrona) y tanino	65
Figura N° 19. Pruebas de Dilución de Caldo.....	70
Figura N° 20. Prueba Gradiente Antimicrobiano	70
Figura N° 21. Prueba de Antibiograma	71
Figura N° 22. Cromatografía de Capa Fina.....	73
Figura N° 23. Equipo de Cromatografía de gases acoplado a masas.....	74

Figura N° 24. Extracto acuoso de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> obtenido por maceración con etanol al 70%, y posterior filtración al vacío con Büchner y Kitasato y concentración en el rotavapor	79
Figura N° 25. Proceso de extracción líquido-líquido utilizando embudo separador (a) y Proceso de concentración de extractos utilizando rotavapor (b)	80
Figura N° 26. Esquema para la metodología empleada en el fraccionamiento de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> (coco)	81
Figura N° 27. Equipo de filtración al vacío (Büchner Kitasato y bomba al vacío) junto al extracto de <i>Cocos nucifera</i> de hexano	83
Figura N° 28. Metodología empleada en la extracción de aceite de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i>	84
Figura N° 29. Metodología empleada en el tamizaje fitoquímico para cada uno de los extractos obtenidos del <i>Cocos nucifera</i> (coco)	92
Figura N° 30. Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	94
Figura N° 31. Técnica usada en las Instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas	96
Figura N° 32. Cámara de flujo laminar	98
Figura N° 33. Proceso de adición de los extractos de <i>Cocos nucifera</i> a la placa inoculada con <i>S. aureus</i>	98
Figura N° 34. Ralladura de la pulpa de <i>Cocos nucifera</i>	99
Figura N° 35. Muestra del aceite de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> (coco)	101
Figura N° 36. Extractos obtenidos del fraccionamiento de la pulpa <i>Cocos nucifera</i> (coco)	104
Figura N° 37. Extractos obtenidos de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i>, para determinar la presencia de metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico	105
Figura N° 38. Resultado positivo de la prueba de alcaloides del extracto etéreo	108
Figura N° 39. Determinación de la identificación de cumarinas para el extracto etéreo (a) y extracto AQ2E (b)	109

Figura N° 40. Prueba para identificación de triterpenos y esteroides en el extracto etéreo (a)	110
Figura N° 41. Determinación de la presencia de taninos en el extracto AQ1 .	111
Figura N° 42. Identificación de Terpenos en el extracto etéreo por medio de cromatografía de capa fina y revelado reactivo de Vainillina.....	112
Figura N° 43. Identificación de azúcares reductores en el extracto AQ1	113
Figura N° 44. Resultado de la Prueba de antimicrobiana sobre S. aureus de los extractos y aceite de <i>Cocos nucifera</i> en la UIA	116
Figura N° 45. Resultado de la Prueba de antimicrobiana sobre S. aureus de los extractos y aceite de <i>Cocos nucifera</i> por el método de discos	117
Figura N° 46. Resultado de la prueba antimicrobiana sobre S. aureus de los extractos y aceite de <i>Cocos nucifera</i> por el método de pocillo.....	118

RESUMEN

Este trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) sobre *Staphylococcus aureus*.

Para desarrollar la investigación se realizaron extracciones por medio de maceración de la pulpa del *Coco nucifera* rallada, usando los disolventes de etanol y hexano.

Posteriormente, se obtienen los extractos acuosos y el de aceite; el extracto acuoso se divide a la mitad, con el fin de realizarle un fraccionamiento con los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo, para usarlos en las pruebas microbiológicas, y la otra mitad se utiliza para hacerle el tamizaje fitoquímico.

Al aceite del *Cocos nucifera* se le realiza una prueba de cromatografía de gases acoplado a masas, para conocer los componentes.

En cuanto a la caracterización fitoquímica de la pulpa del *Coco nucifera*, se observó la presencia de Alcaloides, Cumarinas, Terpenos, Triterpenos y Esteroles, Taninos y Azúcares Reductores.

En el análisis de la cromatografía de gases acoplado a masas dio como resultado la presencia del ácido láurico, mirístico y palmítico en mayor cantidad.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de la pulpa del *Cocos nucifera* a la concentración del 100% sobre el *Staphylococcus aureus*, mediante la técnica de discos y pocillos, utilizando el agar Müller Hinton. Los resultados de estas pruebas indicaron que la bacteria no presenta sensibilidad para ninguno de los extractos utilizados, comprobándose, así, la hipótesis nula de esta investigación.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

Desde la Antigüedad, el ser humano ha usado la medicina natural como base para el tratamiento de ciertas dolencias, brindándole una alternativa de salud con una amplia cobertura, y ayudando al desarrollo de nuevas fuentes de fármacos. Al pasar los años, la información sobre el uso de plantas medicinales fue registrándose en herbolarios, lo que permitió tener un mejor registro de las plantas que poseen propiedades farmacológicas para el ser humano. (Rivas, Oranday y Verde, 2016. p.7).

Mientras, en la actualidad, con el avance alcanzado por la síntesis química, la medicina herbaria pone a disposición de la población un arsenal de sustancias biológicamente activas, lo que ha incrementado el consumo mundial de medicinas herbarias, sin tener estudios científicos que confirmen su actividad farmacológica, o si su consumo puede llevar a problemas de toxicidad; por esta razón es que se vuelve esencial identificar cuáles pueden ser los riesgos asociados a su uso en el ser humano. (Báez, Carrizo, Díaz, Gruszycki, Gruszycki, Lilián, Pérez y Rosalía, 2017. pp.2-3).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Organización de las Naciones Unidas (ONU), estiman que más del 80% de personas, en el mundo, han visto la necesidad de recurrir a las plantas para satisfacer sus necesidades de atención primaria en salud. La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales, y productos naturales, revela un potencial avance en el campo de la antibioticoterapia. Sin embargo, la OMS insiste en que el uso de las plantas medicinales debe estar sustentada por bases científicas de seguridad, efectividad y calidad requeridas para ser utilizadas en humanos. (Beltrán, Cantillo y Vivas, 2013. p.801).

Por tal motivo es que en la actualidad los científicos están más interesados en realizar estudios que avalen el uso de plantas medicinales, como una alternativa de tratamiento para algunas enfermedades, y gracias a esto es que se ha abierto una línea de investigación en fitofármacos, con el fin de buscar nuevos medicamentos para el tratamiento de patologías infecciosas causadas por bacterias. que se han vuelto resistentes a los antibióticos actuales, y

se ha convertido en un problema a nivel mundial. que constituye un reto aún mayor para el futuro. Muchas investigaciones se han realizado desde hace más de 30 años y continúan aún en nuestros días, sobre todo para conocer los mecanismos y causas que hacen posible esta resistencia, para así poder lograr la creación de nuevos productos farmacéuticos de origen natural para hacerle frente. (Serra, 2017. pp.403-404).

Según Martínez, Montes de Oca y Alemañy (2017. p.211) la resistencia bacteriana se ha incrementado con el paso del tiempo; tal es el caso de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) bacteria gram positiva considerada como microorganismo multiresistente. Esta bacteria afecta en especial a niños y jóvenes, y al ser una de las más problemáticas a nivel mundial, es importante buscar nuevas alternativas para combatirla.

En Costa Rica, alrededor de 5000 bacterias infectan a la población en un año. De las 20 bacterias más prevalentes se encuentran el *Staphylococcus aureus*, el cual se posiciona como el segundo microorganismo más patógeno, con 630 casos de población infectada a nivel de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS), y cada vez son más las cepas que crean resistencia a los tratamientos estándares de la CCSS, conduciendo a medidas más severas. (Ávalos, 2015. párr.3).

Otro de los problemas que posee esta bacteria y que la vuelve más peligrosa para el ser humano, es que cerca del 20% de la población es portadora, inclusive permanente, de este patógeno en las fosas nasales, y un 30% lo es de manera intermitente. Además, dependiendo del sistema inmune de la persona, puede llegar a colonizar otras partes del cuerpo, como la piel y el tracto gastrointestinal e, incluso, podría alcanzar tejidos más profundos. (Pahissa, 2009. pp.15-17).

S. aureus ya presenta resistencia a antibióticos como clindamicina, eritromicina y cloxacilina, que son medicamentos actualmente usados como tratamiento de primera línea en infecciones por esta bacteria, y el problema aumenta, porque inevitablemente encontrará formas de resistencia a los antibióticos que se puedan desarrollar; por eso es necesario implementar acciones más agresivas para disminuir el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia, y así poder evitar la diseminación de la resistencia que ya existe. (Lozano, 2011. p.501).

Por esto es que se ha visto, en las plantas, una opción para crear nuevas sustancias que sean capaces de hacerle frente a esta crisis mundial de la resistencia antimicrobiana. Actualmente, algunas plantas poseen características medicinales, debido a los principios activos que contienen localizados en diferentes partes de la planta, como las hojas, tallos, flores, frutos, semillas o raíces; tal como es el caso del *Cocos nucifera*, donde en diferentes estudios se indican las propiedades farmacológicas que posee como diurético, antioxidante y antimicrobianas.

Es así como, frente a la situación mencionada, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Tienen actividad antimicrobiana los extractos de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) sobre cepas de *Staphylococcus aureus*? Lo anterior puede resultar muy útil en la invención de nuevas alternativas para enfrentar la resistencia a antibióticos, problema muy importante a nivel mundial.

Hipótesis de Investigación

La pulpa del *Cocos nucifera* (coco) tiene actividad antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis Nula

No tiene, la pulpa de *Cocos nucifera* (coco), actividad antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) sobre *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos

Elaborar un fraccionamiento de los componentes presente en la pulpa del *Cocos nucifera* (coco), utilizando los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo.

Efectuar un tamizaje fitoquímico de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) con el fin de identificar los metabolitos secundarios presentes en la pulpa.

Comprobar la eficacia *in vitro* de los diferentes extractos obtenidos de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco), en diferentes concentraciones contra el *Staphylococcus aureus*, para determinar cuánta sensibilidad presenta al extracto.

Justificación

Según Calderón y Aguilar (2016), la resistencia que han adquirido las bacterias a los antibióticos es un problema que se ha complicado día tras día, más aun en los últimos años, pues, como cualquier especie viviente, las bacterias tienen la capacidad de desarrollar diferentes mecanismos de defensa ante cualquier tipo de amenaza que atente contra su vida, sobrevivencia y reproducción; por esta razón es uno de los grandes problemas de salud pública mundial, fenómeno que a través de los años ha venido involucrando más cepas, nuevas especies y nuevos mecanismos. (pp.757-758)

Otras razones que han contribuido al incremento de la resistencia bacteriana es el uso inadecuado de los antibióticos, debido a que los pacientes pueden comprarlos fácilmente sin prescripción médica, que incumplen los horarios de administración, un tiempo inapropiado de consumo, y que muchos profesionales de la salud los prescriben innecesariamente; por ejemplo, en etiología viral, en la mayoría de los casos o inclusive en cuadros alérgicos. (Fariña, 2016. p.6).

La OMS (2018) indica que la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose, en todo el planeta, nuevos mecanismos de resistencia, que ponen en peligro la capacidad del fármaco para tratar las enfermedades infecciosas comunes; el uso indebido y abusivo de estos medicamentos es otra consecuencia que ayuda a incrementar este problema. El mundo está

abocado a una era postantibiótico, en la que muchas infecciones comunes y lesiones menores volverán a ser potencialmente mortales. (párr.5).

Entre las bacterias resistentes, que más preocupan, se encuentra la bacteria del *Staphylococcus aureus*, que ha logrado adquirir mecanismos de defensa a un gran número antibióticos que antes funcionaban muy bien para eliminarla; este es el caso de la meticilina, un antibiótico considerado de elección para esta bacteria, responsable de numerosas infecciones, como las de herida quirúrgica e infecciones de piel y partes blandas. Sin embargo, este antibiótico no tiene actividad sobre el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. (Fariña, 2016. p.7).

Es por esto que, debido al aumento de la resistencia a los antibióticos, se ha incentivado el interés por la búsqueda de nuevos compuestos procedentes de otras fuentes, como pueden ser los metabolitos secundarios de plantas, que permitan brindar el mejor apoyo a los pacientes infectados, sin provocarles mayores daños a su salud. Cabe destacar, también, que se han enfocado estudios dentro del campo de la farmacología vegetal, evaluando ciertos fitoquímicos que evidencian acciones antimicrobianas contra bacterias multirresistentes. (Vázquez, 2016. p.11).

Según Jano.es (2016), algunos profesionales en la salud han determinado que para el 2050 se estima un total de 10 millones de muertes por año a causa de la resistencia bacteriana, un problema que crece día con día, por lo cual es importante que la investigación tome un rumbo a nivel natural para el desarrollo de nuevas moléculas capaces de producir un efecto antimicrobiano con alta potencia. (párr.1)

Por lo comentado anteriormente, es que esta investigación pretende demostrar que la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) puede tener actividad antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*. Existe evidencia de que, uno de los componentes de la pulpa del coco, es el ácido láurico y dentro de sus propiedades se encuentra la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas bacterias patógenas generalmente gram positivas, sin embargo, en algunos artículos científicos ha presentado actividad con ciertas bacterias gram negativas. (Nitbania et al., 2016. p.133).

Proyecciones

Se pretende evidenciar que la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) tiene propiedades antimicrobianas contra el *Staphylococcus aureus*, una de las bacterias que afecta a la población costarricense y que tiene alta resistencia a los antibióticos.

Se desea aportar evidencia científica para futuras investigaciones, en las que se pueda formular un medicamento a base de coco para combatir infecciones por *Staphylococcus aureus*.

Antecedentes

Antecedentes Históricos

El coco es una de las plantas más cultivadas en el mundo, distribuida principalmente en Asia, África y América Latina, la cual se caracteriza por ser una palmera de tronco largo y elástico con hojas en la copa; el fruto de la palma es el coco, con una pulpa blanca con alto porcentaje de grasa, la cual está cubierta por un tejido fibroso que la protege. En Costa Rica, la mayor producción de esta planta es en la Zona Atlántica; sin embargo, otras zonas de importante producción son la Zona Norte, el Pacífico Central y Sur. (Naranjo, 2014)

Según Soler y López (2014), la palma de pipa o coco proviene de la familia Arecaceae, y su nombre científico es *Cocos nucifera*. Esta planta puede encontrarse en la orilla de playas tropicales arenosas; crece muy bien en zonas de clima caliente y tiene propiedades medicinales como diurético por el agua de pipa; el casco quemado se emplea como sahumero en caso de dolor de muelas, además de purgante y antihelmíntico. (pp.93)

Antecedentes Internacionales

Dentro de los componentes más abundantes en la pulpa del coco están los ácidos grasos, donde Konno, Miura, Nonomura, Takamasa, Yamamoto y Yano (2019), describen

en su artículo “Análisis sistemático de la actividad bactericida selectiva de ácidos grasos contra el *Staphylococcus aureus* y *epidermis* con concentración inhibitoria mínima y mínima concentración bactericida”, la evaluación de la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos, divididos en 2 grupos: el primero consistía en el ácido mirístico, palmitoleico y oleico, y el segundo eran los ácidos caprílico, cáprico y láurico, que se probaron contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*. Las pruebas microbiológicas se realizaron midiendo la concentración mínima inhibitoria, por medio de placas de agar y discos impregnados de las mezclas. (pp.292-293).

Los resultados arrojaron que todos los ácidos grasos mostraron actividad antibacteriana; algunos para ambos *Staphylococcus* y otros solo para uno de los tipos; la segunda mezcla de ácidos, donde se encontraba el ácido láurico, mostró actividad selectiva para *Staphylococcus aureus*, por lo que los autores concluyen que estos ácidos grasos tienen el potencial de ser utilizados como un detergente en el cuidado de la piel, y en la medicina por su actividad bacteriana contra ambos *Staphylococcus*. (Konno et al., 2019. p.294).

Por otra parte, según Nitbania, Juminaa, Siswantaa y Solikhah (2016), en su artículo “Prueba de aislamiento y actividad antibacteriana del ácido láurico del aceite de coco crudo (*Cocos nucifera L*)”, realizaron una prueba de la actividad antibacteriana del ácido láurico aislado de la planta del coco contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*; sus resultados arrojaron que el ácido láurico es capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en una concentración del 5%. Sin embargo, indicaron como una recomendación que, si se usa una concentración más alta del ácido láurico, mayor podría ser el diámetro de la zona de inhibición. (pp.134-140).

En Brasil realizaron una “revisión fitoquímica y farmacológica del *Cocos nucifera*”, en la cual revisaron el perfil fitoquímico de la planta, resaltando las actividades farmacológicas y toxicológicas del *Cocos nucifera*, para orientar el futuro preclínico. Esta revisión sistemática consistió en búsquedas acerca de datos científicos y algunos estudios experimentales, que confirmaron las propiedades farmacológicas de la planta. (Lima et al., 2015. pp.954-958).

Dentro de las conclusiones, mencionan los importantes efectos farmacológicos que posee esta planta y su baja toxicidad; estos efectos farmacológicos van a depender según la parte de la planta o fruto utilizado. La actividad antioxidante predominó en los constituyentes del endocarpio y agua de coco; por su parte, la fibra y la pulpa mostraron actividades antibacterianas, antiparasitarias y antiinflamatorias; por último, el extracto etanólico de la raíz presentó actividad anticonvulsiva sobre el sistema nervioso central. (Lima et al., 2015, p.962).

Torres, A. (2017), en su tesis de grado que lleva por título “Efecto antimicrobiano del aceite de coco sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro”, utiliza el extracto de aceite de coco a las concentraciones del 50 y 100% sobre placas de agar ralladas con la bacteria, usando la técnica de medir la concentración mínima inhibitoria (CMI). Sus resultados son positivos para ambas concentraciones, en cuanto a la inhibición del aceite de coco sobre la bacteria *Streptococcus mutans*. La autora señala que la inhibición obtenida se debe a los ácidos grasos provenientes del aceite de coco, como el ácido láurico, del cual se ha comprobado que tiene actividades antiinflamatorias y antimicrobianas. (pp.15,33,43).

Por otra parte, Escalante (2015) realizó una “Determinación de la Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*”. El método usado para la extracción del aceite de coco fue destilación por arrastre de vapor; una vez obtenido, se prepararon a las concentraciones de 15%, 25%, 50%, 75% y 100%. Para las pruebas microbiológicas contra las bacterias, lo que se hizo fue medir la concentración mínima inhibitoria, dando como resultado que ambas bacterias presentaron sensibilidad frente a las cinco concentraciones empleadas del aceite esencial de *Cocos nucifera*. La conclusión de la investigación es afirmar que el aceite de coco tiene propiedades antibacterianas para ambas bacterias. (pp.10-11).

En el 2015, Akinpelu, Alayande, Aiyegoro, Akinpelu y Okoh realizaron un estudio sobre “los mecanismos probables de acción biocida del *Cocos nucifera* empleando extractos de la cáscara de la planta contra bacterias aisladas”. La metodología usada fue la elaboración de un extracto por medio de agua y etanol, para luego medir las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de bacterias gram positivas y negativas. (pp.2-7).

Dentro de los resultados obtenidos, se mostró que la capacidad del extracto de *Cocos nucifera* para inhibir bacterias gram positivas como *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* fue mayor, en comparación con el grupo de bacterias gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*); sin embargo, sí logró un halo de inhibición en estas, y concluyen que se podrían preparar diferentes formulaciones a base de la planta para ensayos clínicos, y tales formulaciones podrían ser más eficaces para el tratamiento de microorganismos infecciosos. (Akinpelu et al., 2015. p.8).

Shen, Chen, Zheng, Lei, Tang y Song (2017), realizaron una investigación sobre “la composición química, actividades antibacterianas y antioxidantes de los hidrosoles de diferentes partes de *Areca catechu L.* y *Cocos nucifera*”; lo primero que hicieron fue definir qué partes de la planta iban a usar; al final escogieron la flor, la pulpa y la raíz de ambas plantas; la extracción se llevó a cabo por medio de una destilación simple. (pp.111-112).

Una vez obtenido el extracto, lo convirtieron en un hidrosol, y lo probaron contra las bacterias *Escherichia coli O157: H7* y *Staphylococcus aureus*, obteniendo como resultado un halo de inhibición en el crecimiento para ambas bacterias, concluyendo que la sensibilidad presentada se puede atribuir a la presencia de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres y ácidos de ambas plantas. (Shen et al., 2017. pp.112, 118).

En el 2019, Andrade, en su tesis de grado, de la Universidad Central del Ecuador, determino la “Efectividad de inhibición de la fusión entre aceite de *Cocos nucifera* (coco) y aceite de manzanilla sobre *Porphyromona gingivalis*. Estudio in vitro”. Para la obtención del aceite de coco, utilizó la destilación simple y para el extracto de manzanilla usó la maceración; una vez listos ambos extractos, los fusionó para probar su actividad antibacteriana. El método microbiológico usado fue la medición de la concentración mínima inhibitoria, dando como resultado sensibilidad de la bacteria *Porphyromona gingivalis* frente al extracto combinado, concluyendo que para la fabricación de futuros fármacos contra la bacteria se pueden tomar en cuenta estas plantas. (p.12).

Antecedentes Nacionales

Costa Rica es un país que, a pesar de contar con excelentes servicios de atención en salud pública, no se escapa de tener problemas para combatir la resistencia bacteriana; por esta razón se ha despertado el interés por el desarrollo de diferentes investigaciones, buscando opciones a nivel de fitofármacos para el tratamiento de estas enfermedades. A continuación, se detallan algunas investigaciones que hacen referencia a lo mencionado:

En el 2017, Boza, en su tesis de grado para licenciatura en Farmacia de la Universidad Internacional de las Américas, realizó su investigación sobre la “Eficacia antifúngica in vitro de una crema elaborada con aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y Coco (*Cocos nucifera*) frente al Hongo *Cándida albicans* y Comparación de su Efectividad con Clotrimazol”. La metodología usada para obtener el aceite del clavo de olor fue destilación por arrastre de vapor, y para el aceite de coco fue destilación Soxhlet; una vez obtenidos ambos aceites se elaboró la crema. (pp.67-68).

Se probó la efectividad de la crema por medio de análisis microbiológicos, donde se perforó el agar para una mejor cobertura, y se colocó la crema a base de los aceites y el clotrimazol, dando como resultados halos de inhibición de 21mm de la crema contra el hongo *Cándida albicans*; por lo que el autor concluyó que ambos extractos contienen capacidades antifúngicas, pero que, al combinarlos, esa actividad se potencia. (Boza, 2017. pp.77, 100-101).

Por su parte, en la Universidad de Costa Rica, Castro y Valverde (2015), en su tesis para optar por la licenciatura en Odontología, investigaron “Sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de enjuagues bucodentales a partir de aguacate (*Persea americana*) y coco (*Cocos nucifera*)”. Para la obtención del aceite de aguacate se extrajo por medio de centrifugación, y el aceite de coco fue por medio de etanol; se filtraron ambos y se obtuvieron los aceites, los cuales se probaron contra la bacteria *Streptococcus mutans*. (pp.18-24).

Las pruebas microbiológicas se realizaron por medio de placas de agar, que fueron perforadas y se les agregaron 40µL de cada extracto; se incubaron por 48 horas, dando como resultado un halo de inhibición de 6mm; como conclusión, los autores indican que ambos

extractos tienen un efecto inhibitorio para la bacteria, sin embargo, recomiendan realizar las extracciones para ambos aceites con otros métodos, para tener mejores resultados. (Castro y Valverde, 2015. pp.29-30).

En la Universidad Latina, para el 2017, Solano estudió el “Análisis del efecto del aceite de coco ante el *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* (in vitro)”. Se probó el aceite de coco en concentraciones de 5 μ L, 10 μ L y 15 μ L; el método usado fue el de discos impregnados con el aceite, y colocados sobre las placas de agar, para luego medir el halo de inhibición del extracto frente a ambas bacterias. Los resultados fueron que las bacterias no presentaron sensibilidad frente a las concentraciones del aceite de coco; sin embargo, la autora plantea, en sus resultados, que Mercola (2015) demostró que este aceite causó una fuerte inhibición del crecimiento de la mayoría de las cepas de bacterias *Streptococcus* incluyendo *Streptococcus mutans*, por lo que recomienda usar el aceite de coco en concentraciones más altas. (pp.76-92).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Generalidades de las Bacterias

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares, que poseen la capacidad de adaptar su metabolismo a una gran variedad de lugares contenidos en tierra, agua, materia orgánica, plantas y seres vivos. Estos microorganismos poseen células que presentan una estructura similar a las eucariotas, puesto que tienen una membrana celular y ribosomas que contienen la información genética. (Cárdenas, Cruz, Gándara y Pérez, 2014. p.23).

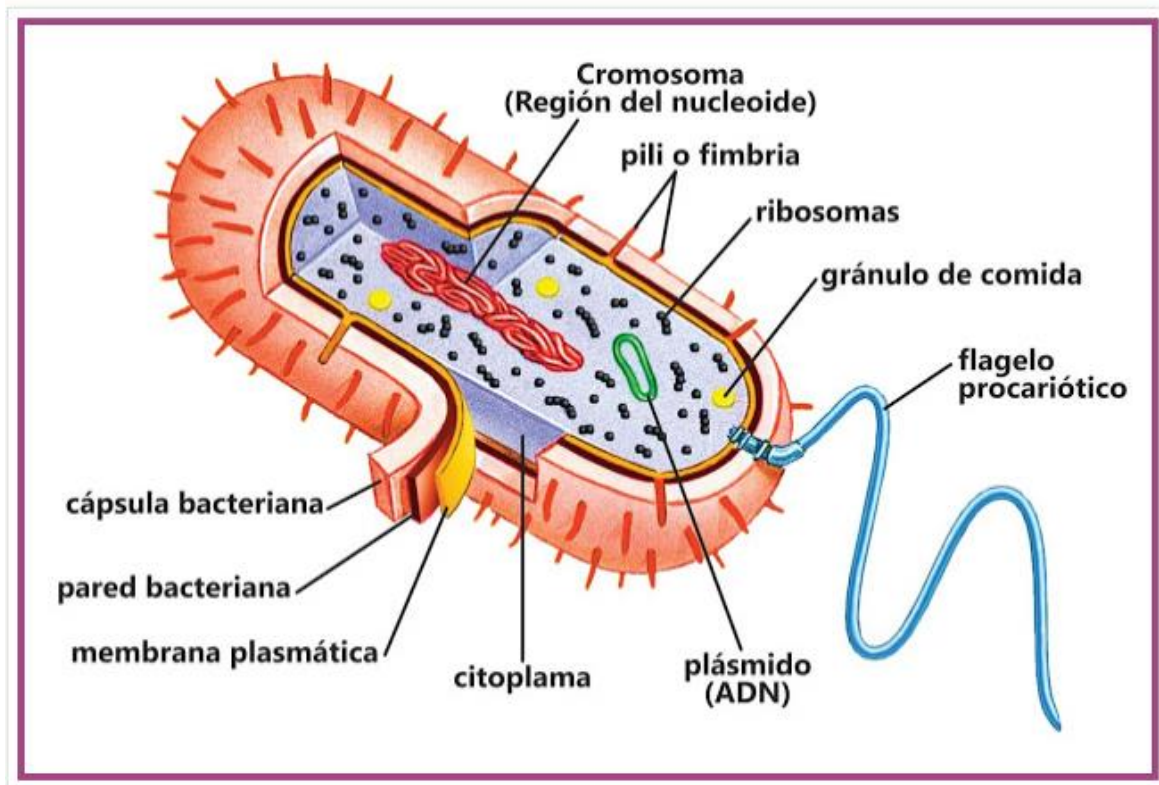
Su tamaño y forma son variables; algunas pueden llegar a medir entre 0,2 a 2µm de diámetro y entre 2 a 8µm de largo. Dentro de las estructuras vitales de las bacterias se encuentran la membrana citoplasmática, citoplasma y núcleo, y otras como la cápsula, flagelo, los pilis, las fimbrias, las esporas que se van a encontrar en algunas especies y en otras no. En la figura 1 se pueden observar, con más detallan todas las partes que conforman una bacteria. (Romero, 2007. p.630).

Las bacterias se empezaron a descubrir desde 1676, y se agruparon por la similitud morfológica en cuatro grupos: los cocos por su forma esférica, bacilos por ser como bastones, espirilos en forma de tirabuzón y vibrio por ser ligeramente curvados. En la figura N° 2 se observa la morfología de esta clasificación. Al pasar los años, se descubrió que las bacterias se teñían con colorantes, y así fue que la tinción de Gram formó dos grandes grupos, los Gram positivos, que se tiñen de color violeta, y los Gram negativos, que se tiñen de color rojo; además, existió otro tipo de tinción, la de Ziehl Neelsen, que las clasificaba como ácido-alcohol resistentes o no ácido-alcohol resistentes. (Romero, 2007. p.635).

La forma de reproducción de estos microorganismos puede darse de diferentes maneras; una de ellas es por duplicación o fisión binaria, la cual consiste por una separación que da resultado a dos células genéticamente idénticas, que es reproducción asexual; también por transformación, que consiste en un intercambio genético, producido cuando una bacteria es capaz de captar fragmentos de ADN, o por conjugación: en este proceso, una bacteria donadora transmite, a través de un puente o pili, un fragmento de ADN, a otra bacteria

receptora; se produce intercambio de material, simplemente de una célula da información a otra. (Lizano, 2015, p.12-15).

Figura N° 1. Estructura de una bacteria



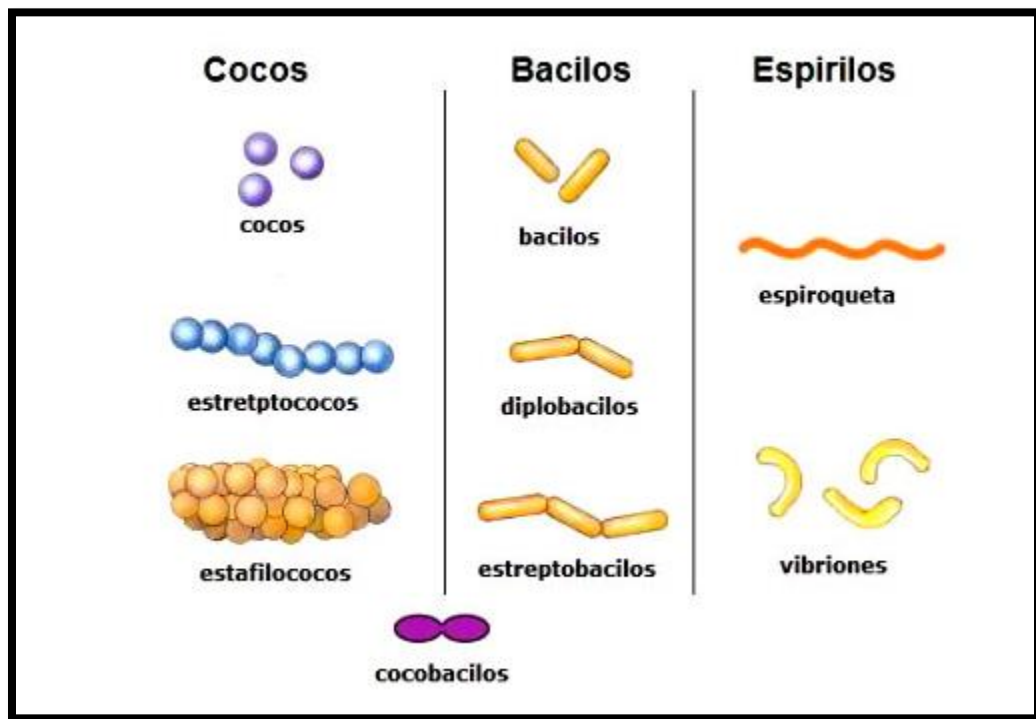
Fuente: Romero (2007)

La pared celular es otra parte importante de las bacterias; es una estructura compleja y semirrígida, que es la responsable de la configuración de la célula. Su función principal es evitar que ocurra la ruptura de la célula, cuando la presión hidrostática intracelular es mayor que la presión hidrostática extracelular; también contribuye en la virulencia de la misma, y permite clasificarlas en grampositivas o gramnegativas. (Tortora, Funke y Case, 2007. pp.28-30).

Las bacterias grampositivas poseen pared celular más gruesa y rígida que la de las Gram negativas, compuesta de varias capas de peptidoglucanos, ácidos teicoicos y

lipoteicoicos. El componente fundamental de estas es la mureína, un peptidoglicano que solo se encuentra en los procariontes. Por otra parte, las gramnegativas tienen la misma o muy parecida composición que la Gram positiva, que solamente que es más pequeña, pues poseen solamente una capa delgada de peptidoglucano, y la cantidad de mureína es mucho menor. (Lizano, 2015. pp.5-6).

Figura N° 2. Tipos de clasificación de las bacterias de acuerdo con su morfología



Fuente: Romero (2007)

Mollinedo y González (2014) clasifican a las bacterias, además de su forma y color antes mencionados, en bacterias según su óptimo de temperatura, entre ellas las termófilas, mesófilas y psicrófilas; también, según su pH en el cual se desarrollan: acidófilas, neutrófilas y basófilas y para fines prácticos, según la necesidad de oxígeno: bacterias aerobias estrictas, donde se tienen a la *Helicobacter pylori*, bacterias anaerobias estrictas, como *Clostridium*

ssp, y las bacterias anaerobias facultativas; aquí se tienen especies como *Escherichia coli*, *Salmonelas* y *Estafilococos*. (p.2013-2014).

Estafilococos

Los estafilococos inicialmente se llamaron cocos; estos fueron asociados por primera vez a enfermedades humanas, cuando fueron observados en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos. En 1882, un cirujano de nombre Sir Alexander Ogston llamó a estos cocos “*Staphylococcus*”, derivando el nombre de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokkus* (frutilla), debido a su morfología de racimo. (Seija, 2006. p.257).

Estos microorganismos tienen la propiedad de ser patógenos, provocando hemólisis, coagular el plasma, producir diversas enzimas y toxinas extracelulares; son los responsables de las intoxicaciones alimentarias, debido a una enterotoxina estafilocócica termoestable, y tienen la capacidad de desarrollar, con rapidez, resistencia a muchos antimicrobianos, y pueden plantear problemas terapéuticos difíciles. (Carroll, Morse, Mietzner y Miller, 2016. p.10).

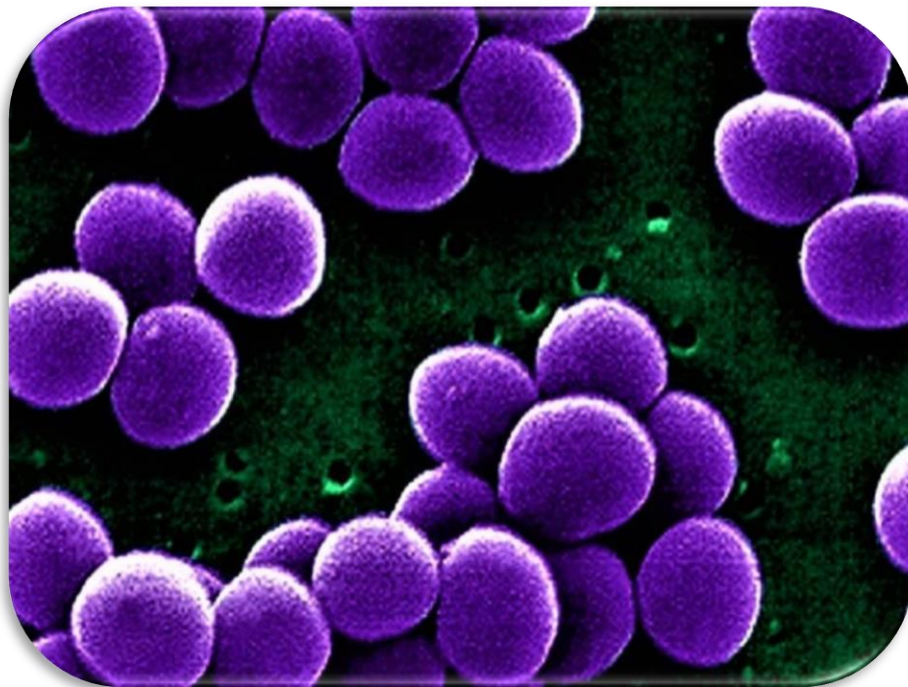
Los estafilococos son cocos gram positivos; estos poseen alrededor de 30 especies, de las cuales destacan *S. aureus*, *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*, siendo *S. aureus* coagulasa positivo, lo cual lo distingue de las otras especies; además, es uno de los patógenos más importantes, porque ocasiona enfermedades en el ser humano que pueden ocasionarle la muerte. (Seija, 2006. pp.257-258).

Staphylococcus aureus

Pertenece al grupo de los estafilococos; es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el ser humano y en los animales. Es la especie, de este grupo, considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan la vida. (Cervantes, García y Salazar, 2014. p.28).

En relación con su metabolismo, es anaerobio facultativo, coagulasa positiva, catalasa positivo y oxidasa negativa; este microorganismo se caracteriza por ser muy resistentes al calor y la desecación; puede sobrevivir a temperaturas desde los 46,7 °C hasta los 58 °C; además, le permite crecer en medios con elevada salinidad, y a un pH de 4 a 10, aunque se ha demostrado que su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C y a un pH de 5.20. (Pahissa, 2009. p.17).

Figura N° 3. Bacteria Staphylococcus aureus



Fuente: Batra (2017)

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) tiene una sorprendente capacidad adaptativa, tanto así que, por su secuenciación del genoma completo en numerosas cepas, ha aclarado la evolución de varias estructuras, toxinas y enzimas que este microorganismo ha desarrollado con el transcurso del tiempo, dándole la capacidad de adquirir muchos elementos genéticos móviles, que determinan tanto su patogenicidad como su resistencia antimicrobiana. (Carroll et al., 2016. p.15).

Según Pahissa (2009), en humanos esta bacteria es considerada flora bacteriana normal; principalmente se encuentra colonizando la mucosa nasal, la piel y la nasofaringe; muestra preferencia por la región anterior de las fosas nasales, en especial en adultos; como es parte de la flora, no se considera grave; sin embargo, en personas que poseen un grado de inmunosupresión pueden presentarse problemas como afecciones en la piel, abscesos, septicemias, gastroenteritis y endocarditis. (p.16-17).

En la siguiente tabla se pueden observar, de una forma más concentra, las características morfológicas y taxonómicas de esta bacteria:

Tabla N° 1. Morfología y Taxonomía de la Bacteria *Staphylococcus aureus*

Forma	Redonda (cocos), como racimos de uva
Tamaño	1 microgramo
Motilidad	No móvil
Flagelos	No tiene
Esporas	No posee
Cápsula	En algunas cepas
Tinción Gram	Morado (Gram +)
Clase	Cocci
Familia	Staphylococcaceae
Género	Staphylococcus

Fuente: Batra (2017)

Factores de virulencia.

Según Velázquez (2005), el éxito de *S. aureus* como un patógeno y su capacidad de causar una amplia gama de infecciones se debe, en gran medida, a sus factores de virulencia que participan en adhesión, adquisición de nutrientes y evasión de la respuesta inmune del

huésped. (p.382). En el siguiente cuadro se resumen los factores de virulencia más importante de esta bacteria.

Tabla N° 2. Factores de virulencia del *Staphylococcus aureus*

Estructura	Efecto Biológico
Cápsula	Es una adhesina: además, impide la quimiotaxis y la fagocitosis, inhibe la proliferación de células mononucleares.
Peptidoglicano	Proporciona estabilidad osmótica y estimula la producción de pirógenos endógenos y es quimioatrayente leucocitario.
Ácido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina.
Proteína A	Altera función ciliar, estimula respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con producción de radicales tóxicos de oxígeno.
Enzimas	Efecto Biológico
Coagulasa	Convierte fibrinógeno en fibrina.
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno.
Lipasa	Hidroliza lípidos.
Nucleasa	Hidroliza ADN.
Penicilinasas	Hidroliza la penicilina.

Fuente: Zendejas, Ávalos y Soto (2014)

Aspectos patogénicos.

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano en la piel y mucosas, específicamente lo que la convierte en una bacteria peligrosa, debido a que la colonización puede presentarse sobre heridas en la mucosa nasal, orofaringe, epidermis, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda, lo que la convierte en una de las bacterias que pueden desencadenar infecciones nosocomiales. (Camarena y Sánchez, 2010. p.2).

Este microorganismo posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, β -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de shock tóxico, acaba produciendo infección. (Camarena y Sánchez, 2010. p.3).

El *S. aureus* se introduce en el medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores, por medio de contaminación cruzada (manos, implementos médicos, equipo, entre otros). La transmisión a través del entorno inanimado (reservorio ambiental) debe ser mencionada especialmente en ciertas áreas, como en las Unidades de Cuidados Intensivos, por medio de vía aérea, en los pacientes intubados. Dentro de los factores asociados que favorecen la adquisición nosocomial de infección por esta bacteria destacan: 1) la manipulación diagnóstico-terapéutica (catéter intravascular, sondaje vesical, intubación orotraqueal y otros), 2) estancia en UCI, 3) enfermedad grave de base, 4) antibioterapia previa, 5) estancia nosocomial prolongada, 6) cirugía previa o herida quirúrgica, 7) úlceras isquémicas. (Camarena y Sánchez, 2010. p.3).

Otra de las razones más comunes de patogenia son las intoxicaciones alimentarias; estas se dan comúnmente por la ingesta de alimentos contaminados con las toxinas que el microorganismo produce; puede ser que un ingrediente que se utilice para preparar una comida estuviera expuesto previamente a la toxina, y reuniera las condiciones apropiadas para que se lograra desarrollar (tiempo y temperatura). Dentro de los alimentos que son más propensos a adquirir esas toxinas son los siguientes: leche, mantequilla, quesos, comida preparada lista para el consumo, salchichas, mayoría de carnes, jamón, vegetales. El principal

responsable de la contaminación de estos productos es el ser humano, por falta de una buena higiene y correcta manipulación de alimentos. (Batra, 2017. párr.5-6).

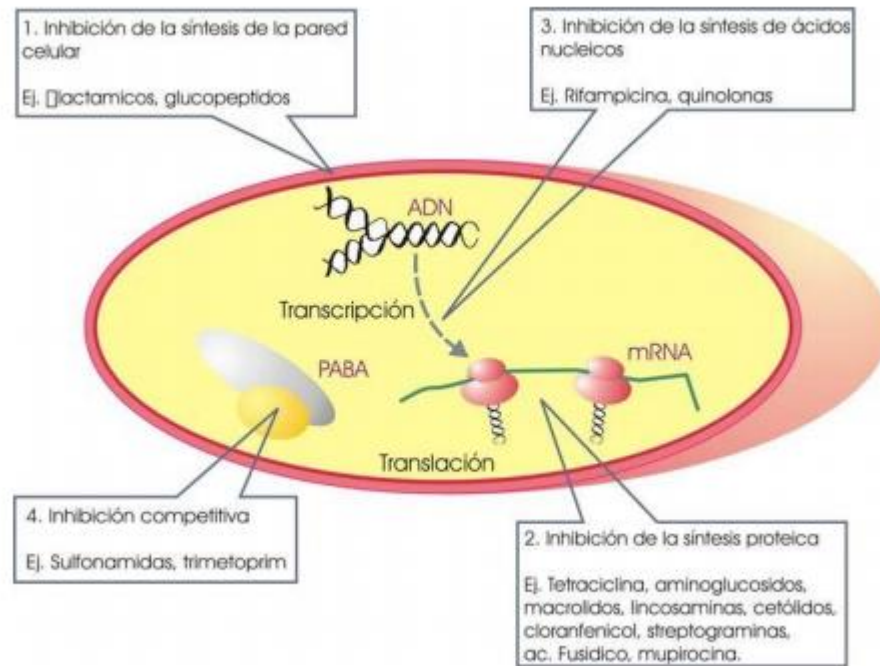
Evolución de la Resistencia Bacteriana del Staphylococcus aureus.

S. aureus fue el primer microorganismo en poner en manifestación la resistencia a los antibióticos, y de desarrollar diversos mecanismos de defensa a estos, tanto intrínsecos como adquiridos, para conseguir la resistencia que posee actualmente a los antimicrobianos existentes. En la década de 1940, el principal antimicrobiano usado fue la penicilina, pero no tardó mucho tiempo en desarrollar resistencia a este, por la producción de betalactamasas. (Lacueva, 2017. pp.3-4).

En los años 50 comenzó el uso de nuevos antibióticos frente a *S. aureus*, pero poco después, en 1957, muchas cepas ya presentaban resistencia múltiple a penicilinas, estreptomicina, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina. En 1959 se introdujo la meticilina, una penicilina semisintética resistente a la acción de las betalactamasas, permitiendo volver a tomar el control sobre las infecciones del *S. aureus*; este control no duró mucho, porque solo dos años después ya aparecieron nuevas cepas resistentes a la meticilina, presentando, además, resistencia intrínseca a todos los demás betalactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenemes. (Shanson, 1981. p.15).

A finales de la década de los 80, *S aureus* combina la resistencia a meticilina y, con esto, a todos los betalactámicos, incluyendo también a otros fármacos como el cloranfenicol, macrólidos lincosamidas, aminoglucósidos y fluoroquinolona, convirtiéndose en una de las bacterias más resistentes, en la actualidad, a los antibióticos que se tienen a disposición. (Lacueva, 2017. p.4).

Figura N° 4. Diana de los antibióticos usados en el tratamiento del *Staphylococcus aureus*



Fuente: Lacueva (2017)

Mecanismos de Resistencia a los Antibióticos

Según la OMS (2018), define la resistencia a los antibióticos como la capacidad que tienen las bacterias de impedir que estos actúen contra ellos. En consecuencia, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces, las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. Dentro de estos mecanismos se encuentran:

Producción de una enzima que inactiva al antibiótico

Este mecanismo conlleva la inactivación del antibiótico a través de una modificación o hidrólisis del mismo. El caso más importante es el de las betalactamasas, producidas por algunas bacterias como el *Staphylococcus aureus*, que hidroliza el anillo betalactámico. Sin

embargo, existen otros casos, como la inactivación del cloranfenicol, mediante acetilación gracias a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa. (Aspiroz, Benito, Gómez, Lozano, Torres y Zarazaga, 2011, pp.503-504).

Disminución de la penetración del antibiótico al lugar de acción

En este caso, la bacteria se hace resistente, al reducir la cantidad de antibiótico que penetra en el medio intracelular. Este fenómeno se da debido a una disminución de la permeabilidad (fosfomicina, ampicilina) o principalmente a la presencia de una bomba de expulsión activa (tetraciclina). (Aspiroz et al., 2011. p.504).

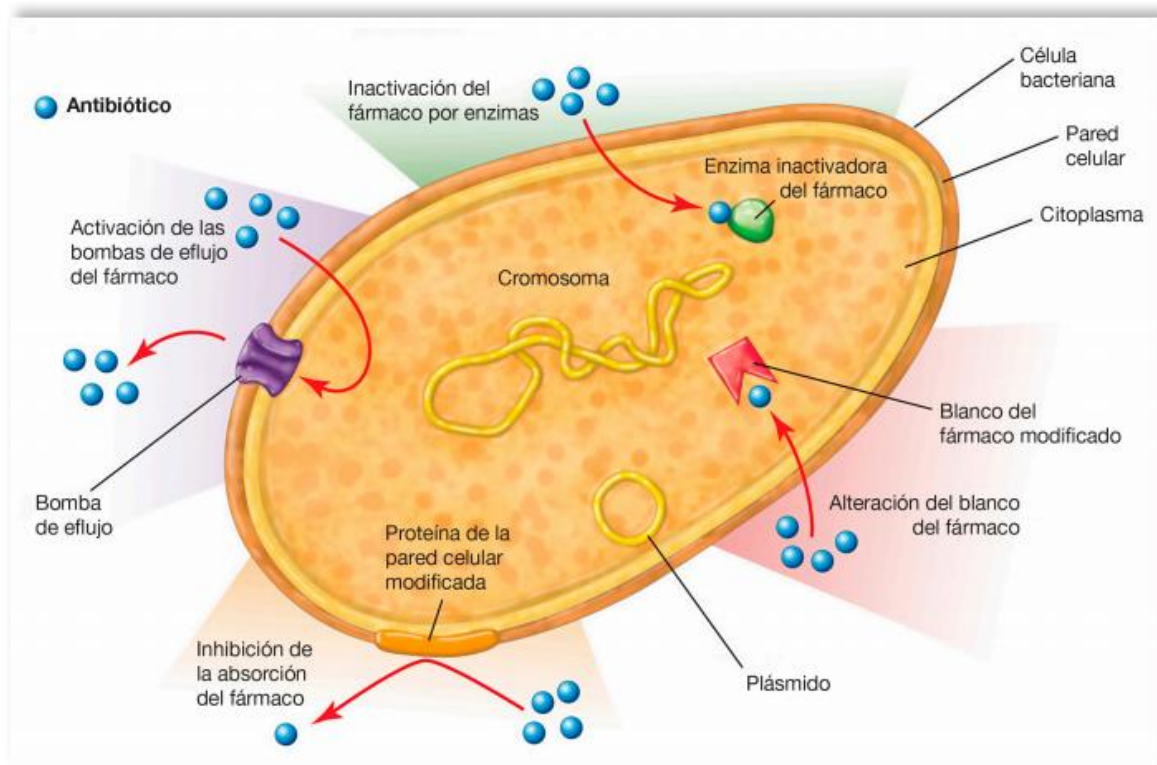
Modificación del lugar de acción del antibiótico

Son cambios estructurales en los lugares de acción, que ocasionan una menor afinidad por el antibiótico, lo que genera una disminución de su eficacia clínica; por ejemplo, modificaciones en las subunidades ribosómicas 30S y 50S generan resistencias a los aminoglucósidos y macrólidos, respectivamente. La modificación cromosómica de las PBP es el mecanismo presente en algunas cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM). (Aspiroz et al., 2011. p.504).

Producción de Bombas de Expulsión

Es un mecanismo que disminuye la concentración de antibióticos en el citoplasma de la bacteria, debido a una especie de bombas expulsoras del mismo; este es un mecanismo de transporte que requiere gasto de energía; es capaz de eliminar varios tipos o familias de antibióticos, por lo que también se ha denominado como el de las bombas de expulsión activa multidroga. (Aspiroz et al., 2011. p.504).

Figura N° 5. Mecanismos de Resistencia Bacteriana



Fuente: Chan (2012)

Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*

El *S. aureus* puede comportarse como un microorganismo comensal y como un agente patógeno. La mucosa nasal es el principal sitio de colonización en los seres humanos. Se ha demostrado que aproximadamente del 20 al 30% de la población general es portadora de esta bacteria. La colonización aumenta significativamente el riesgo de infecciones, ya que proporciona un reservorio, a partir del cual las bacterias se diseminan cuando las defensas del hospedero se ven comprometidas. (Castañón, 2012. pp.79-80).

Los abscesos locales ocurren cuando el microorganismo es inoculado en la piel desde el sitio de transporte. La bacteria puede difundirse a nivel local o tener acceso al torrente sanguíneo. Una vez en la sangre, *S. aureus* puede propagarse a sitios periféricos en órganos

distantes. Como resultado de esta diseminación, se pueden presentar diversas infecciones. Finalmente, incluso si el microorganismo no invade, es posible que se presenten síndromes específicos, provocados por el efecto de toxinas de acción local o sistémica. (Castañón, 2012, p.80).

Según Seija (2006), el *S. aureus* es capaz de producir diferentes tipos de infecciones; pueden darse en forma directa, por invasión o posterior destrucción tisular local, por medio de toxinas o luego de haberse diseminado por vía sanguínea, Dentro de las infecciones más importantes de esta bacteria están:

Síndrome de piel escaldada

Esta infección se debe principalmente a la producción de la toxina exfoliativa en un foco, que luego pasa al torrente sanguíneo, pudiendo diseminarse hasta regiones alejadas del foco, donde no es posible aislar ningún germen. Esta toxina produce la formación de ampollas y la subsiguiente descamación de láminas epidérmicas, que puede estar localizada en una región o estar diseminada en el cuerpo. Se presenta con mayor frecuencia en recién nacidos o niños pequeños. (p.263).

Síndrome del shock tóxico

Este es un cuadro grave que, está asociado a la utilización de tampones vaginales. El microorganismo prolifera en el tampón contaminado (generalmente porque se deja por mucho tiempo sin ser cambiado) y produce la toxina del shock tóxico. Dentro de los síntomas que lo caracterizan se encuentra exantema cutáneo en manos y pies, fiebre, hipotensión. grados variables de vómitos, diarrea, falla renal, cefalea y conjuntivitis. Evoluciona al shock grave en 48 horas. También se asocia a heridas traumáticas o quirúrgicas. (pp.264-265).

Impétigo

Es una erupción cutánea contagiosa muy dolorosa; inicialmente aparecen zonas rojas y edematosas que pueden formar vesículas; las lesiones forman una costra amarillo-dorada. (Marks y Motley, 2012. p.45).

Figura N° 6. Lesión de Impétigo



Fuente: Alcolea (2018)

Celulitis

Es una infección de las capas profundas de la piel difusa, que causa enrojecimiento de la piel e hinchazón en su superficie. Es muy frecuente, sobre todo en las extremidades, y a menudo se presenta en las piernas afectadas con una ulceración venosa. Dentro de las manifestaciones están la formación de úlceras o zonas de supuración de secreciones. (Marks y Motley, 2012. p.46).

Figura N° 7. Ejemplo de Celulitis



Fuente: Pinheiro (2018)

Forúnculos

El tipo más frecuente de infección por *S. aureus*, es una acumulación de pus, que se forma en un folículo piloso o una glándula sebácea. La piel que se encuentra por encima de la zona infectada suele enrojecerse e hincharse; aparecen, con mayor frecuencia, debajo de los brazos o alrededor de la ingle o de los glúteos. (Marks y Motley, 2012. p.46).

Intoxicaciones alimentarias

Estas intoxicaciones se producen por consumir alimentos contaminados con toxinas de esta bacteria; se presentan por el contacto del alimento con los manipuladores que se encargan de producirlos; es decir, con las personas que están en contacto directo con los alimentos, por su mala manipulación. Dentro de los síntomas que presenta se encuentran: dolor abdominal, diarrea, sudoración fría, dolor de cabeza, además de náuseas y vómitos en

algunos casos. Generalmente los síntomas pasan en horas; sin embargo, dependiendo de si la persona está inmunosuprimida, estos síntomas se complican, y puede llegar a ser hospitalizada. (Zendejas, Ávalos y Soto, 2014, p.131).

Pruebas para el diagnóstico en infecciones por *Staphylococcus aureus*

Las siguientes pruebas son descritas por Jawetz, Melnick y Adelberg (2010), para el aislamiento o identificación del *Staphylococcus aureus* en infecciones:

Lo primero es tener la muestra, para después realizar la prueba de identificación; esta puede obtenerse por medio del pus en la lesión, la sangre, líquido traqueal o cefalorraquídeo. (p.189).

Frotis

Es una prueba de identificación de Estafilococos; no es posible distinguir qué tipo, debido a que lo observado comprende cocos grampositivos en racimos en frotis de pus o de esputo, al teñirse con la técnica de Gram. (p.189).

Cultivo

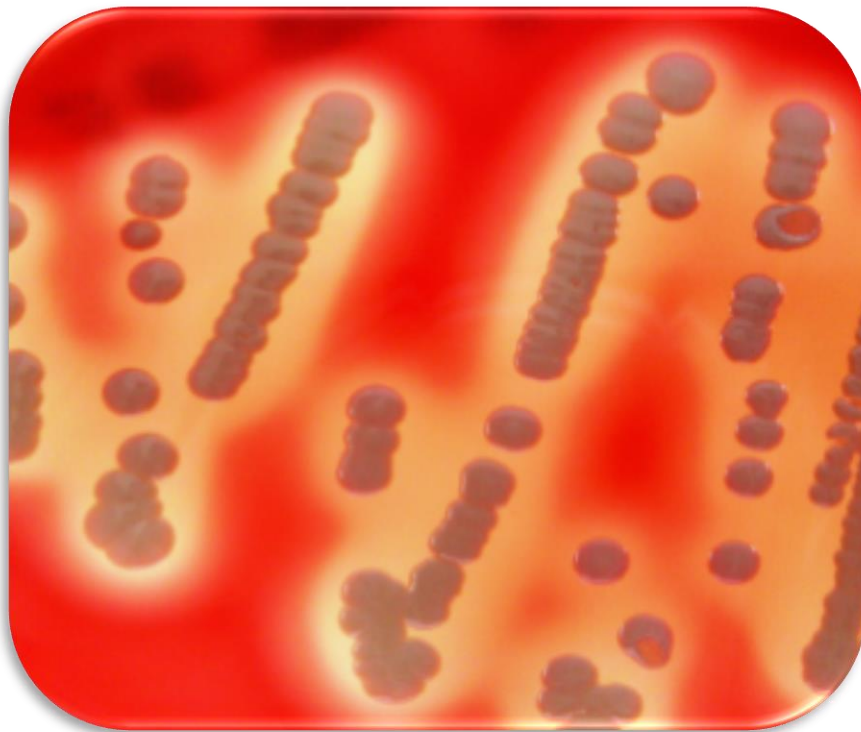
Al obtenerse la muestra, se siembra en agar sangre, se incuba a 18 horas a una temperatura de 37 °C, originando, así, colonias características en ese tiempo; la hemólisis y pigmentación aparecen, pero hasta días después, como se observa en la figura N° 8. Se puede hacer la prueba con agar manitol sal, ya que solo el *S. aureus* lo fermenta. (p. 189).

Prueba Catalasa

Detecta la presencia de cromó oxidasa en la muestra; lo primero que se debe hacer es colocar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjeto, y luego se aplica la

muestra a la solución; la prueba es positiva si hay burbujas por liberación de oxígeno. (p. 189).

Figura N° 8. Colonias pigmentadas y hemolíticas de *Staphylococcus aureus* en agar sangre

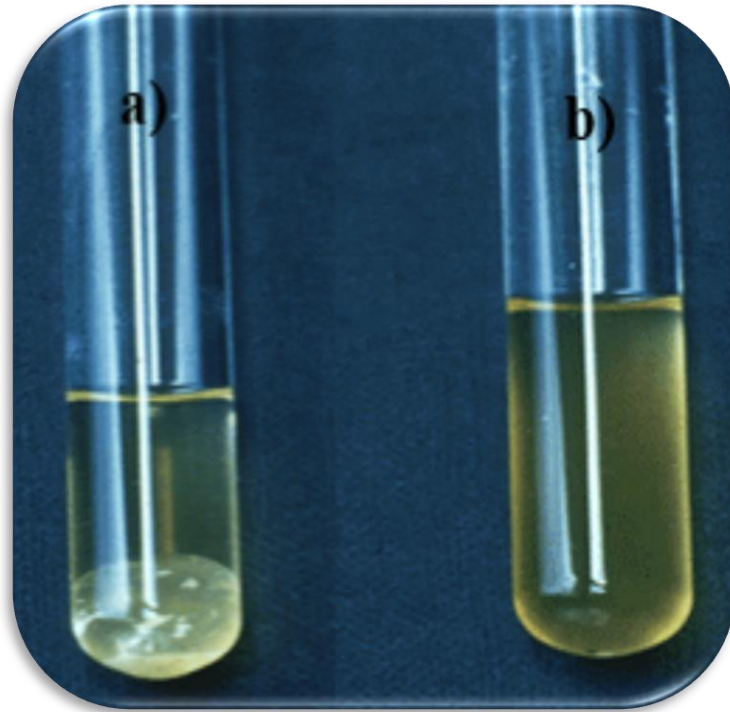


Fuente: Pahissa (2009)

Prueba Coagulasa

Se necesita plasma de humano o de conejo citratado y diluido 1:5, mezclado con un volumen igual de caldo de cultivo de colonias crecidas en agar; se incuba a 37 °C; se lleva un control, el cual debe ser de plasma mezclado con agua estéril; la prueba es positiva si se forman coágulos en un lapso de 1-4 horas. (p.189).

Figura N° 9. a) Prueba Coagulasa positiva y b) blanco



Fuente: Pahissa (2009)

Tratamientos Utilizados.

Debido al aumento de la resistencia de *Staphylococcus aureus* a meticilina (SARM), desde la década de los años 90, se generaron importantes líneas de estudio de nuevos antibióticos. Esta bacteria es, probablemente, la más versátil de los microorganismos patógenos, ya que puede producir enfermedad por toxinas, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Una de las razones que favorece que el *S. aureus* puede hacerse resistente a la mayoría de antibióticos empleados es la monoterapia. (Alarcón et al., 2013. p.1).

El *S. aureus* es una bacteria que vive en la piel, mucosas, fluidos corporales; por esta razón puede infectar fácilmente al ser humano. Dentro de las infecciones más recurrentes de esta bacteria son las cutáneas; por ejemplo, con el acné, las lipasas de *estafilococos* liberan

ácidos grasos, produciendo irritación, por lo que el uso de clindamicina es primera opción de uso por largo plazo. En cuanto a accesos y otras lesiones purulentas cerradas, son tratadas por medio de drenajes y antibiótico; lo que pasa en estas situaciones es que la bacteria rápidamente empieza a crear la resistencia, haciendo inefectivos estos tratamientos. (Jawetz et al., 2010. p.89).

Cuando se habla de tratamiento para combatir infecciones por esta bacteria, la primera línea eran los betalactámicos; actualmente, la mayoría de cepas de esta bacteria se han vuelto resistentes por la producción de betalactamasas. Sin embargo, si se describen de acuerdo con su actividad antimicrobiana frente a este patógeno, se tiene de mayor a menor efectividad de carbapenemes seguidos de las penicilinas isoxazólicas, cefalosporinas de primera y segunda generación (con excepción de cefonicid), las de tercera generación como cefotaxima y ceftriaxona, y en último lugar cefoxitina, ceftazidima, y ceftibuteno. (Jawetz et al., 2010. p.189).

Además, se comprueba que puede haber una sinergia si se administra, en conjunto, un betalactámico con daptomicina o fosfomicina con un aminoglucósido. De manera contraria, la asociación con rifampicina no se recomienda, porque puede generar antagonismo. La mejor opción por vía oral es cefalexina y cefadroxilo, que presentan una biodisponibilidad superior al 90%, cuando la gravedad se clasifica de leve a moderada. (Jawetz et al., 2010. p.189).

En cuanto a la clindamicina, tiene actividad bacteriostática frente a cerca del 85% de cepas de *S. aureus*; este antibiótico es usado en el tratamiento de infecciones de piel y partes blandas de gravedad leve o moderada, y en el tratamiento de la osteomielitis; se recomienda una dosis de 300-450 mg/8h VO y 600mg/6-8h IV. En términos generales, la eficacia de la clindamicina ha sido similar a la obtenida con penicilinas isoxazólicas, o con cefalosporinas de primera generación. (Jawetz et al., 2010. p.190).

Por su parte, la vancomicina es un antibiótico bactericida; pierde la actividad en condiciones anaerobias; es uno de los posibles tratamientos de la infección cuando el *S. aureus* es resistente a la meticilina o en pacientes que son alérgico a los betalactámicos; la dosis es de 15-20mg/kg/8-12h IV; no se recomienda el uso de este tratamiento en infecciones con elevada carga bacteriana. (Jawetz et al., 2010. p.190).

En el caso de las tetraciclinas, estas tienen actividad bacteriostática; la eficacia es tiempo-dependiente. La doxiciclina y minociclina, administradas por vía oral, tienen una biodisponibilidad cercana al 95%. La dosis inicial de carga de 200 mg, seguida de 100 mg cada 12 horas por vía oral o intravenosa, son usadas para infecciones en piel y partes blandas de gravedad leve o moderada. (Jawetz et al., 2010. p.190).

Según Jawetz et al. (2010), en el caso de una bacteriemia, se puede usar el medicamento linezolid, un antibiótico que tiene actividad bacteriostática aun en condiciones anaerobias frente a *S. aureus*; es tan sensible como resistente a la meticilina; se ha observado sinergia con carbapenem, fosfomicina y daptomicina. Rifampicina puede disminuir la concentración sérica de linezolid, por lo cual no es recomendable la terapia de estos dos antibióticos juntos.

Análisis microbiológicos para *Staphylococcus aureus*

El cultivo de un microorganismo se basa en el conocimiento de sus necesidades nutritivas y físicas, por lo cual se deben preparar o seleccionar medios adecuados a las necesidades de crecimiento de una bacteria; en este caso para la identificación de *S. aureus*, que necesitan no solo algunas pruebas bioquímicas, sino también medios de cultivos especiales que permitan su fácil determinación. (Zendejas et al., 2014, p.135).

Según Zendejas et al. (2014), esta identificación se basa en las enzimas y las toxinas que produce el microorganismo. Al aprovechar estas características, se han diseñado medios para aislar esta bacteria, como es el caso del agar nutritivo, donde el crecimiento se hace sobre la superficie, por lo que se distinguen mejor las colonias pequeñas. Dentro de los agares más usados para esta bacteria se encuentran:

Agar Baird-Parker

Es un medio muy selectivo, y se usa mucho para el recuento de *Staphylococcus aureus*; se compone de piruvato sódico, el cual ayuda a recuperar las bacterias lesionadas si

se encuentra, en la muestra la presencia de telurito, cloruro de litio y glicina, que apartan el poder selectivo que tiene. La característica positiva que indica la presencia de esta bacteria es un aspecto negro, debido a la reducción del telurito; sin embargo, las colonias deben confirmarse mediante un examen de frotis teñido con coloración de Gram. (Zendejas et al, 2014, p.135).

Figura N° 10. Colonias de *S. aureus* en agar Baird-Parker



Fuente: Casado, Torrico y Medina (2012)

Agar Manitol-Sal

Es muy usado para el aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus*. Este agar está compuesto de cloruro sódico a una concentración del 7.5%, el cual es el agente activo del medio e inhibe, parcial o completamente, a los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos; además, por tener como único azúcar el manitol, este solo es fermentado por el mencionado tipo de bacterias. Los estafilococos coagulasa positiva, como esta bacteria,

producen unas colonias de color amarillo y un medio circundante de color amarillo, mientras que los estafilococos negativos a la coagulasa producen colonias de color rojo y no provocan cambios en el color del indicador rojo fenol. (Zendejas et al., 2014, p.135).

Figura N° 11. Colonia de *S. aureus* en agar Manitol-Sal



Fuente: Casado, Torrico y Medina (2012)

Agar Sangre

Es un medio enriquecido en nutrientes, por lo que permite el crecimiento de un número amplio de bacterias. Para la preparación se puede usar el agar nutritivo enriquecido con cloruro sódico o el tripticasa de soja; la sangre que se le adiciona está diluida al 5% y es de carnero; sin embargo, en ocasiones se puede usar sangre de caballo o de conejo, y con esta composición se facilita comprobar si la bacteria es capaz de realizar hemólisis. (Núñez, 2007. p.23).

Figura N° 12. Colonias *S. aureus* en Agar Sangre



Fuente: Casado, Torrico y Medina (2012)

Agar Müller Hinton

Es un medio no selectivo ni diferencial, lo que significa que cualquier microorganismo cultivado crecerán en su superficie; es rico en nutrientes, por lo cual es empleado en las pruebas de sensibilidad y antibiogramas, debido a su alta reproducibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibitoras, el crecimiento satisfactorio que presentan los patógenos, y permite una mejor difusión de los antibióticos, cumpliendo con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud, y está especificado en la FDA. (Casado, Torrico y Medina, 2012. p.24).

Figura N° 13. Agar Müller-Hinton



Fuente: Casado, Torrico y Medina (2012)

Fitofármacos

Según Guzmán y Rivera (2013), la Organización Mundial de la Salud describe que un fitofármaco es un producto obtenido por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas de origen vegetal, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa, o para fines de diagnóstico. Se caracteriza por el conocimiento de su eficacia y de los riesgos de su uso, así como para la reproducibilidad y la constancia de su calidad. (párr.4).

La fitoterapia se ha utilizado desde hace varios años, basándose solo en las propiedades de las plantas, probablemente por la relación directa que el ser humano tenía con la naturaleza, en particular con las plantas, y a través de la observación del comportamiento

de los animales con respecto a ellas. En la actualidad, la investigación sobre esto va en aumento, debido a que no existe duda sobre el uso y la importancia que tienen las plantas, por lo que se puede decir que constituyen un arsenal de sustancias biológicamente activas. (Cea, 2014. pp.3-4).

Siempre que se obtiene un fármaco donde el principio activo es de origen vegetal, este debe cumplir con exigencias de calidad para su comercialización; por esta razón es que algunas farmacopeas, como la alemana, italiana y francesa, aportan información, y dedican apartados para las monografías de drogas vegetales, aceites esenciales y extractos vegetales, con el fin de conocer la seguridad, eficacia y determinación de la posible toxicidad. (Cea, 2014. pp.4-5).

Generalmente estos extractos vegetales se obtienen por medio de un disolvente, según González (2004) los define como formas farmacéuticas líquidas constituidas por los principios activos solubles contenidos en una porción medicinal de tejidos vegetales o animales y separados del residuo de la extracción. (pp.2-3)

Métodos de extracción

Estos se pueden dividir de acuerdo al disolvente utilizado en: extracción con agua (infusión, destilación por arrastre con vapor o extracción) o con solventes orgánicos (como maceración, percolación o extracción Soxhlet). (González, 2004). p.3)

Maceración.

Según González (2004) Es una extracción que se efectúa a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente, hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa, preferiblemente vidrio; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente se tapa y se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se recupera el solvente en un rotavapor y se obtiene el extracto. Dentro de los disolventes más usados son: hexano, cloroformo, metanol y etanol. (pp.8-9)

Percolación.

También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más utilizados pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico, y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo, de igual manera se recupera el disolvente por medio de un rotavapor y se obtiene el extracto. (González, 2004,p.9)

Extracción Soxhlet.

La extracción sólido-líquido mediante la utilización del equipo Soxhlet es uno de los más empleados, según Núñez (2008). Este método se fundamenta en colocar un disolvente afín requerido dentro del balón, la ebullición del solvente que se evapora hasta el condensador a reflujo y el condensado que cae sobre un cartucho que contiene la muestra vegetal en su interior. El proceso se repite las veces necesarias para el investigador o hasta que la muestra se agote y para purificar el extracto se requiere de la evaporación del solvente utilizado (pp.1-2).

Generalidades del coco

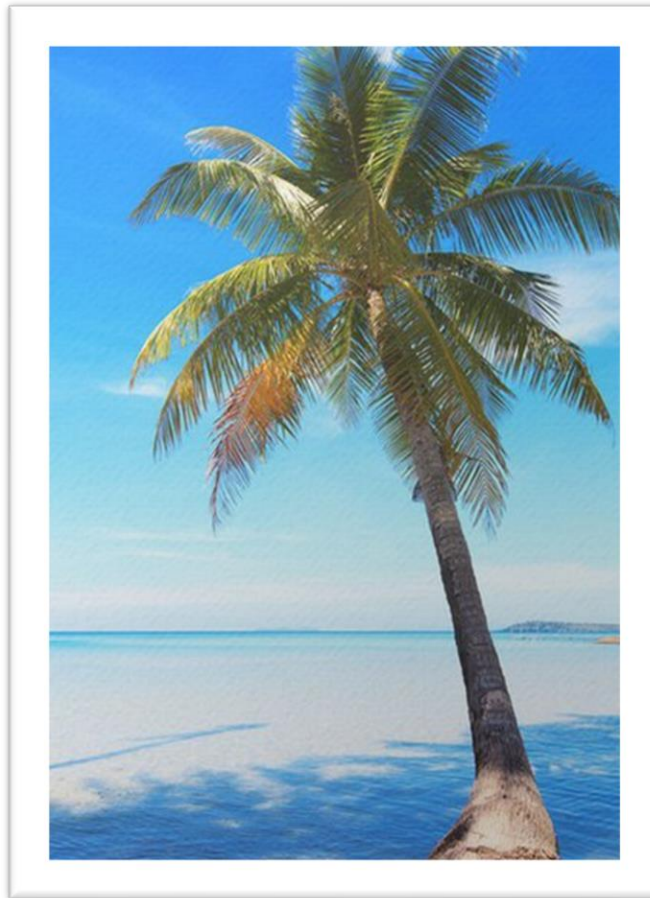
Esta planta es conocida como coco o palma de coco; crece a lo largo de las costas arenosas a través de los trópicos y en la mayoría de las regiones subtropicales. El coco es una palma alta y erecta, usualmente de 10 a 20 m de altura, posee un tronco delgado, ya sea curvo o recto, a menudo ensanchado e inclinado en la base. Se usa a través de su área de distribución como una fuente de alimento o bebida. (Parrotta, 2000. pp.53-54).

Según Guevara y Jaúregui (2008), la planta del *Cocos nucifera* (coco) ha sido llamada el árbol de la vida, por las múltiples propiedades que posee; es por ello que se encuentra en el lugar número 12 de la lista de especies de plantas alimenticias vitales para el hombre. Ha sido cultivada desde inicios de la humanidad, siendo tan amplia la localización en todo el mundo, que no existe una definición exacta de su origen geográfico, aunque su mayor

presencia se ubica en los climas tropicales, representando el cultivo arbóreo más importante a nivel mundial. (p.36)

Esta planta se caracteriza por poseer tallos altos que pueden llegar a medir hasta 20m; su tronco es delgado, cilíndrico, sin ramificaciones, de color café oscuro; las hojas son largas y rectas, de un color verde lustroso, como se observa en la figura N° 14. El coco, que es la fruta de esta planta, alcanza su grado de madurez entre los 11 y 12 meses. (Guevara y Jaúregui, 2008, pp.35-36).

Figura N° 14. Planta de *Coco nucifera* (Coco)



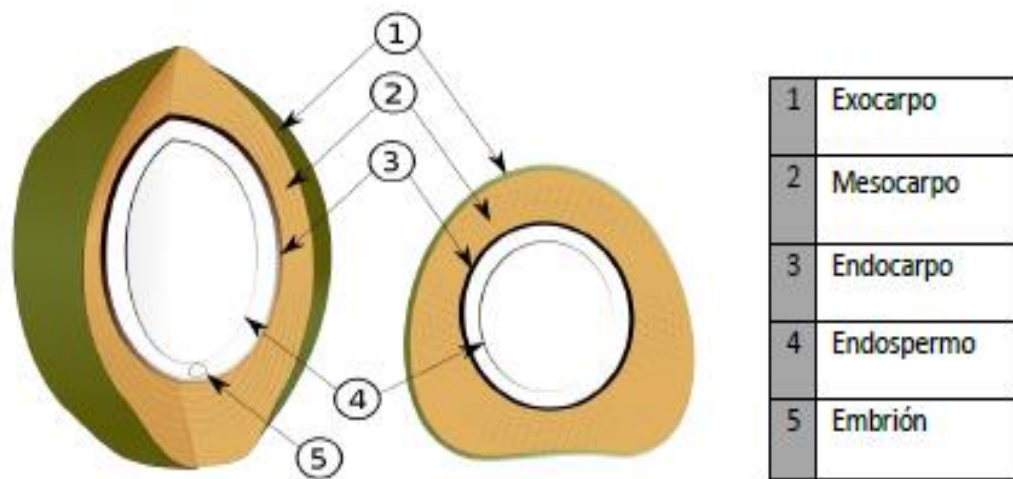
Fuente: Naranjo (2014)

Sus hojas son pinnadas, y desprenden de 200 a 300 folíolos; generalmente son de color verde amarillento, y pueden llegar a medir de 1,5 a 6 metros de longitud; conforme a la edad de la planta, menor será el tamaño de la hoja. En condiciones ambientales favorables, una planta adulta de crecimiento gigante emite entre 12 y 14 hojas por año. La copa no es muy amplia, y se compone de 25 a 30 hojas arqueadas. (Figueroa, 2013. p.19).

En cuanto a la polinización en los cocoteros, las flores masculinas son las que se abren antes que las femeninas estén receptivas, lo cual contribuye a una polinización cruzada. En el caso de los cocoteros enanos es simultánea; por tanto, hay un porcentaje alto de autofecundación. (Figueroa, 2013. p.20).

El fruto de esta planta es el coco, cubierta por un tejido fibroso, el cual está constituido por el exocarpo y el mesocarpo. En su interior se encuentra el endocarpo, formado por una capa dura llamada nuez de coco; dentro de esta se encuentra la semilla, que posee un diámetro entre 40 y 50 cm, es hueca en su interior, recubierta por la pulpa blanca comestible, y un líquido blanquecino, conocido como agua de pipa. El embrión se ubica en el endospermo, como se observa en la figura N° 15. (Naranjo, 2014. p.7).

Figura N° 15. Fruto del coco



Fuente: Naranjo (2014)

Taxonomía

Andrade (2019), dentro de su investigación, describió el *Cocos nucifera*, clasificándolo de la siguiente manera:

Tabla N° 3. Clasificación Taxonómica de la planta de coco

Nombre científico	<i>Cocos nucifera</i>
Clase	<i>Monocotyledoneae</i>
Familia	<i>Areaceae</i> o <i>Palmae</i>
Género	Cocos
Especie	<i>C. nucifera</i>
Nombre Común	Coco, cocotero, palma de coco
Parte Utilizada	Fruto

Fuente: Andrade (2019)

Fitoquímica de la planta.

Según Torres (2017), la variedad de compuestos activos que posee la planta de coco va a depender de la parte donde se encuentre el componente, siendo la fruta del coco la única parte de la planta que se ingiere. Sin embargo, la mayoría de componentes presentes en la pulpa son sustancias no polares, debido a la cantidad de grasas saturadas y ácidos grasos que contiene. En el siguiente cuadro se observa, de forma general, la composición química de esta planta. (pp.10-11).

Tabla N° 4. Composición química del *Cocos nucifera*

Carbohidratos y proteínas	Galactosa, fructosa, sacarosa y glucosa
Proteínas	Presentes en la pulpa
Vitaminas	Gamma y alfa-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico, riboflavina, tiamina
Minerales	Fósforo, selenio, magnesio, sodio, yodo, calcio, hierro y zinc
Oligoelementos	Níquel, aluminio, boro, cesio, rubidio, bario, cadmio, flúor, níquel y manganeso
Grasas	La pulpa es rica en grasas saturadas, monosaturadas y poliinsaturadas.
Ácidos orgánicos	Cítrico, málico, succínico, shikímico, en las hojas ácido cumárico y ácido ferúlico.
Ácido Graso Saturado	Láurico, cáprico, oleico, palmítico, mirístico

Fuente: Torres (2017)

Según Villalta y Benítez (2009), elaboraron un tamizaje fitoquímico de varias plantas incluido el *Cocos nucifera*, dando como resultado los siguientes metabolitos secundarios: aceites y grasas, flavonoides, triterpenos y esteroides, y taninos, mostrando, así, la presencia de una diversidad de metabolitos, principalmente los lípidos, como era de esperarse, ya que es conocido por su alto contenido lipídico en sus frutos. (p.10).

Actividad farmacología.

Dentro de los principales usos medicinales del *Cocos nucifera* se encuentra que es un potente antioxidante, por el zinc y selenio que posee la pulpa; cuenta también con propiedades antiinflamatorias y vasodilatadoras, debido a sus minerales y oligoelementos, así como también propiedades analgésicas y antipiréticas. Los diferentes nutrientes del coco

aportan protección estomacal, ya sea previniendo úlceras o ardores estomacales. Sus grasas saturadas regulan la presión sanguínea y aportan una reserva de energía para el organismo. (Andrade, 2019. p.20).

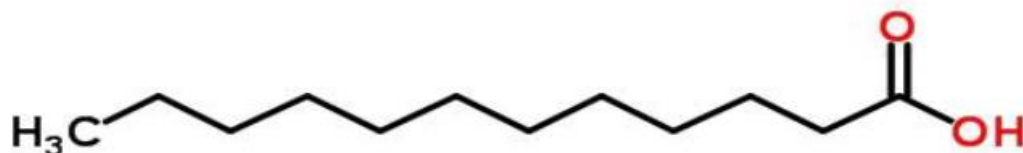
En la epilepsia y enfermedad de Alzheimer el coco es utilizado, ya que los ácidos grasos de su aceite se van directamente al hígado, convirtiéndose en cuerpos cetónicos, teniendo un efecto terapéutico en los trastornos cerebrales. En otros estudios se analizó que el aceite de coco posee efectos antiinflamatorios y antimicrobianos, previniendo el desarrollo y crecimiento de cepas bacterianas. (Andrade, 2019. p.21).

Dentro de los componentes que tiene el aceite de coco se encuentra el ácido láurico, que representa el 50% de su contenido graso; este es un ingrediente que provee propiedades únicas para la salud; cuando se ingiere este ácido el organismo lo convierte en monolaurina, la cual tiene propiedades antibacteriales y antiprotozoos. La monolaurina es un monoglicérido capaz de destruir virus recubiertos de lípidos, como: VIH, herpes, virus de la gripe. (Solano, 2017. p.60).

Por esta razón es que el aceite de coco se considera como un agente antibacteriano natural, debido a que contiene más cantidad de ácido láurico, en comparación con cualquier otro producto de origen vegetal. Otro de los ácidos que posee es el cáprico, en cantidades más pequeñas, aunque también ha sido agregado a la lista de componentes antimicrobianos del coco. (Solano, 2017. pp.59-60).

Como un mecanismo de acción del ácido láurico está el de por medio de la monolaurina, el cual destruye la bicapa lipídica de virus, bacterias, protozoos y hongos por diversos mecanismos: en los virus, evita su ensamble y la maduración; además, provoca mayor fluidez en los lípidos y fosfolípidos de la bicapa; en cuanto a las bacterias, interfiere con los signos de transducción o de formación de toxinas. Dentro de los microorganismos inactivados o destruidos por estos lípidos se encuentran los virus como herpes simple, hepatitis C, influenza, bacterias como *Helicobacter pylori* y *Staphylococcus aureus*, levaduras como *Candida albicans*, y protozoos como *Giardia lamblia*. (Boza, 2017. p.51)

Figura N° 16. Estructura Molecular del Ácido Láurico



Fuente: Boza (2017)

Tamizaje Fitoquímico

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que tiene como finalidad aislar e identificar diferentes tipos de compuestos que hacen biosintética una planta; estos compuestos pueden tener propiedades farmacológicas o toxicológicas; primero se efectúa una extracción de la planta (extracto total, crudo o bruto), se realiza por medio de un disolvente que solubilice la mayoría de compuestos, siendo metanol y etanol los más utilizados. (Cea, 2014. pp.3-4).

Posteriormente, el extracto se fracciona mediante cambio de pH y partición con solventes de diferentes polaridades, y así se empiezan los ensayos que permitan identificar los grupos fitoquímicos presentes; estas pruebas son de carácter cualitativo, debido a que son reacciones de color o precipitación de los metabolitos secundarios que se están identificando; además de ser sensibles, reproducibles y de bajo costo. (Sharapin, 2000. p.198).

Estos resultados son una orientación, y deben interpretarse junto con resultados farmacológicos; por ejemplo, cuando un extracto de una planta presenta efecto sobre el sistema nervioso central, a nivel farmacológico, y en el tamizaje fitoquímico tiene presencia de alcaloides, la probabilidad de esa actividad farmacología puede deberse a la fracción alcaloidal. La cantidad de material vegetal necesario para realizar estas pruebas varía de 50 a 200 gramos. (Sharapin, 2000. pp.190-191).

Metabolitos secundarios

Todas las plantas realizan procesos metabólicos esenciales para la vida celular y en general de la planta; estos procesos constituyen lo que se conoce como metabolitos primarios, y a partir de estos pueden desarrollarse rutas que conducen a la formación de compuestos llamados metabólicos secundarios. (Valares, 2011. p.15).

Estos son moléculas orgánicas sintetizadas, que no parecen tener una función directa con los procesos de supervivencia de las plantas, como por ejemplo fotosíntesis, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, entre otros. Además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren de los metabolitos primarios en que no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades, y no de forma generalizada en algunas especies. (Ávalos y Pérez, 2009. p.119).

En un principio estos metabolitos secundarios fueron considerados como productos finales de procesos metabólicos sin una función específica o sustancias de desecho de estas. El estudio de estas sustancias fue iniciado en el siglo XIX por químicos orgánicos, debido a la importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, aceites, ceras y otros materiales usados en la industria. (Valares, 2011. p.15).

Dentro de los metabolitos secundarios que poseen propiedades medicinales se describen:

Alcaloides.

Son una gran familia de metabolitos secundarios que tienen en común tres características: solubilidad en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas por su interacción con neurotransmisores; a dosis altas, esos son muy tóxicos; sin embargo, a dosis bajas tienen alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos; por ejemplo, la morfina y la codeína son alcaloides que pertenecen a un grupo denominado alcaloides isoquinolínicos. (Ávalos y Pérez, 2009. pp.139-140).

Terpenos.

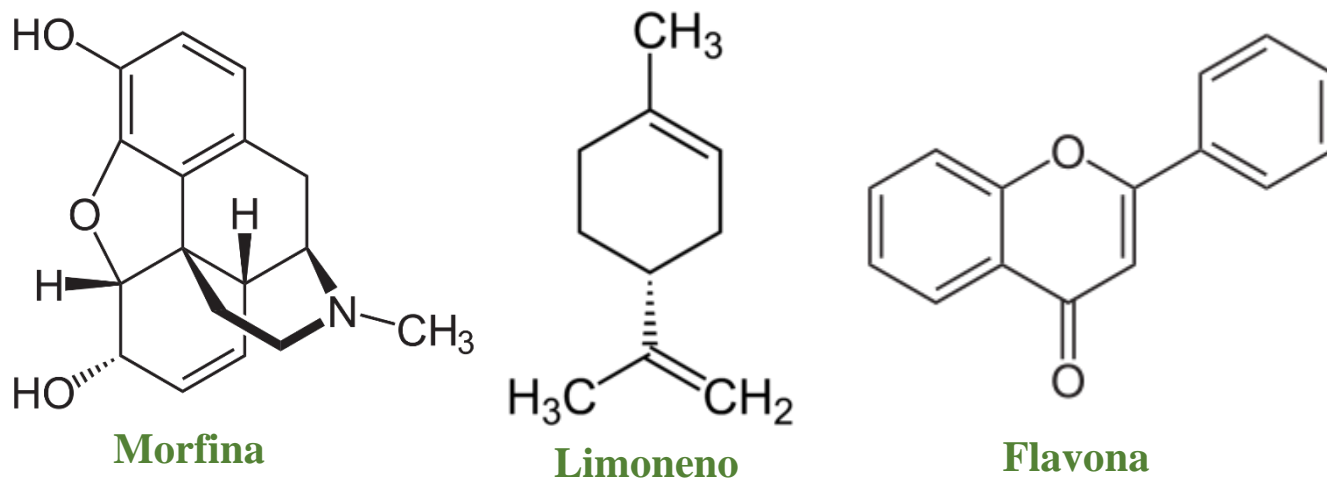
Constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. Existen alrededor de 40.000 moléculas diferentes; se clasifican por el número de unidades de isopreno (5 carbonos); por ejemplo, los terpenos contienen 10 carbonos, los triterpenos 30 carbonos, o cuando contienen más de 8 unidades de isopreno se habla de politerpenos. Muchos terpenoides son de interés comercial por su uso en aromas y fragancias como, por ejemplo, el limoneno, citral y mentol, por mencionar algunos, además de poseer propiedades medicinales importantes como anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas. (Ávalos y Pérez, 2009. pp.122-124).

Flavonoides.

Son compuestos fenólicos, y constituyen una de las familias más intrigantes de los metabolitos secundarios; por su amplia bioactividad los hacen merecedores de la atención de la investigación farmacológica. Algunos ejemplos de estos son la flavona, el flavonol, entre otros. Dentro de las propiedades farmacológicas que poseen estos compuestos son antiinflamatorias, antioxidantes, antiagregantes, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas y hepato protectoras. (Álvarez y Orallo, 2003. pp.130).

A partir de esto, los flavonoides han ido ganando interés como potenciales agentes terapéuticos frente a una amplia variedad de enfermedades. Además, los efectos curativos de muchos remedios de la medicina natural tradicional pueden ser atribuidos a la presencia de estas moléculas. (Álvarez y Orallo, 2003. p.131).

Figura N° 17. Estructura molecular de un alcaloide (morfina), terpeno (limoneno) y flavonoide (flavona)



Fuente: Ávalos y Pérez (2009)

Cumarinas.

Proceden del metabolismo de la fenilalanina; son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos; su interés farmacológico es limitado; algunas furanocumarinas son fotosensibilizantes y, por este motivo, se puedan utilizar en terapéutica para el tratamiento de la soriasis; también tienen propiedades para tratar edemas y son antimicrobianas; se han utilizado en la realización de estudios clínicos en pacientes con cáncer avanzado, por su acción inmunoestimulante y citotóxica. Dentro de las cumarinas se encuentra el dicumarol. (Miño, 2007. pp.27-28).

Antraquinonas.

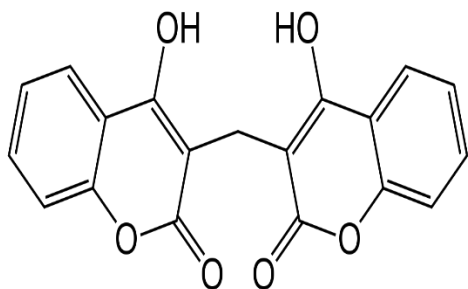
Constituyen el grupo más numeroso de las quinonas naturales; se derivan de la oxidación de compuestos aromáticos; son la base y fuente de una importante cantidad de

colorantes por su color amarillo a violeta, y contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales, como, por ejemplo: se tienen antranas, las mismas antraquinonas, oxantranas, entre otras, y dentro de sus propiedades farmacológicas se encuentra su acción purgante. (Miño, 2007. p.28)

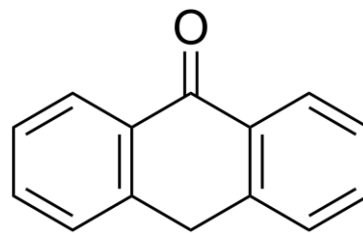
Taninos.

Son polímeros polifenólicos producidos en las plantas, y que tienen la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas. Algunos ejemplos son los galotaninos y elagitaninos. Tienen la propiedad de coagular las proteínas de las mucosas y tejidos; crean una capa aislante y protectora, que reduce la irritación y el dolor; entre otras de sus propiedades farmacológicas se encuentran antidiarreicas, antiséptico local, antiinflamatorias, antioxidantes. (Miño, 2007. pp.25-26).

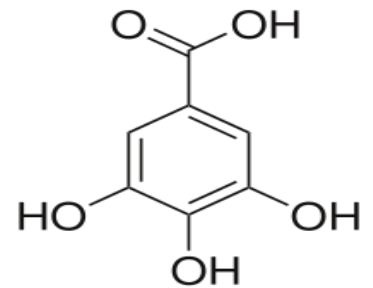
Figura N° 18. Estructura molecular de una cumarina (dicumarol), antraquinona (antrona) y tanino



Dicumarol



Antrona



Tanino

Fuente: Miño (2007)

Aceites esenciales.

Constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes o en disolventes orgánicos; son las sustancias aromáticas naturales responsables de las fragancias de las flores y otros órganos vegetales. Pueden depositarse en diferentes partes de la planta; por ejemplo, en tejidos específicos como en el pericarpio de los frutos cítricos; en los pétalos de las rosas, en la corteza, tallo, fruto u hojas de las plantas. (López, 2004. p.88).

A temperatura ambiente son incoloros, pero al oxidarse se resinifican y se tornan de un color amarillento oscuro; son generalmente mezclas de varios constituyentes, pero pertenecen, de forma casi exclusiva, al grupo de los terpenos y, en menor medida, al grupo de los compuestos aromáticos que derivan del fenilpropano. Dentro de las acciones farmacológicas están la aromaterapia, acción antirreumática, antiinflamatoria, espasmolítica, sedante, antiséptica y antimicrobiana. (López, 2004. P.90).

Pruebas de Identificación de Metabolitos Secundarios

Prueba de Dragendorff

Esta prueba se utiliza para la identificación de alcaloides; para este análisis se usa el reactivo de Dragendorff, donde Palacios (2013), menciona que este es una solución de yodo bismuto de potasio o KBiI_4 , que al agregarla a una sustancia que contenga alcaloides se formará un precipitado de coloración anaranjada. Estos metabolitos secundarios son solubles en solventes orgánicos como el éter y cloroformo, por lo que generalmente las prueban dan positivas cuando son extraídos por estos disolventes. (p.35)

Prueba de Shinoda

Para Carvajal, Hata, Sierra y Rueda (2009), esta prueba se utiliza para la identificación de flavonoides, por medio de la reacción de Shinoda, la cual consiste en adicionar los reactivos de metanol, limaduras de magnesio y ácido clorhídrico concentrado, ocasionando una reacción donde hay desprendimiento de hidrógeno. Una vez que termine se

observan rojizos, violetas o anaranjados, lo cual es indicativo de la presencia de este metabolito secundario. (pp.164-165)

Prueba de KOH

Esta prueba se utiliza para la identificación de cumarinas, las cuales se derivan de la α benzopirona y, dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde, al ser irradiados con luz ultravioleta, indicando la presencia de este metabolito secundario. Además, todas las cumarinas poseen en su estructura γ -lactona, donde se puede identificar mediante las reacciones propias para lactonas. (Carvajal, et al., 2009. p.166).

Según Carvajal et al. (2009), esta prueba se realiza por medio de una cromatografía de capa fina, y revelando con KOH, la cual propicia la aparición de la fluorescencia en caso de la presencia de este metabolito secundario. (p.167).

Prueba de Borntrager-Kraus

Esta prueba se llama así porque se basa en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos, produciendo una oxidación de las antranas y de los antranoles, hasta generar las antraquinonas, por medio de la formación de complejos de color rojo, que indican positivo en este metabolito secundario. Lo único que se necesita para generar esta reacción es el reactivo de hidróxido de amonio, a una concentración del 25%. (Ochoa y Sarmiento, 2018. pp.20-21).

Prueba de Taninos

Como su nombre lo dice, lo que busca es la identificación de taninos. Según Ochoa y Sarmiento (2018), para una identificación rápida de este metabolito secundario se utiliza una prueba de colorimétrica con adicionar cloruro férrico (FeCl_3). Un cambio de color a azul oscuro indica la presencia de taninos pirogálicos (hidrosolubles), pero si más bien el cambio es a verde indica la presencia de taninos de tipo catecol (taninos condensados), que son un tipo de flavonoide presente en la planta que cumple funciones de defensa en esta. (p.44)

Identificación de Terpenos por medio de Cromatografía de capa fina

Estos compuestos tienen una estructura compuesta por un núcleo esteroidal glicosilado (2 desoxiazúcares) y una lactona insaturada de 5 o 6 miembros. Para la detección de estos compuestos se puede emplear una cromatografía de capa fina, y se revelan con el reactivo de vainillina; se considera un resultado positivo si aparecen manchas en cualquier tonalidad de rojo, azules o verdes. (Carvajal et al., 2009. p.164).

Prueba de Espuma

Se utiliza para la identificación de Saponinas. Según Ochoa y Sarmiento (2018), es una prueba muy sencilla de realizar: solo se debe tapar la muestra primero y agitarla durante un minuto; si la espuma permanece estable por lo menos durante 30 minutos, se considera positiva. (p.43).

Prueba de Benedict: Identificación de azúcares reductores

Según Huertas (2016), esta prueba para la identificación de azúcares reductores se fundamenta debido a que el ion cúprico, proveniente del sulfato cúprico (reactivo de Benedict), es capaz de reducirse en un medio alcalino por efecto del grupo aldehído del azúcar y con forma de Cu^+ . Este nuevo ion se observa como un precipitado rojo ladrillo correspondiente al óxido cuproso, indicando que es positivo en azúcares reductores. (p.35)

Pruebas de Sensibilidad a Antibióticos

Estas pruebas históricamente han sido realizadas de dos maneras: *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, en los laboratorios de microbiología clínica se realizan, exclusivamente, pruebas de sensibilidad *in vitro*. En principio, las pruebas *in vitro* tratan de predecir el efecto de un tratamiento *in vivo*, pero utilizando solo 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).

Según Reller, Weinstein, Jorgensen y Ferraro (2009), estas pruebas de desempeño dan un indicador de cuán sensible es la bacteria elegida a los antimicrobianos, o para detectar si existe resistencia en aislados bacterianos individuales. En la clínica hay diferentes métodos de prueba de sensibilidad a los antibióticos. A continuación, se describen algunos:

Pruebas de Dilución de Caldo

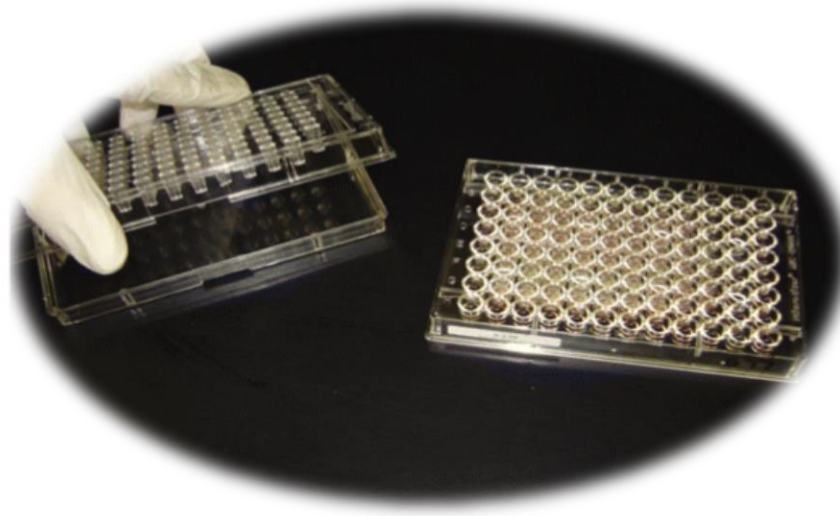
Este es uno de los primeros métodos usados. Consiste en la preparación de diluciones con antibióticos conocidas, colocadas en un tubo de ensayo con un medio de crecimiento líquido como se observa en la figura N° 19, para luego inocular la bacteria estandarizada en la suspensión; luego se incuba por 24 horas a una temperatura 35-37 °C; una vez transcurrido el tiempo, lo que se busca es turbidez, lo que indica que hay crecimiento bacteriano. (p.1749).

La concentración más baja de antibiótico, que impida esa turbidez, representa la concentración inhibitoria mínima (MIC). La ventaja de esta técnica es que da un resultado cuantitativo, pero como toda técnica, tiene sus desventajas, y una de ellas es la posibilidad de errores en la preparación de las soluciones con antibiótico. (p.1749).

Método de Gradiente Antimicrobiano

Se utiliza el principio de un gradiente de concentración de antimicrobiano usando tiras delgadas, que están impregnadas de antibiótico seco a diferentes concentraciones en la parte inferior como se observa en la figura N° 20. Se pueden colocar varias tiras en la superficie de una placa de agar, que se haya inoculado con una suspensión de la bacteria estandarizada; se incuba por 24 horas; estas pruebas se leen observando las tiras desde la parte superior de la placa. El MIC está determinado por la intersección de la parte inferior del área de inhibición del crecimiento en forma de elipse con la tira de prueba. (p.1750)

Figura N° 19. Pruebas de Dilución de Caldo



Fuente: Reller et al. (2009)

Figura N° 20. Prueba Gradiente Antimicrobiano

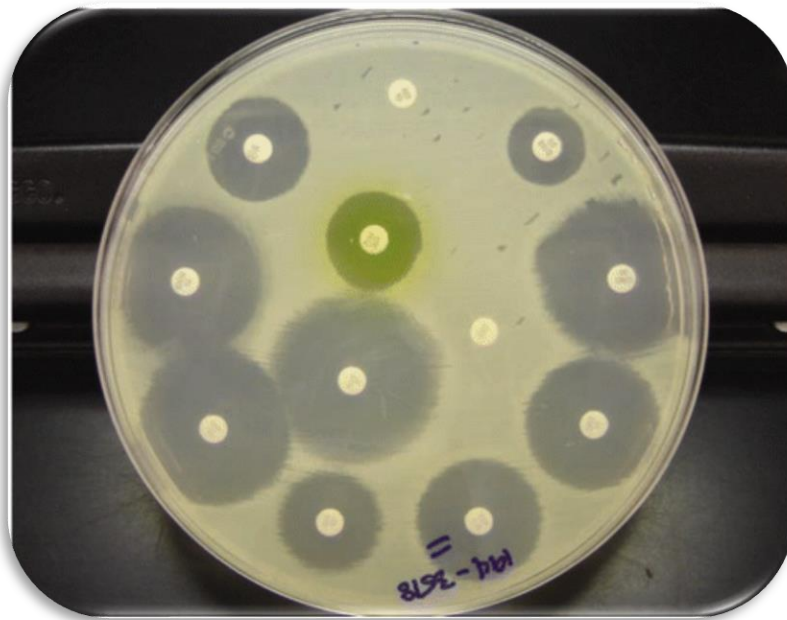


Fuente: Reller et al. (2009)

Antibiograma

Según Núñez (2007), es una prueba muy simple y práctica para determinar la sensibilidad de la bacteria a un antibiótico. Se realiza por el método de difusión, donde se inocula la bacteria a una concentración conocida sobre la superficie de un medio de agar, y luego se colocan los discos de papel filtro con una solución de antimicrobiano conocida. Lo que se busca con esta técnica son halos de inhibición en los antibióticos, en los que el microorganismo sea susceptible. Se inocula la muestra por 18-24 horas a 37 °C; los resultados de la prueba de difusión en disco son cualitativos, porque da una categoría de susceptibilidad (susceptible, intermedia o resistente). (pp.29-30).

Figura N° 21. Prueba de Antibiograma



Fuente: Reller et al. (2009)

Cromatografía para la Detección de Componentes en una Muestra

Es un método físico de separación, en la cual los componentes que se quieren separar se distribuyen en dos fases, una fase estacionaria (inmóvil) y una fase móvil, que se mueve en una dirección determinada a través de la primera. La adsorción selectiva se da, produciendo manchas de diferentes colores; el origen de este método se le atribuye al botánico Tswett, de origen ruso, en el siglo XX, donde empleó esta técnica de separación en una mezcla de pigmentos vegetales. (Sierra, Gómez y Pérez, 2009. pp.141-142).

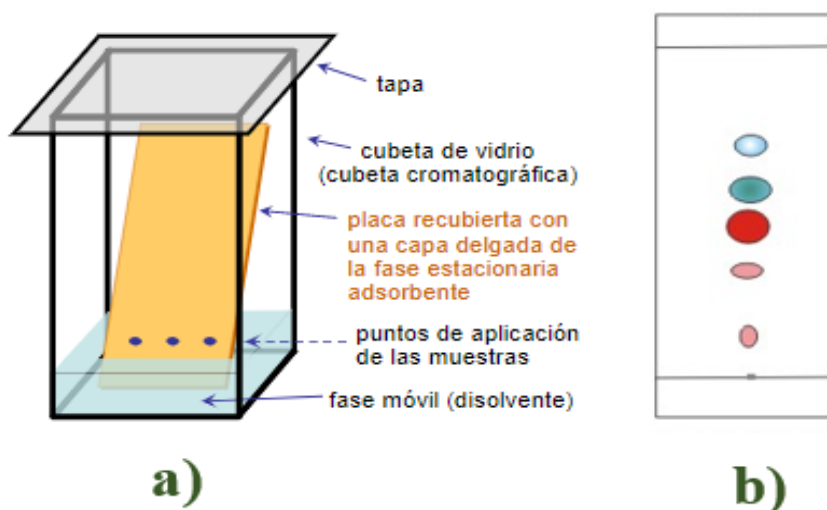
Por otra parte, Sierra et al. (2009) hacen referencia a que la clave de la separación, en esta técnica, es que la velocidad con la que se mueve cada sustancia depende de su afinidad relativa por ambas fases. De forma general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente, mientras que los más afines a la fase móvil se mueven con mayor rapidez. Existen diversos tipos de cromatografía; sin embargo, se van a explicar las dos técnicas utilizadas en esta investigación. (pp.149-150).

Cromatografía de Capa Fina

Sharapin (2000), hace referencia a que esta técnica es de origen cualitativa, donde se produce un fraccionamiento que va a lograr separar y aislar los componentes de una mezcla por medio de migración diferencial; se va utilizar una fase estacionaria, la cual es sólida, y una fase móvil líquida. Se coloca en la fase estacionaria una pequeña gota de la sustancia a separar, y se coloca en la fase móvil, como se muestra en la figura N° 22 (a); al final se obtiene la separación de los compuestos, como se observa en la figura 22 (b). (p.152)

Escoger el eluyente apropiado es de gran importancia para la buena separación de los compuestos; debe ser seleccionado tanto en función de la fase estacionaria como de la naturaleza de la sustancia que va a ser separada, con el fin de que cada componente se pueda desplazar. Dentro de las ventajas de este método es su fácil ejecución y comprensión de los resultados; además de que se usa un equipo simple, y es de bajo costo. (Sharapin, 2000. p.153).

Figura N° 22. Cromatografía de Capa Fina



Fuente: Pereira et al. (2013)

Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas

Gutiérrez y Droguet (2002) describen esta técnica como una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas; se emplea para confirmar la existencia o ausencia de un compuesto en una determinada muestra, combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos o trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. (pp.35-37).

La razón por la cual estas dos técnicas se acoplan es debido a que la cromatografía de gases no puede verificar la presencia de un compuesto determinado, sobre todo en situaciones donde se analizan muestras que contienen varios componentes; por esto se utiliza un acoplado a la espectrofotometría de masas, porque con este equipo se logran identificar los componentes casi sin equivocaciones, pero no es capaz de reconocer ningún compuesto si no están separados de la muestra.

La utilización de una cromatografía de gases que esté acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión para su correcto funcionamiento. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa, y lo único que necesitan es una pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles para poder combinarlas. El equipo funciona inyectando la muestra en el cromatógrafo de gases, obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados, que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico, y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. (pp. 37-41).

Figura N° 23. Equipo de Cromatografía de gases acoplado a masas



Fuente: Mora y Vargas (2018)

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la investigación

Esta investigación tendrá un enfoque cuantitativo y cualitativo, el cual Hernández, Fernández y Baptista (2014), en su libro “Metodología de la Investigación”, lo definen como secuencial y probatorio, debido a la utilización de diversas variables que logran ser medibles a un determinado tiempo. Además, se requiere de instrumentos para la recolección de los datos, los cuales son traducidos en datos numéricos y tabulados, generando, así, hipótesis, para establecer una serie de conclusiones respecto a estas. (p.4).

La razón de esto es, porque se pretende hacer un fraccionamiento de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco) con disolventes de distintas polaridades, para obtener diferentes extractos. Además, se realiza un tamizaje fitoquímico y una cromatografía de gases acoplado a masas a la pulpa, para identificar los metabolitos secundarios presentes, y probar su actividad antimicrobiana contra la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Diseño de la investigación

El método de esta investigación es de tipo experimental. Los autores Hernández et al. (2014), refieren que estos se utilizan cuando el investigador pretende establecer el posible efecto de una causa que se manipula intencionalmente con una o más variables independientes, dentro de una situación de control para el investigador: es decir: “La esencia de esta concepción de experimento es que requiere la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados”. (p.129).

Esto es debido a que involucra la obtención de extractos de la pulpa del *Cocos nucifera* por medio de disolventes, así como la identificación de principios activos presentes en los extractos, y determina la capacidad antimicrobiana de estos frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, con el fin de poder indicar si algún extracto de la pulpa del *Cocos*

nucifera (coco) tiene actividad antimicrobiana o no frente a la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*.

Variables de la investigación

En este trabajo de investigación el cuadro de operacionalización de variables va en función de los objetivos específicos planteados.

Tabla N° 5. Operacionalización de variables

Objetivo Especifico	Variable	Definición conceptual	Indicador	Instrumento
Elaborar un fraccionamiento de los componentes presente en la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> (coco) utilizando los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo.	Fraccionamiento químico.	Separación de una mezcla en sucesivas etapas, eliminando en cada etapa alguna proporción de una de las sustancias de la mezcla. (Luján, 2017).	Diferencias de polaridad entre el disolvente y extracto.	Embudo separador mediante extracción líquido-líquido.
Efectuar un tamizaje fitoquímico de la pulpa del <i>Coco nucifera</i> (coco), con el fin de identificar los metabolitos	Tamizaje fitoquímico.	Permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta por medio de	Identificación colorimétrica de la presencia de los metabolitos secundarios en los extractos	Observación cualitativa de las pruebas colorimétricas: Shinoda. Dragendorff.

secundarios presentes.		solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. (Calle, et al., 2017).	de la pulpa de coco.	KOH (cumarinas). Lieberman Burchard. Borntrager. Kraus. Benedict. Taninos. Vainillina. Lugol. Espuma.
Comprobar la eficacia <i>in vitro</i> de los diferentes extractos obtenidos de la pulpa del <i>Cocos nucifera</i> (coco) en diferentes concentraciones contra el <i>Staphylococcus aureus</i> , para determinar cuánta sensibilidad presenta al extracto.	Sensibilidad de la bacteria.	Determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. (Águila, 2016).	% de inhibición.	Placa de Petri. Medio de cultivo. Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> . Incubadoras.

Fuente: Elaboración propia (2019)

Instrumentos y Técnicas

Fraccionamiento de pulpa de *Cocos nucifera* (coco)

Materiales y Equipos.

Botellas con cierre hermético.

Colador.

Beaker.

Balanza analítica, marca: ADAM Nimbus, modelo: NBL-254e, capacidad 250g +/- 0,0001.

Estufa DIGISYSTEM, modelo DN-500.

Büchner.

Kitasato.

Papel filtro marca Fisher, cualitativo P4.

Embudo Separador.

Embudo de espiga corta.

Erlenmeyer.

Probetas.

Rotavapor marca Yamato, modelo: BM500.

Agitador de vidrio.

Espátula.

Coco rallado 500g.

Reactivos.

Etanol 70%.

Hexano.

Diclorometano.

Acetato de Etilo.

Sulfato de Sodio anhidro.

Método de extracción para el fraccionamiento de pulpa de Cocos nucifera (coco)

1. Primero se procedió a sacar la pulpa de coco de la cáscara; una vez obtenida, se ralló hasta tener 250 g, el proceso de recolección de la muestra vegetal se realizó en el mes de junio en la zona de Jicaral, península de Nicoya.

2. Se coloca el coco rallado en una botella ámbar y se le adiciona etanol al 70% hasta tapar completamente; se deja reposar por una semana, moviendo el contenido de la botella cada dos días, para una correcta maceración.

3. Una vez transcurrida la semana, se procede a filtrar al vacío el contenido, por medio de un embudo de Büchner y Kitasato, utilizando un papel de filtro marca Fisher, cualitativo P4.

4. Filtrado el extracto, se procede a concentrar el extracto, eliminando el etanol por medio del rotavapor, a una temperatura de 60 °C a 100rpm, obteniendo un extracto acuoso.

Figura N° 24. Extracto acuoso de la pulpa del Cocos nucifera obtenido por maceración con etanol al 70%, y posterior filtración al vacío con Büchner y Kitasato y concentración en el rotavapor



Fuente: Elaboración propia (2019)

5. El extracto acuoso obtenido se procede a dividir a la mitad; una de las mitades se usa para el tamizaje fitoquímico y la otra para el fraccionamiento.

6. Para el fraccionamiento se coloca el extracto acuoso en un embudo separador y se le adiciona hexano, efectuando tres extracciones de 25 mL cada una de ellas.

7. El extracto en hexano se seca con sulfato de sodio anhidro.

8. Se repite el mismo procedimiento de la extracción con hexano, pero esta vez utilizando diclorometano, y posteriormente con acetato de etilo.

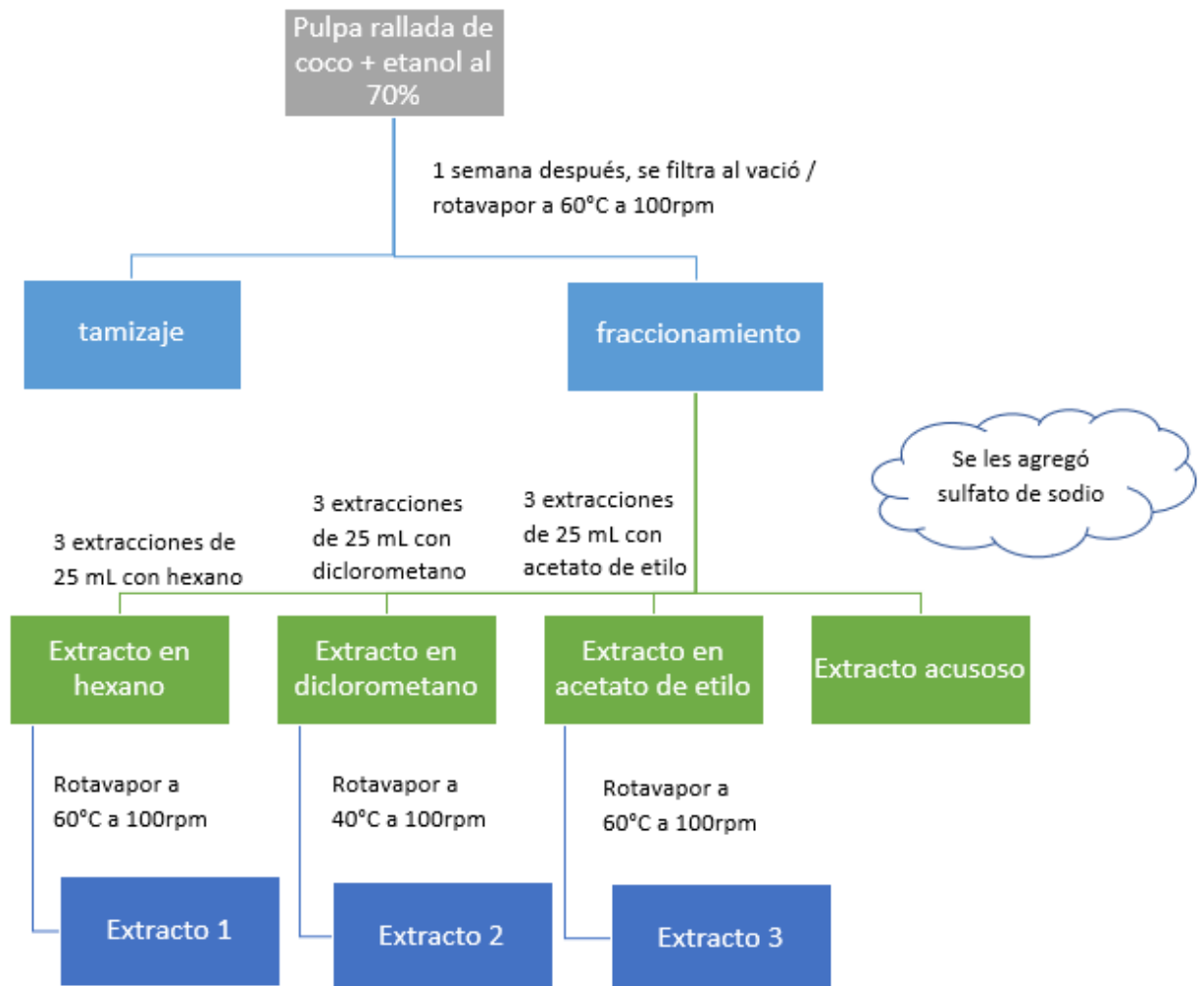
9. Una vez obtenido el fraccionamiento del extracto acuoso de la pulpa de coco, se procede a evaporar el disolvente de cada extracto, por medio del rotavapor.

Figura N° 25. Proceso de extracción líquido-líquido utilizando embudo separador (a) y Proceso de concentración de extractos utilizando rotavapor (b)



Fuente: Elaboración propia (2019)

Figura N° 26. Esquema para la metodología empleada en el fraccionamiento de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco)



Fuente: Elaboración propia (2019)

Extracción del aceite de *Cocos nucifera* (coco)

Materiales y Equipos

Botellas con cierre hermético.

Colador.

Beaker.

Büchner.

Kitasato.

Papel filtro marca Fisher, cualitativo P4.

Balanza analítica, marca: ADAM Nimbus, modelo: NBL-254e, capacidad 250g +/- 0,0001.

Embudo separador.

Embudo de espiga corta.

Erlenmeyer.

Probetas.

Rotavapor, Yamato, modelo: BM500.

Agitador de vidrio.

Espátula.

Coco rallado 500g.

Reactivo.

Hexano.

Método de extracción para obtener aceite de Cocos nucifera (coco)

1. Se obtienen 250 g de pulpa del *Cocos nucifera*, debidamente rallada, sin rastros de su cáscara.
2. Se coloca el coco rallado en una botella ámbar y se le adiciona hexano hasta tapar completamente; se deja reposar por una semana, moviendo el contenido de la botella cada dos días, para una correcta maceración.
3. Una vez transcurrida la semana, se procede a filtrar al vacío el contenido por medio de un embudo de Büchner y Kitasato, utilizando un papel de filtro marca Fisher, cualitativo P4.

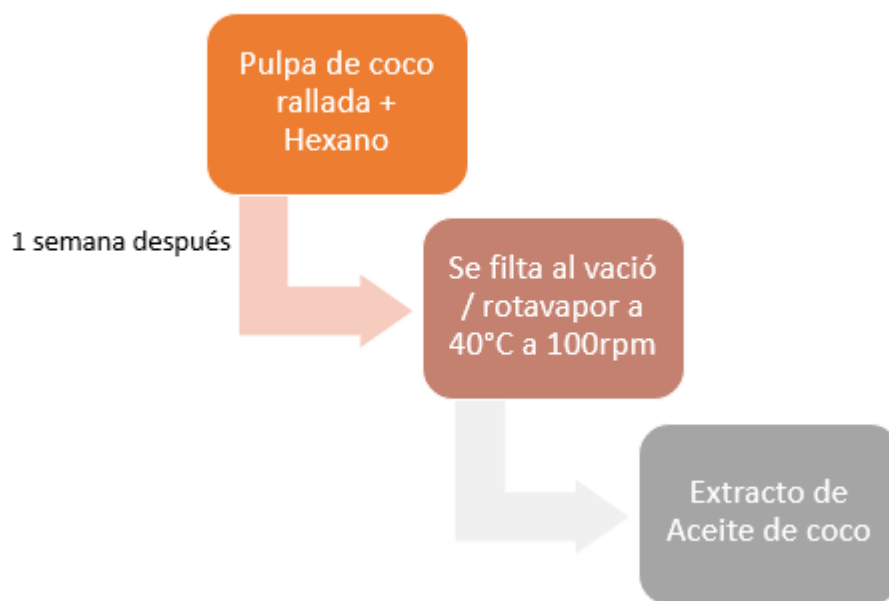
4. Filtrado el extracto, se procede a concentrar el extracto eliminando el hexano por medio del rotavapor a 40°C/100rpm, obteniendo un extracto de apariencia aceitosa.

Figura N° 27. Equipo de filtración al vacío (Büchner Kitasato y bomba al vacío) junto al extracto de *Cocos nucifera* de hexano



Fuente: Elaboración propia (2019)

Figura N° 28. Metodología empleada en la extracción de aceite de la pulpa del *Cocos nucifera*



Fuente: Elaboración propia (2019)

Tamizaje fitoquímico de la pulpa de *Cocos nucifera* (coco)

En la realización del tamizaje fitoquímico, se siguió el procedimiento descrito en el Manual de Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Internacional de las Américas, elaborado por el Licenciado Javier Rodrigo Alpizar Cordero, quien toma como referencia a Domínguez (1973).

Materiales y Equipo

Embudo separador.

Aro metálico.

Goteros.

Capilares.

Vidrio reloj.

Espátulas.

Pizeta.

Soporte universal.

Erlenmeyer.

Calentador-agitador, marca Corning, modelo: PC 420D.

Beaker.

Tubos de ensayo.

Papel filtro.

Lámpara UV-Vis, longitud de onda 254 nm y 365 nm.

Cromatoplasmas TLC Sílica Gel 60 F254.

Capilla extractora Biobase, modelo FHI 200 (X).

Reactivos.

Éter etílico.

Ácido clorhídrico al 2%.

Reactivo Dragendorff.

Metanol concentrado.

Limaduras de Magnesio.

Ácido clorhídrico concentrado.

Hidróxido de potasio 0,5 mol/L.

Cloroformo.

Anhídrido Acético.

Ácido Sulfúrico concentrado.

Hidróxido de Amonio 25%.

Cloruro de hierro III 1%.

Hexano.

Acetato de Etilo.

Reactivo de Vainillina 1%.

Etanol 99%.

Lugol (yodo, yoduro de potasio y agua destilada).

Yodo metálico.

Reactivo de Benedict (Sulfato cúprico, Citrato de sodio y Carbonato anhidro de sodio).

Hidróxido de sodio al 10%.

Método para la extracción de la fase etérea.

1. Se toman 75 mL del extracto acuoso concentrado que se separó para este apartado; se coloca en un embudo separador y se le agregan 25 mL de éter etílico, agitando levemente para liberar el gas que se forma; cuando no salga más gas significa que las presiones están equilibradas.

2. Se coloca el embudo separador en el soporte y se retira la tapa; se deja reposar hasta que se observa una división clara de ambas fases.

3. Se recolectan las dos fases en recipientes diferentes y se rotulan correctamente, para evitar confusiones.

4. Se coloca nuevamente el extracto acuoso en el embudo separador y se repite el procedimiento anterior hasta 4 veces, juntando todos los extractos de éter etílico en el mismo recipiente.

Extracto acuoso.

1. El extracto acuoso, que se utilizó en la extracción con éter etílico, se separa en dos partes en recipientes distintos, y se rotulan como AQ1 y AQ2.

2. Al extracto AQ2 se le añaden 10 mL de ácido clorhídrico 3 mol/L; se agita bien y se calienta por 20 minutos; transcurrido el tiempo, se espera a que la muestra se enfríe.

3. Se coloca la mezcla en un embudo separador, y se procede a realizarle 3 extracciones con éter etílico, de la misma manera que se realizó en la extracción anterior.

4. Al extracto etéreo se le denomina AQ2E y al extracto acuoso como AQ2A.

A los extractos obtenidos anteriormente se les realiza una serie de pruebas que conforman el tamizaje fitoquímico. En la siguiente tabla se detalla esta información:

Tabla N° 6. Pruebas que se le deben realizar a cada extracto para el tamizaje fitoquímico

Extracto	Prueba realizada
Etéreo (E)	Identificación de Terpenos, Triterpenos, Taninos, Alcaloides, Flavonoides, Cumarinas y Antraquinonas
Etéreo 2 (AQ2E)	Identificación de Alcaloides, Triterpenos, Flavonoides, Cumarinas y Antraquinonas.
Acuoso 1 (AQ1)	Identificación de Almidón, Saponinas, Taninos, Alcaloides y Azúcares reductores.
Acuoso 2 (AQ2A)	Identificación de Antraquinonas

Fuente: Elaboración propia (2019)

Pruebas para el tamizaje fitoquímico

Prueba de Dragendorff (identificación de alcaloides)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo; usando el baño maría se evaporó el disolvente (éter).
2. El residuo resultante se disolvió en 3 mL de HCl al 2%; luego se le agregaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff; este reactivo se agregó por las paredes del tubo de ensayo.
3. Si hay presencia de alcaloides se forma un precipitado anaranjado.
4. Esta prueba se repite para AQ2E y AQ1, con la excepción de que al AQ1 no se coloca en baño maría, sino que se le adicionan los reactivos después de colocar los 4 mL en el tubo de ensayo.

Prueba de identificación de flavonoides (Shinoda)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño maría se evaporó el disolvente (éter).
2. El residuo resultante se disolvió en 2 mL de metanol y se calentó nuevamente en baño maría.
3. Se le adicionó una punta de espátula de limaduras de magnesio; se llevó la muestra a la capilla de extracción, con mucho cuidado, y por las paredes del tubo de ensayo se le agregó 1 mL de HCl concentrado; se agitó suavemente (se iba a generar un burbujeo violento).
4. Si hay presencia de flavonoides se debe generar una coloración rojo oscuro (si no es alta la concentración de este metabolito puede ser un color rosa).
5. Esta prueba se repite para AQ2E.

Prueba de identificación de cumarinas (KOH)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo; usando el baño maría se evaporó el disolvente (éter).
2. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de agua hirviendo.
3. Se colocaron 2 gotas separadas con ayuda de un capilar a un papel filtro, de la solución que estaba en el tubo de ensayo.
4. Se observaron las gotas del papel filtro usando la lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm; luego se le agregó KOH a las gotas y se volvió a observar en la lámpara.
5. Si hay presencia de este metabolito, se debe observar una coloración verde alrededor de la muestra, inmediatamente después de aplicado el KOH.
6. Esta prueba se repite para AQ2E.

Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triperpenos y esteroides)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño maría se evaporó el disolvente (éter).
2. Se llevó el tubo de ensayo a la capilla y se le agregó al residuo obtenido: 1 mL de cloroformo.
3. Luego se le adicionó 1 mL de anhídrido acético, y se agitó el tubo de ensayo con cuidado.
4. Al tener el tubo inclinado y sin agitar, se le agregaron lentamente 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
5. Si la prueba es positiva en este metabolito, se formará un anillo en medio de las dos fases, de color rojo marrón o verde esmeralda.
6. Esta prueba se repite para AQ2E.

Prueba de Borntrager-Kraus (Identificación de antraquinonas)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño maría se evaporó el disolvente (éter).

2. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de hidróxido de amonio al 25%.

3. Si la prueba es positiva en este metabolito, la disolución se tornará de un color rojo oscuro.

4. Esta prueba se repite para AQ2E y AQ2A, con la excepción de que al AQ1 no se coloca en baño maría, sino que se le adicionan los reactivos después de colocar los 4 mL en el tubo de ensayo.

Prueba de Taninos (Identificación de Taninos)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño maría se evaporó el disolvente (éter).

2. Al residuo obtenido se le añadieron cinco gotas de cloruro de hierro III al 1%.

3. Si la prueba es positiva en este metabolito, la disolución se tornará de un color azul (taninos gálicos) o color verde (taninos catéquicos).

4. Esta prueba se repite para AQ1, omitiendo el paso número 1.

Prueba de Cromatografía de capa fina TLC (Determinación de Terpenos)

1. Se tomó, con un capilar, una muestra del extracto etéreo, y se aplicó una pequeña gota en una placa cromatográfica de capa fina (sílica gel con fluorescencia a 254 nm); esta fue la fase estacionaria.

2. Para la elaboración de la fase móvil o eluyente se usaron 18 mL de hexano y 2 mL de acetato de etilo (9:1).

3. Se armó el sistema cromatográfico, igual que se muestra en la figura N° 22; se tuvo el cuidado de que la cantidad de eluyente realizada no estuviera por encima del punto de aplicación de la muestra.

4- Una vez ajustado el sistema, se colocó la placa dentro, se cubrió y se retiró la placa cuando el eluyente llegó a la marca de 0.5 cm de la parte superior.

5- Se dejó secar bien y se observó con la luz UV a 254 y 365 nm.

6- A la placa se le agregó el reactivo vainillina-ácido sulfúrico en etanol, hasta que quedó bien impregnada. Se realizó desde la parte superior de la placa y se dejó correr en línea recta. Se dejó secar.

7. La placa se reveló quemándola en el calentador-agitador con la parte metálica en contacto con el calentador, y se retiró cuando la coloración se observó intensa.

8. Se repitió el proceso para otra placa, con la variación que se reveló utilizando yodo metálico.

Prueba de Lugol (Determinación de Almidón)

1. Se tomaron 2 mL del extracto AQ1 y se colocó en un tubo de ensayo.

2. Se le añadió gota a gota el reactivo de Lugol, hasta observar que hay un cambio de color; se puede agregar un máximo de 2 mL del reactivo.

3. Para que la prueba dé positivo a almidón, debe cambiar a color azul.

Prueba de Espuma (Determinación de saponinas)

1. Se agregaron 3 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.

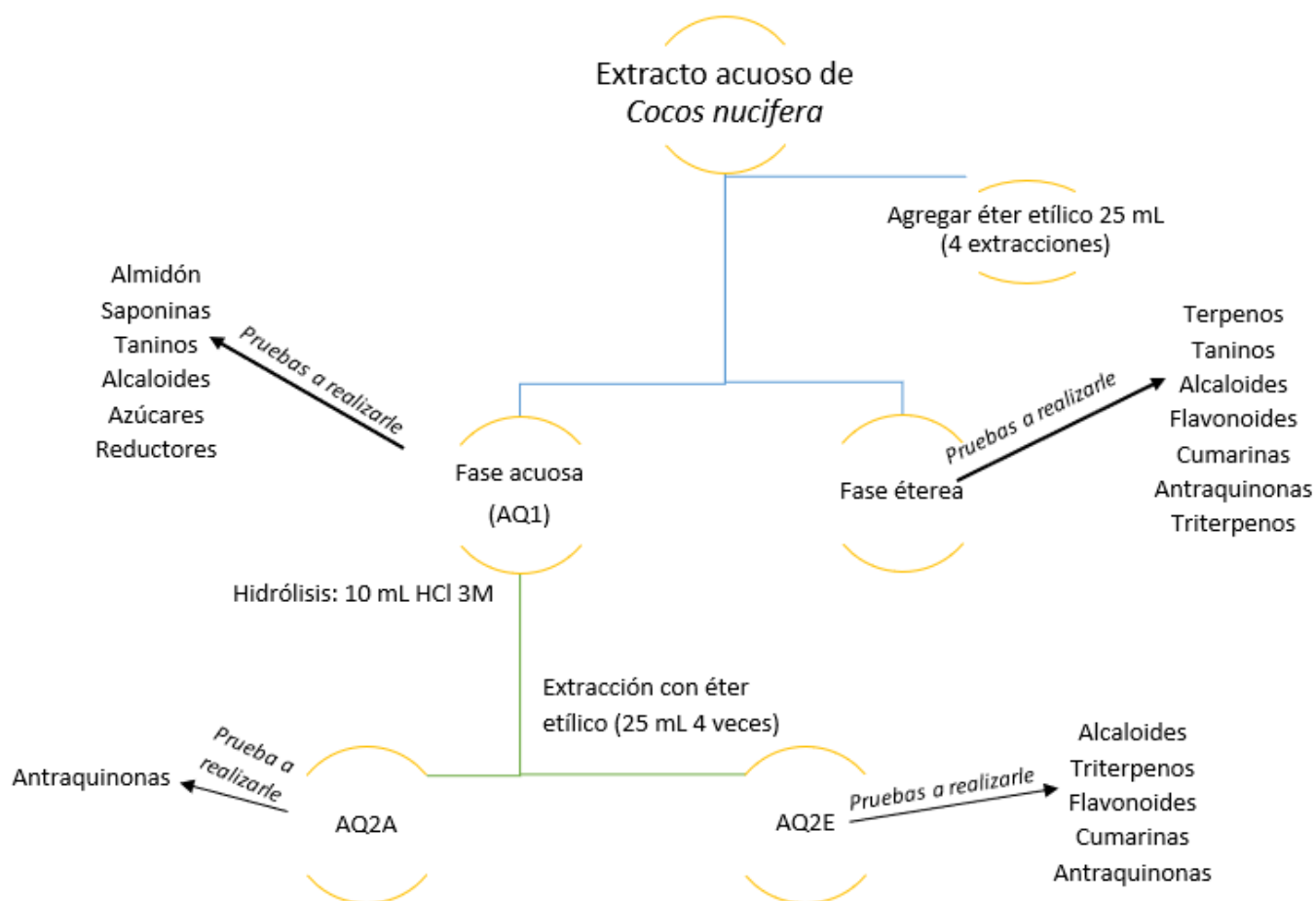
2. Se tapó el tubo con papel parafina y se agitó por un minuto; se dejó reposar por 20 minutos.

3. La prueba es positiva si la solución presenta espuma.

Prueba de Benedict (Determinación de azúcares reductores)

1. Se agregaron 3 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.
2. Se le añadieron 10 gotas del reactivo de Benedict, agitando un poco.
3. Se colocó el tubo de ensayo en un baño maría y se esperó 5 minutos.
4. La prueba es positiva si hay formación de un precipitado rojo ladrillo.

Figura N° 29. Metodología empleada en el tamizaje fitoquímico para cada uno de los extractos obtenidos del *Cocos nucifera* (coco)



Fuente: Elaboración propia (2019).

Determinación de composición del aceite de *Cocos nucifera* por cromatografía de gases acoplado a masas

Este análisis se realizó en el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA), con el fin de determinar los componentes del aceite obtenido de la pulpa de *Coco nucifera*, en especial si posee ácido láurico como uno de esos componentes.

La técnica usada fue una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, confrontando los espectros de masas con librerías de NIST21, WILEY139 y con el patrón de referencia (C4-C24 Even carbon saturated FAMES Supelco 49453U).

Se realizó una metilación del aceite para la valoración del perfil de ácidos grasos. Los datos reportados son para los compuestos mayoritarios observados en el cromatograma.

Las condiciones instrumentales:

Equipo utilizado: GCMS-QP 5000 Marca SHIMADZU

Columna: MDN-5S 300m, 025mm, ID Marca Supelco.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y aceite de *Cocos nucifera* (coco)

Materiales y Equipo

Micropipeta marca Huawei de 50 μ L y 100 μ L.

Puntas de micropipeta.

Mecheros Bunsen.

Cámara de flujo laminar, marca High Ten, modelo: 4HC-24.

Tubos de ensayo estériles.

Torundas estériles.

Autoclave, marca Tomin Medical Equipment, modelo: TM-322.

Incubadora, marca Binder, modelo: 56.

Reactivos.

Placas de Agar Müller Hilton.

Solución salina 0,9% estéril.

Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Extracto de *Cocos nucifera* obtenido por hexano.

Extracto de *Cocos nucifera* obtenido por diclorometano.

Extracto de *Cocos nucifera* obtenido por acetato de etilo.

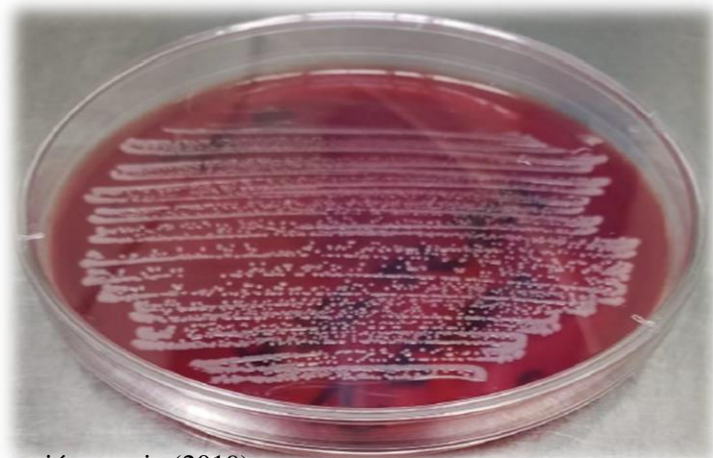
Extracto acuoso del *Cocos nucifera*.

Aceite de *Cocos nucifera*.

Agua estéril.

La cepa de *Staphylococcus aureus* fue facilitada por el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, brindada por el Dr. Carlos Chacón Díaz.

Figura N° 30. Cepa de *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia (2019)

En primera instancia se realizaron las pruebas de microbiología en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas. La metodología empleada es la siguiente:

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la pulpa y aceite de *Coco nucifera* en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas.

1. Se procedió a elaborar la solución salina al 0,9% y se esterilizó por medio de autoclave.

2. Lista la solución, se procedió a encender los mecheros bunsen, para lograr mantener estéril el área, ya que las instalaciones de la Universidad no cuentan con un laboratorio de microbiología equipado.

3. Se realiza una suspensión bacteriana con solución salina estéril, al 0,5 del estándar de McFarland, que equivale a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ML.

4. Se procedió a rallar la placa de agar Müller Hinton con la suspensión bacteriana previamente preparada, la técnica usada fue un barrido en tres direcciones distintas de la placa con el caldo previamente preparado de la bacteria, con la finalidad de cubrir por completo el medio de cultivo con la cepa, y que se diera un crecimiento uniforme. Se realizó por triplicado.

5. La prueba de medición del halo de inhibición se realizó por la técnica de impregnación de discos con los extractos y aceite del *Cocos nucifera* al 100% (se disolvieron en agua y dimetilsulfóxido al 10%) y se colocaron en la placa; el blanco usado fue agua con dimetilsulfóxido al 10%.

6. Se taparon los agares y se colocan en la incubadora a 37 °C, durante 24 horas.

7- Después del tiempo de incubación, se observó el crecimiento de las bacterias en las placas, y se evaluó si los extractos y aceite tuvieron o no efecto antimicrobiano.

Estas pruebas son preliminares a los datos obtenidos por el laboratorio clínico, esto debido a que la universidad no tiene las condiciones de control de cepas, de aire, manejo de residuos, entre otras cosas.

Figura N° 31. Técnica usada en las Instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas



Fuente: Elaboración propia (2019)

En una segunda parte se realizan nuevamente las pruebas microbiológicas, y se realiza la identificación de la bacteria *S. aureus* en el laboratorio de Microbiología de la empresa Chaso del Valle. En los ANEXOS se encuentra el resultado del análisis, que confirma que la bacteria sí es *S. aureus* y la carta de acreditación del laboratorio.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la pulpa y aceite de Cocos nucifera en un laboratorio microbiológico.

1. Se procedió a elaborar la solución salina al 0,9%, y se esterilizó por medio de autoclave.

2. Lista la solución, se procedió a trabajar en la cámara de flujo laminar, para evitar contaminaciones en las muestras.

3. Se realiza una suspensión bacteriana con solución salina estéril, al 0,5 del estándar de McFarland, que equivale a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ML.

4. Se procede a rallar la placa de agar Müller Hinton. La técnica usada fue un barrido en tres direcciones distintas de la placa, con el caldo previamente preparado de la bacteria, con ayuda de un asa estéril, con la finalidad de cubrir por completo el medio de cultivo con la cepa y que se diera un crecimiento uniforme. Se realizó por triplicado.

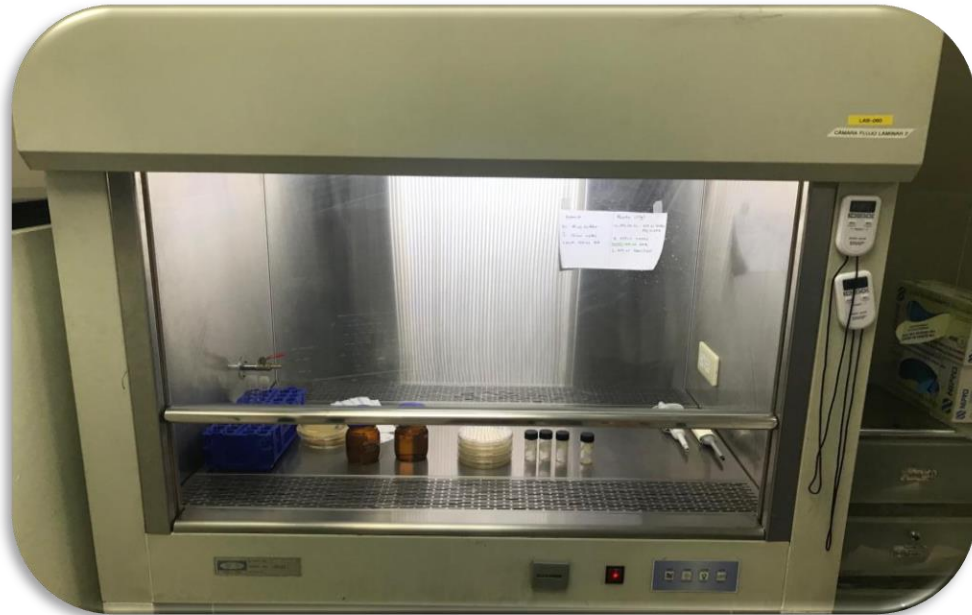
5. La prueba de medición del halo de inhibición se realizó por 2 técnicas, la primera fue por el método de discos, donde se usaron seis discos estériles por placa, y a cada uno se le agregaron 50µL por extracto al 100% (no hubo dilución) y se colocaron en la placa con la bacteria sembrada. El blanco fue agua estéril.

La segunda técnica fue por medio de pozos hechos en el agar con una punta de micropipeta estéril; se hicieron 6 pozos donde en cada uno se le adicionaron 100µL al 100% (no hubo dilución) de cada uno de los extractos y aceite de *Cocos nucifera*. El blanco fue agua estéril.

6. Se taparon los agares y se colocaron en la incubadora a 37 °C, durante 24 horas.

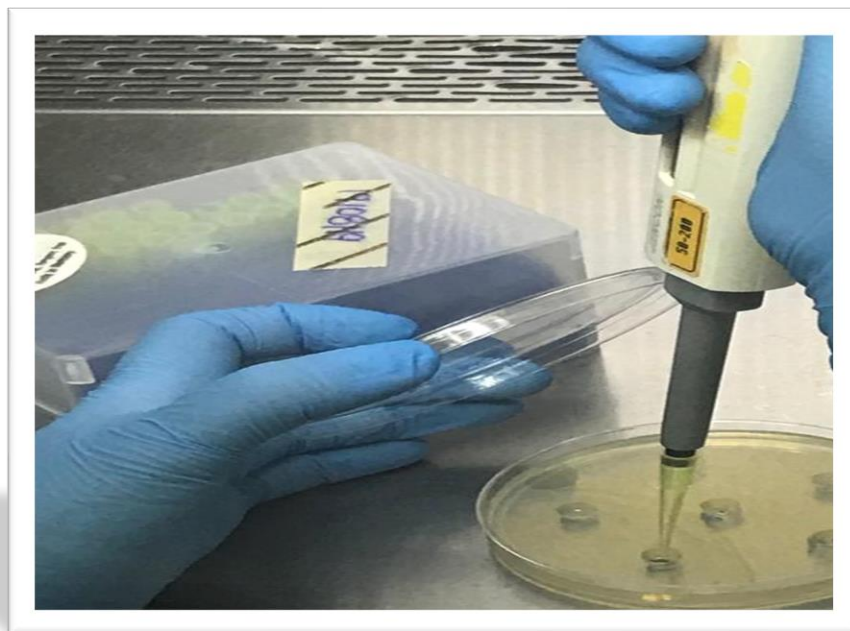
7- Después del tiempo de incubación, se observó el crecimiento de las bacterias en las placas, y se evaluó si los extractos y aceite tuvieron o no efecto antimicrobiano.

Figura N° 32. Cámara de flujo laminar



Fuente: Elaboración propia (2019)

Figura N° 33. Proceso de adición de los extractos de *Cocos nucifera* a la placa inoculada con *S. aureus*



Fuente: Elaboración propia (2019).

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En este capítulo se van a reportar los datos obtenidos, que dan seguimiento y valor a los objetivos de la presente investigación. La discusión de estos resultados pretende dar respuesta al planteamiento del problema expuesto, con la finalidad de evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Cocos nucifera* (coco).

Fraccionamiento de la pulpa y extracción del aceite de *Cocos nucifera*

Una vez obtenido los frutos del *Cocos nucifera* (coco) se procedió a extraer la pulpa; luego se le removió la cáscara y se ralló, como se observa en la figura N° 33.

Al tener la pulpa finamente rallada, se logra una mejor superficie de contacto con el disolvente (hexano o etanol), para obtener una mejor maceración y extracción de los componentes de los metabolitos secundarios presente en la pulpa.

Figura N° 34. Ralladura de la pulpa de *Cocos nucifera*



Fuente: Elaboración propia (2019)

Los disolventes usados para esta extracción son los más adecuados para obtener los metabolitos secundarios presentes en la pulpa; esto lo confirma Figueroa (2013) en su tesis experimental, concluyendo que el uso de un disolvente como el hexano es el que proporciona un mejor rendimiento para la extracción de la fracción lipídica (compuestos no polares); el disolvente atrae estos compuestos por medio de las fuerzas intermoleculares, al generar una atracción de las fuerzas hidrófobas de los ácidos grasos presentes en la pulpa.

Por su parte, utilizar un disolvente etanoico, según el mismo autor, permite una buena extracción de los compuestos menos polares y polares presentes en la pulpa del *Cocos nucifera*, basándose en el mismo principio de las fuerzas intermoleculares, nada más que esta vez son por atracción dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno.

Posterior al tiempo de maceración, se logró determinar el porcentaje de extracción para cada una de las muestras; en la tabla N° 7 se evidencia la del extracto de aceite y en la tabla 2 el del extracto acuoso.

Tabla N° 7. Determinación del porcentaje de extracción obtenido luego del proceso de maceración de la pulpa del *Cocos nucifera* en hexano, utilizando una balanza analítica para medir las masas

Extracción	Cantidad inicial (g)	Cantidad final de extracto (g)	% Extracción
Pulpa de <i>Coco nucifera</i> en hexano	250, 0232	70,1872	28, 0722

Fuente: Elaboración propia (2019).

Como se ve, en la tabla anterior el porcentaje de extracción obtenido de la pulpa del *Cocos nucifera* en hexano es de un 28,0722%, siendo un porcentaje de extracción aceptable

del aceite, corroborando, así, que este disolvente puede extraer la fracción lipídica de esta planta.

Para el cálculo de este porcentaje de extracción se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ extracción} = \frac{\text{peso final del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la pulpa en hexano (g)}} * 100$$

Figura N° 35. Muestra del aceite de la pulpa del *Cocos nucifera* (coco)



Fuente: Elaboración propia (2019)

Tabla N° 8. Obtención de la masa del extracto acuoso de la pulpa del *Cocos nucifera*

Extracto	Muestra	Masa de viales vacío con tapa (g)	Masa de viales + sólido obtenido con tapa (g)	Masa de sólido obtenido	Promedio de la masa del sólido (g)
Acuoso	1	11,4141	11,4752	0,0611	0,0602
	2	11,4178	11,3596	0,0582	
	3	11,3712	11,4324	0,0612	

Total, de mL del extracto acuoso obtenido: 200 mL

Gramos obtenidos del extracto acuoso: 6,0200g

Fuente: Elaboración propia (2019).

El extracto acuoso es una mezcla de los componentes de la pulpa del *Cocos nucifera* más agua, por lo cual no se puede sacar un porcentaje de extracción igual que para el extracto en hexano (aceite). Como se observa en la tabla anterior, la masa promedio de 3 muestras del extracto es de 0,0602 g; es decir, que la relación de masa sería 0,0602 g por cada 2 mL de extracto, lo que equivale a 6 g de masa en los 200 mL del extracto acuoso, dando una concentración masa/volumen de 3% m/v.

La fórmula para obtener la concentración m/v del extracto acuoso es la siguiente:

$$\% \frac{m}{v} = \frac{\text{masa obtenida del extracto (g)}}{100 \text{ mL del extracto}} * 100$$

Una vez obtenido el extracto acuoso de la pulpa del *Cocos nucifera*, se le realizó un fraccionamiento, utilizando los disolventes de hexano, diclorometano y acetato de etilo. En la siguiente tabla se observa la masa (g) obtenida para cada extracto.

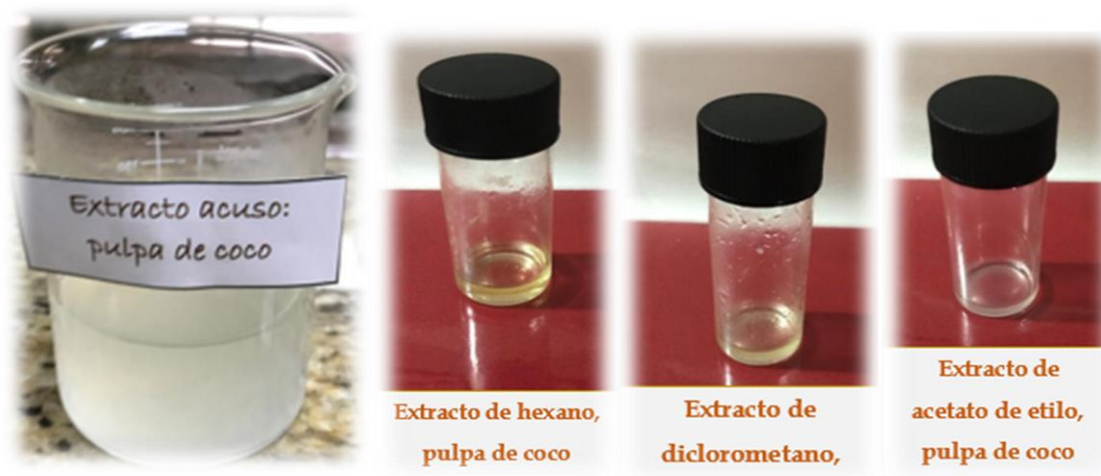
Tabla N° 9. Masas obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso obtenido de la pulpa del *Cocos nucifera* por medio de los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo

Extracto	Masa obtenida (g)
De Hexano	1,5246
De Diclorometano	0,9875
De Acetato de etilo	0,8864
Acuoso	2,1535

Fuente: Elaboración propia (2019)

Como se observa en la tabla anterior, de los disolventes usados para el fraccionamiento de la pulpa, el de hexano obtuvo una mayor masa de 1,5246 g, esto indica que en el extracto acuoso también existen, en mayor cantidad, compuestos no polares. Esto concuerda con lo que describe Torres (2017, p.10): que la pulpa del *Cocos nucifera* tiene un alto porcentaje de ácidos grasos, que son sustancias no polares en su mayoría. Como se ve en la figura N° 36, los tres extractos obtenidos por los disolventes tienen una consistencia aceitosa, que puede indicar lo mismo que describe el autor mencionado anteriormente.

Figura N° 36. Extractos obtenidos del fraccionamiento de la pulpa *Cocos nucifera* (coco)



Fuente: Elaboración propia (2019)

Tamizaje fitoquímico para la identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en la pulpa de *Cocos nucifera*

Se realizan las pruebas al extracto acuoso obtenido de la pulpa de *Cocos nucifera*, con el fin de determinar si cuenta con la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, antraquinonas, taninos, terpenos, almidón, saponinas y azúcares reductores. El procedimiento usado es el mismo descrito en la metodología.

Para un mejor resultado, el extracto acuoso se fraccionó, y se obtuvieron los siguientes extractos: un extracto etéreo (E) y extracto acuoso (AQ1); del AQ1 se obtuvieron otro extracto etéreo (AQ2E) y otro extracto acuoso (AQ2A). En la figura N° 37 se observa el color de cada extracto previo a la realización de las pruebas.

Figura N° 37. Extractos obtenidos de la pulpa del *Cocos nucifera*, para determinar la presencia de metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico



Fuente: Elaboración propia (2019).

En la tabla N° 10 se muestran los resultados generales del tamizaje fitoquímico, para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos a partir del extracto acuoso de la pulpa del *Cocos nucifera*.

Tabla N° 10. Determinación de la presencia de metabolitos secundarios mediante un tamizaje fitoquímico de la pulpa del *Cocos nucifera*

Prueba	Metabolito a identificar	Lectura positiva	Extracto	Observaciones al final de la prueba	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado anaranjado	Etéreo (E)	Precipitado anaranjado	+
			AQ2E	Color anaranjado, sin precipitado.	-
			AQ1	Color anaranjado, sin precipitado.	-
Shinoda	Flavonoides	rojo oscuro/ rosado claro	Etéreo (E)	Color gris.	-
			AQ2E	Transparente.	-
KOH	Cumarinas	Coloración verde alrededor	Etéreo (E)	Verde alrededor.	+++
			AQ2E	Verde alrededor.	+
Liberman Burchard	Triterpenos y Esteroles	Rojo marrón/ verde esmeralda	Etéreo (E)	Verde esmeralda.	+++
			AQ2E	Amarillo muy claro (hueso).	-
Borntrager-Kraus	Antraquinonas	Rojo oscuro	Etéreo (E)	Sin cambio.	-
			AQ2E	Sin cambio.	-
			AQ2A	Sin cambio.	-
Taninos	Taninos	Color azul o verde	Etéreo (E)	Verde oscuro.	+++
			AQ1	Se torna en un color amarillo.	-
Cromatografía capa fina	Terpenos	Manchas verdes, azules o moradas	Etéreo (E)	Mancha morada.	+++
Lugol	Almidón	Azul	AQ1	Rojo oscuro.	-
Espuma	Saponinas	Espuma	AQ1	Sin espuma.	-
Benedict	Azúcares reductores	Precipitado rojo ladrillo	AQ1	Precipitado rojo ladrillo.	++

Presencia fuerte (+ + +), presencia moderada (+ +), presencia débil o trazas (+) y ausencia del metabolito (-).

Fuente: Elaboración propia (2019).

Como se puede apreciar en la tabla anterior, de las 10 pruebas en que consiste el tamizaje fitoquímico, solamente en 6 se obtuvo un resultado positivo; los metabolitos secundarios que están presentes en la pulpa del *Cocos nucifera* son los alcaloides, cumarinas, terpenos, triterpenos y esteroides, taninos y azúcares reductores.

De los extractos usados en este tamizaje, el etéreo fue el que dio más resultados positivos; esto indica que los compuestos que presentan estos metabolitos secundarios en la pulpa del *Cocos nucifera* son no polares, ya que el éter, al ser un disolvente polar, atrae estos compuestos al extracto.

Si se comparan estos resultados con el tamizaje fitoquímico elaborado por los autores Villalta y Benítez. (2009, p.10), hay concordancia en cuanto a los taninos, terpenos, triterpenos y esteroides que dieron positivos en esta investigación.

En la tabla N° 11 se resumen cuáles grupos de metabolitos secundarios están presentes en la pulpa del *Cocos nucifera*, como resultado del tamizaje fitoquímico.

Tabla N° 11. Metabolitos secundarios presentes detectados por el tamizaje fitoquímico en la pulpa del *Cocos nucifera*

<i>Pulpa del Cocos nucifera</i>	Metabolitos Secundarios presentes
	Alcaloides (E)
	Cumarinas (E-AQ2E)
	Terpenos (E)
	Triterpenos y esteroides (E)
	Taninos (E)
	Azúcares reductores (AQ1)

Fuente: Elaboración propia (2019)

En las siguientes figuras se van a mostrar los resultados positivos de este tamizaje:

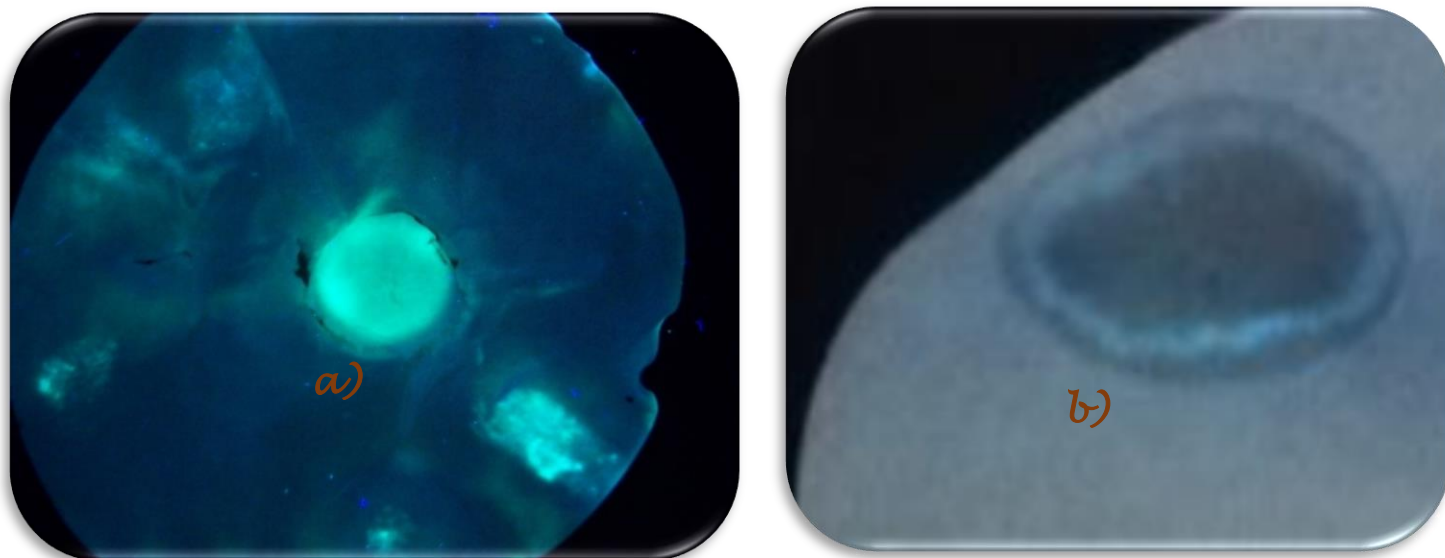
Figura N° 38. Resultado positivo de la prueba de alcaloides del extracto etéreo



Fuente: Elaboración propia (2019).

Según Palacios (2013. p.35), la formación de un precipitado anaranjado es indicativo de la presencia de este metabolito secundario, y como se ve en la imagen anterior, se formó un pequeño precipitado, indicando, así, el resultado positivo de este metabolito secundario en la pulpa del *Cocos nucifera*.

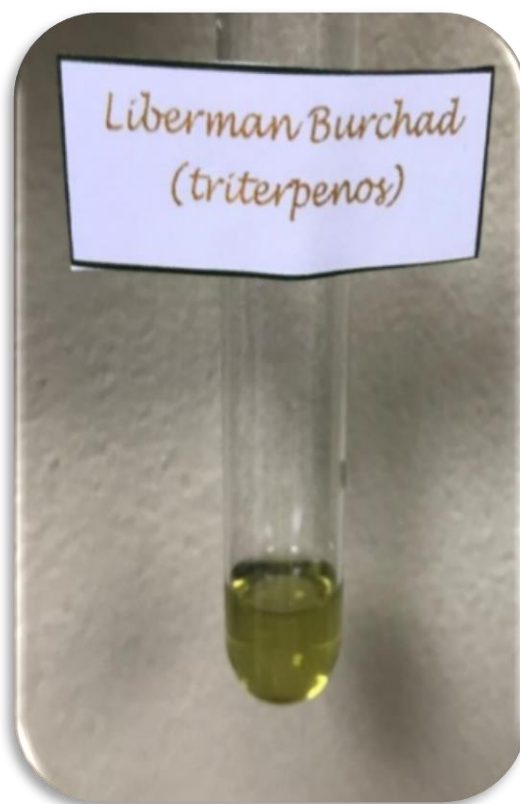
Figura N° 39. Determinación de la identificación de cumarinas para el extracto etéreo (a) y extracto AQ2E (b)



Fuente: Elaboración propia (2019)

El segundo metabolito en dar positivo fue el de las cumarinas. Según Carvajal et al. (2009. p.166), una tonalidad verde alrededor es indicativo de una prueba positiva. Como se observa en la imagen, el extracto etéreo es el que presentó mayor cantidad de la tonalidad verde alrededor, por lo que se considera mayor presencia de este metabolito, pero el AQ2E también presentó una tonalidad verde menos intensa, pero, de igual manera, se considera positivo.

Figura N° 40. Prueba para identificación de triterpenos y esteroides en el extracto etéreo (a)



Fuente: Elaboración propia (2019)

Según Ochoa y Sarmiento (2018, pp.20-21), el color verde esmeralda es un indicativo de la presencia de este metabolito. Como se observa en la imagen, el extracto etéreo viró a un color verde esmeralda, confirmando un resultado positivo.

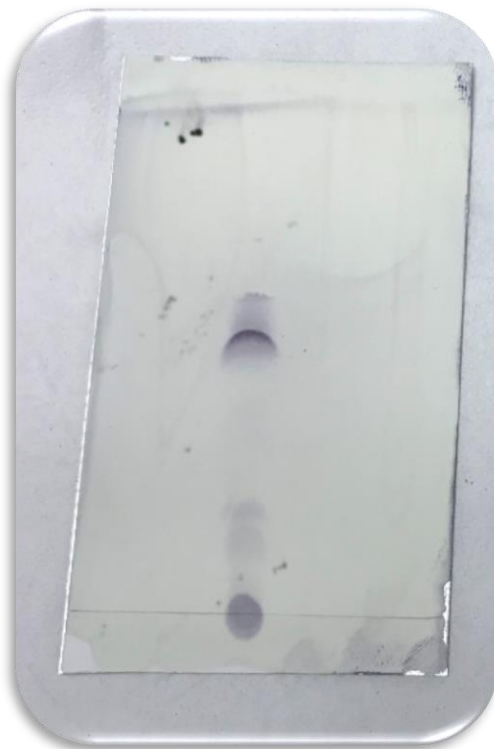
Figura N° 41. Determinación de la presencia de taninos en el extracto AQ1



Fuente: Elaboración propia (2019)

El extracto positivo en este metabolito resultó ser el AQ1, al cambiar a un color verde. Como se ve en la figura anterior, el cambio a color verde significa, según Ochoa y Sarmiento (2018. p.44), la presencia de taninos condensados, que son un tipo de flavonoide presente en la planta, que cumple funciones de defensa en la planta.

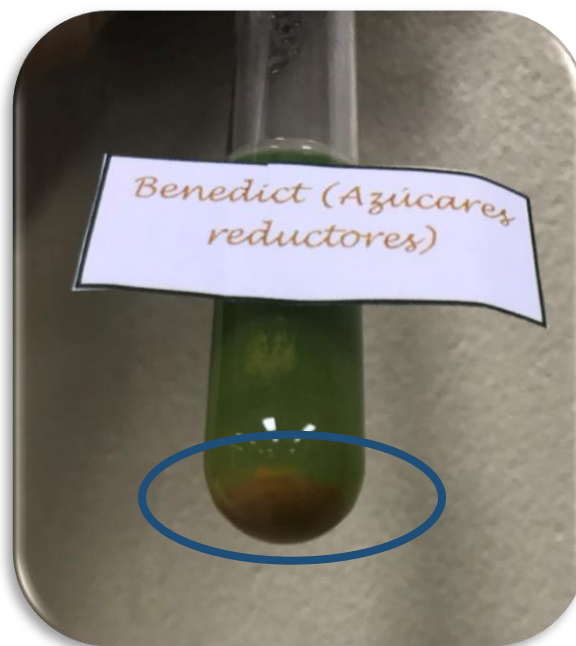
Figura N° 42. Identificación de Terpenos en el extracto etéreo por medio de cromatografía de capa fina y revelado reactivo de Vainillina



Fuente: Elaboración propia (2019)

Como se ve en la figura anterior, el resultado de terpenos fue positivo. Una vez que se reveló con el reactivo de vainillina y se quemó en el calentador, se observaron las tonalidades moradas, indicativo, según Carvajal et al. (2009. p.164), de terpenos en la muestra.

Figura N° 43. Identificación de azúcares reductores en el extracto AQ1



Fuente: Elaboración propia (2019)

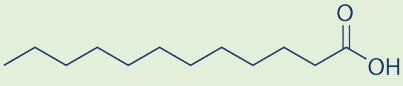
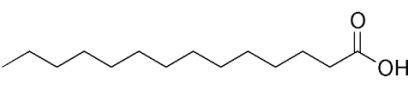
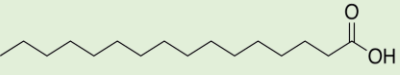
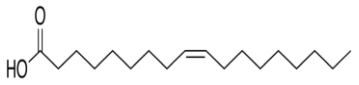
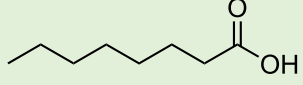
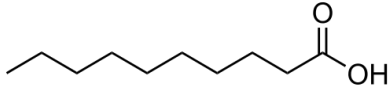
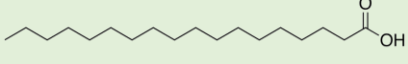
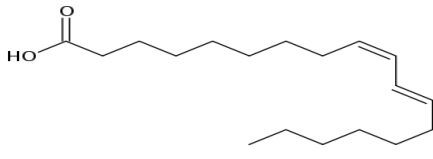
Como se ve en la figura anterior, la formación de un precipitado rojo ladrillo, según Huertas (2016. p.35), es indicativo de la presencia de este metabolito secundario en la muestra, confirmando el resultado positivo de esta prueba.

Determinación de composición del aceite de *Cocos nucifera* por cromatografía de gases acoplado a masas

Para confirmar la composición de los ácidos grasos que se encuentran en el extracto de aceite de la pulpa del *Cocos nucifera* se realizó un análisis, mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de masas. Como mencionan Gutiérrez y Droguet (2002), es una de las técnicas más utilizadas en la identificación de compuestos, debido a que permite

separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas. (pp.35-37)

Tabla N° 12. Componentes Presentes en el extracto de Aceite de la pulpa del *Cocos nucifera*

Compuesto	Estructura	% de Área
Ácido Láurico (ácido dodecanoico)		38.48
Ácido Mirístico (ácido tetradecanoico)		22.60
Ácido Palmítico (ácido hexadecanoico)		12.60
Ácido Oleico (ácido 9-octadecanoico)		7.71
Ácido Caprílico (ácido octanoico)		5.72
Ácido Cáprico (ácido decanoico)		5.33
Ácido Esteárico (ácido octadecanoico)		5.00
Ácido Linoleico (ácido 9,12 octadecadienoico)		1.43

Fuente: Elaboración propia (2019)

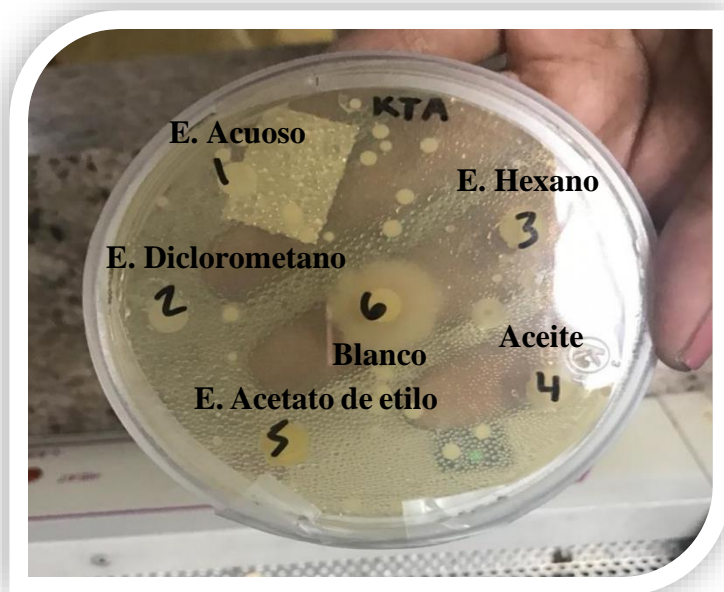
Como se observa en la tabla anterior, con base en los datos obtenidos del cromatograma, se identificaron tres componentes mayoritarios en el aceite. El principal fue el ácido láurico, que representa un 38,48% de la muestra inyectada, seguido del ácido mirístico con un 22,60% y el ácido del ácido palmítico con el 12,60%; estos datos concuerdan con los componentes reportados por Torres (2017. p.11). Es importante indicar que en la muestra existen otros componentes a concentraciones menores.

El ácido láurico es el compuesto de mayor presencia en el análisis cromatográfico de la muestra, arrojando una probabilidad de coincidencia del 38,48%, y según Solano (2017. P.60), este es el compuesto que puede darle la actividad antimicrobiana para bacterias, hongos y algunos parásitos al aceite de la pulpa del *Cocos nucifera*.

Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de la pulpa y aceite de *Cocos nucifera*

Para esta etapa de la investigación se realizaron dos análisis microbiológicos en lugares diferentes, el primero fue en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas. Los extractos y el aceite se trabajaron al 100%, y las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C. El resultado se muestra en la figura N° 44.

Figura N° 44. Resultado de la Prueba de antimicrobiana sobre *S. aureus* de los extractos y aceite de *Cocos nucifera* en la UIA



Fuente: Elaboración propia (2019)

Como se ve en la figura N° 44, no hubo halo de inhibición, pero sí se dio una contaminación en el agar; esto puede ser a raíz de no trabajar tan cerca de las lámparas de alcohol que se utilizaban como medio para esterilizar el ambiente, lo que vemos en la foto pueden ser hongos y levaduras del ambiente, por esta razón se procedió a buscar una opción de un laboratorio microbiológico con ambiente controlado, y se volvió a realizar el fraccionamiento de la pulpa del *Cocos nucifera* como una medida preventiva, por posibles contaminaciones que hubiera sufrido y no interfirieran en los próximos resultados.

Se repitieron las pruebas microbiológicas en el laboratorio de la empresa Chaso del Valle, utilizando los nuevos extractos preparados, por medio de 2 tipos de técnicas diferentes, y las concentraciones fueron iguales al 100%. Estas pruebas se llevaron a cabo usando una cámara de flujo laminar, que proporcionó aire limpio, debido al flujo vertical que esta

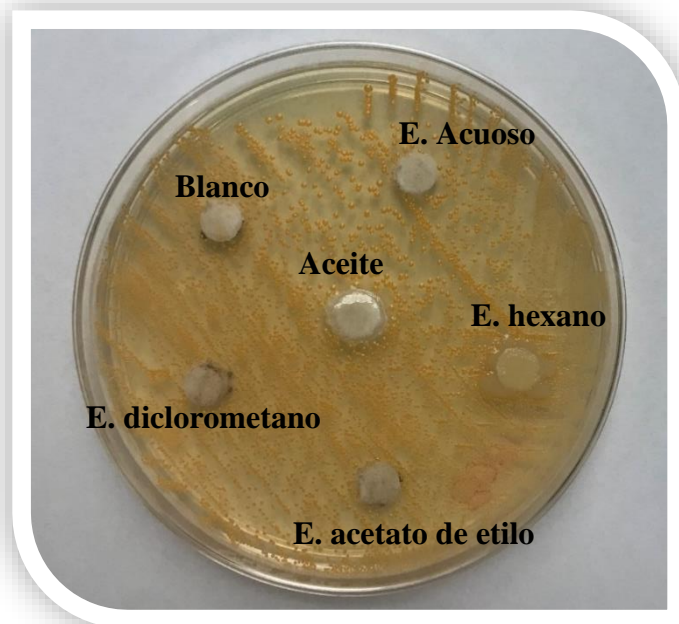
introduce, y así se evitan posibles contaminaciones, tanto para el proceso que se está ejecutando como para el exterior.

A continuación, se exponen los resultados obtenidos en cada uno.

Método de discos

Para este método se usaron discos de papel filtro estériles, y se les agregaron 50µL de cada uno de los extractos y aceite de la pulpa del *Cocos nucifera* al 100%. Las placas se inocularon por 24 horas a 37 °C, y los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

Figura N° 45. Resultado de la Prueba de antimicrobiana sobre *S. aureus* de los extractos y aceite de *Cocos nucifera* por el método de discos



Fuente: Elaboración propia (2019)

Como se observa en la figura, no se determinaron halos de inhibición para ninguno de los extractos ni del aceite, indicando que por este método la bacteria *S aureus* no presenta sensibilidad a ninguno de los extractos, ni del aceite de la pulpa del *Cocos nucifera*. Por el

resultado obtenido, se decide no realizarle diluciones de los extractos ni del aceite, para seguir probándolos por este método.

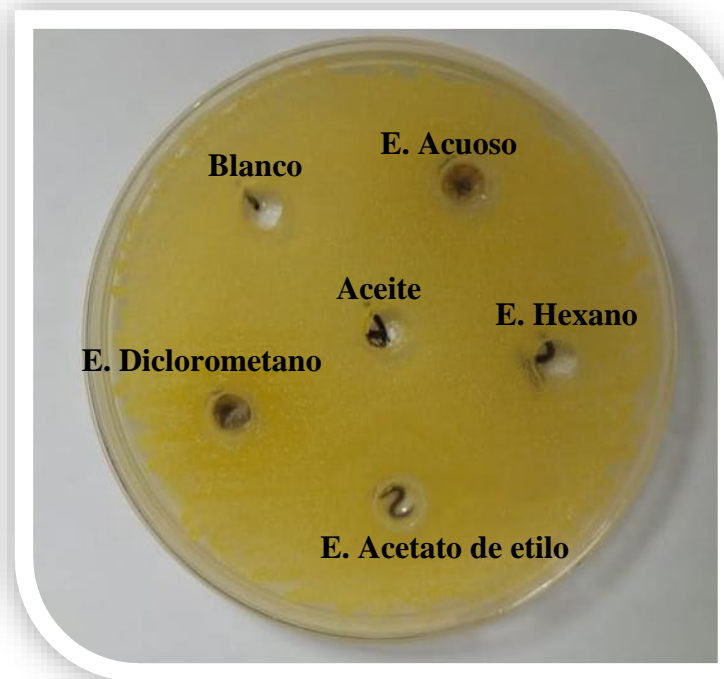
Método de pocillo

Ese método se probó con el fin de agregar más volumen de los extractos y del aceite a la placa, considerando que con un mayor volumen y la concentración al 100%, se podría obtener un mejor resultado.

Se adicionaron 100 μ L de cada uno de los extractos y del aceite a cada pocillo; se incubaron 24 horas a 37 °C.

Pasado el tiempo de incubación, se observa el comportamiento de los extractos y del aceite sobre la bacteria, como se muestra en la figura N° 46.

Figura N° 46. Resultado de la prueba antimicrobiana sobre *S. aureus* de los extractos y aceite de *Cocos nucifera* por el método de pocillo



Fuente: Elaboración propia (2019)

Como se observa en esta figura, tampoco se terminaron halos de inhibición para ninguno de los extractos ni el aceite, indicando que a un volumen mayor de los extractos y del aceite el *S aureus* no presenta sensibilidad. Por el resultado obtenido, se decide no realizarle diluciones de los extractos ni del aceite para seguir probándolos.

En la tabla N° 13 se ve un resumen de los resultados obtenidos de las pruebas microbiológicas por ambos métodos.

Tabla N° 13. Resultados de las pruebas microbiológicas de los extractos y aceite de la pulpa del *Cocos nucifera* por ambos métodos

Extracto al 100%	Halo de inhibición (método discos)	Halo de inhibición (método pocillo)
Acuoso	0mm	0mm
De Hexano	0mm	0mm
De Diclorometano	0mm	0mm
De Acetato de etilo	0mm	0mm
Aceite	0mm	0mm

Fuente: Elaboración propia (2019).

Con las pruebas realizadas, queda en evidencia que los extractos y el aceite de la pulpa del *Cocos nucifera*, extraídos mediante disolventes, no son capaces de producir un efecto antimicrobiano frente a *S. aureus*.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Al usar los disolventes de Hexano y Etanol al 70%, para efectuar las extracciones de los componentes presentes en la pulpa del *Cocos nucifera*, se obtuvo la fracción acuosa de la pulpa por el etanol al 70% y la fracción lipídica por el hexano.

Todos los extractos obtenidos después del fraccionamiento tienen una consistencia aceitosa, que va disminuyendo, siendo el de acetato de etilo el menos aceitoso.

Al emplear las pruebas de tamizaje fitoquímico en la pulpa del *Cocos nucifera* se comprueba la presencia de metabolitos como alcaloides, cumarinas, terpenos, triterpenos y esteroides, taninos y azúcares reductores.

De las pruebas positivas obtenidas en el tamizaje fitoquímico, los metabolitos secundarios que presentan fuerte presencia en la pulpa del *Cocos nucifera* son las cumarinas, los terpenos, taninos, triterpenos y esteroides.

En las pruebas del tamizaje fitoquímico, el extracto etéreo fue el que presentó casi todos los resultados positivos, lo que da a entender que estos componentes tienen un carácter poco polar, justificando que el extracto de hexano fue el que obtuvo más masa con respecto a los demás disolventes.

El resultado del análisis de cromatografía de gases acoplado a masas realizado al extracto en hexano indica que el contenido de ese aceite es de ácidos grasos saturados e insaturados, coincidiendo con los descritos en la literatura para esta planta.

El componente mayoritario presente en el aceite de *Cocos nucifera* es el ácido láurico, ya que representa un 38,48% de la muestra inyectada; en eso se coincide, de igual manera, con lo descrito en la literatura para esta planta.

Los halos de inhibición obtenidos contra el *Staphylococcus aureus*, con los extractos y el aceite de la pulpa del *Cocos nucifera*, evidencia que no existe actividad antibacteriana contra este microorganismo, por lo que se clasifica la hipótesis de la investigación como nula.

Recomendaciones

Utilizar otros tipos de microorganismos como hongos, parásitos o alguna otra bacteria para comprobar la sensibilidad de la pulpa de *Cocos nucifera* frente a estos.

Realizar este mismo estudio con otras partes de la planta del *Cocos nucifera*, como las hojas, flores, cascaras, elaboración de hidrosoles, a partir de los extractos o la combinación de la pulpa con otra parte de la planta.

Estudiar otras propiedades reportadas en la pulpa del *Cocos nucifera*; por ejemplo, antiinflamatoria, antioxidantes, antihipertensivas.

A la Universidad, dotar al laboratorio de Química con equipos más modernos que se adecuen a las necesidades de los tesisistas, además de adquirir equipos que ayuden a realizar las pruebas en la misma institución, como lo sería una cromatografía de gases acoplado a masas, ya que es necesario que los estudiantes tengan acceso y conozcan los equipos con los que se enfrentarán en su desarrollo profesional.

De la misma manera, que puedan contar con un laboratorio microbiológico, que esté bien equipado de autoclaves, incubadoras, cámara de flujo laminar, ambiente controlado, con bacterias, hongos y parásitos, con el fin de poder tener acceso y realizar las pruebas microbiológicas en las instalaciones de la Universidad.

Por último, que fomente los trabajos de investigación con equipos interdisciplinarios, químicos, microbiológicos, farmacéuticos, con el propósito de tener tesis más robustas y con un mayor alcance.

REFERENCIAS

- Águila, A. (2016). Antibiograma, ¿qué es? y ¿cómo interpretarlo? Facultad de Medicina. Universidad de Panamá. Recuperado de <http://www.telmeds.org/wp-content/uploads/2016/11/Antibiograma.pdf>
- Aguilar, A., Del Toro, C., Guerrero, P., Gutiérrez, M., Madrigal, J., Rodríguez, F., Morales, J. y Robles, M. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de Tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Vol. 3, pp. 1-8
- Akinpelu, D; Alayande, K., Aiyegoro, O., Akinpelu, O. y Okoh, A. (abril, 2015). Probable mechanisms of biocidal action of Cocos nucifera Husk extract and fractions on bacteria isolates. BMC Complementary and Alternative Medicine. Recuperado de: <https://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-015-0634-3>.
- Alarcón, C., Arias, J., Álvarez, L., Azanza, J., Barberán, J., Candel, J., Fortún, J., García, J., Grau, S., Gómez, J, Llinares, P., Maseda, E., Mensa, J., Montejo, M., Moreno, A., Parra, J., Pasquau, J., Salavert, M. y Soriano, A. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Departamento de enfermedades infecciosas, Hospital Clínica de Barcelona. Revista Española de Quimioterapia, Vol.34: pp. 2-45.
- Alcolea, R. (25 de octubre de 2018). Qué es el impétigo, cómo se contagia y tratamiento. ABC Familia Sana. Recuperado de: https://www.abc.es/familia/vida-sana/abci-que-es-impetigo-contagio-tratamiento-201810241410_noticia.html
- Álvarez, E. y Orallo, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Revista Elsevier. Vol. 22, pp. 130-140.
- Andrade, L. (2019). Efectividad de inhibición de la fusión entre aceite de *Cocos nucifera* (coco) y aceite de manzanilla sobre *Porphyromona gingivalis*. Estudio in vitro. Proyecto de Graduación para el grado de Licenciatura en Odontología. Universidad Central del Ecuador.

- Ávalos, A. (3 de mayo de 2015). Bacterias infectan a 5.000 al año en hospitales de CCSS. La Nación. Recuperado de: <https://www.nacion.com/el-pais/salud/bacterias-infectan-a-5-000-al-ano-en-hospitales-de-ccss/K7JKHOHI2JD2FMVXJDZ3NKK4EI/story/>
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolitos secundarios. Fisiología vegetal. Revista Reduca (biología). Vol.2. pp. 119-145.
- Báez, M., Carrizo, D., Díaz, A., Gruszycki, A., Gruszycki, K., Lilián, A., Pérez, T. y Rosalía, M. (marzo, 2017). Importancia de la farmacovigilancia en medicina herbaria. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Argentina. 22. (1), pp. 1-10. Recuperado de <http://scielo.sld.cu>.
- Batra, S. (2017) *Staphylococcus aureus*. Morfología, clasificación, cultura, identificación, toxinas y diagnóstico de laboratorio. Revista online Paramedics World. Recuperado de: <https://paramedicsworld.com/systematic-bacteriology/staphylococcus-aureus/medical-paramedical-studynotes#.XVNNZ-gzbIU>
- Beltrán, M., Cantillo, M. y Vivas, A. (julio, 2013). Revista de Investigaciones Andina. Vol. 15: 27, pp. 789-810.
- Boza, M. (2017). Eficacia antifúngica in vitro de una crema elaborada con aceites esenciales de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y coco (*Cocos nucifera*) frente al hongo *Cándida albicans* y comparación de su efectividad con Clotrimazol. Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Calderón, G. y Aguilar, L. (2016). Resistencia Antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII, pp. 757-763. Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>
- Calle, A., León, I., Tarranco, M., Grados, S. y Soto, M. (2017). Tamizaje y screening fitoquímico. Facultad de Farmacia y Bioquímica: Farmacognosia. Universidad Internacional para el Desarrollo. Recuperado de: https://www.academia.edu/25502053/TAMIZAJE_FITOQUIMICO.

- Camarena, J. y Sánchez, R. (2010). Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Revista Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 25, pp. 75-80.
- Cárdenas, M., Cruz, O., Gándara, J. y Pérez, A. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. Elementos Vol.94. pp. 35-43.
- Carroll, K., Morse, S., Mietzner, T. y Miller, S. (2016). Microbiología médica. Sección 13 *Estafilococos*. Editorial McGraw-Hill Medical. 27° edición.
- Casado, C., Torrico, G. y Medina, M. (2012). Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología. Recuperado de: <https://libros.laboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Castañón, C. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Revista Evidencia Medica e Investigación en Salud. Vol.5: 3. pp.79-84
- Castro, H. y Valverde M. (2015). Sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de enjuagues bucodentales a partir de aguacate (*Persea americana*) y coco (*Cocos nucifera*). Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Odontología. Universidad de Costa Rica.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N. y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá. Revista Colombiana Forestal. Volumen 13, pp. 164-167.
- Cea, R. (2014). Fitofármacos. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Argentina. Revista Química y Farmacia. Vol. 6, pp. 10-15.
- Cervantes, E., García, F. y Salazar, P. (2014), Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica. Medigraphic.org. Vol. 61 (1), pp. 28-40.
- Chan, M. (2012). Uso racional de antibióticos. The burden of disease and the changing task of Medicine. Jones DS, Podolsky SH, Greene JA. N Eng. J. Vol.366, pp. 2333-2338.
- Escalante, A. (2015). Determinación de la Sensibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Cocos nucifera*. Proyecto

final para optar por la Licenciatura en Microbiología. Universidad de Trujillo. Perú.
Recuperado de: [http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4540/](http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4540/Escalante%20Pereda%2c%20Marylin%20Andrea.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
[Escalante% 20Pereda% 2c% 20Marylin% 20Andrea.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4540/Escalante%20Pereda%2c%20Marylin%20Andrea.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Fariña, N. (abril, 2016). Bacterial resistance. A global public health problem with difficult solution. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Revista Scielo. Vol. 14 (1): pp.6-7

Figueroa, E. (2013). Evaluación del rendimiento y caracterización fisicoquímica de la extracción de la fracción lipídica de la copra del coco (*Cocos nucifera*) variedad verde utilizando tres solventes a escala laboratorio. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Guatemala.

González, A. (2004). Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas del Amazonas. Trabajo de Graduación para optar por la Licenciatura en ingeniería Química. Universidad Nacional Sede Bogotá. Colombia

Guevara L. y Jaúregui, D. (2008). Anatomía floral de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae, Arecoideae). Acta Botánica de Venezuela. Vol. 31(1), pp. 35-48.

Gutiérrez, M. y Droguet, M. (2002). La Cromatografía de Gases y la Espectrometría de Masas: Identificación de Compuestos Causantes de Mal Olor. Boletín Intexter (U.P.C.) N°122, pp. 35-41.

Guzmán, J. y Rivera, M. (2013). Conocimientos, Actitudes y Prácticas del uso de Fitofármacos por usuarios del Instituto de Estudios Superiores de Medicina Oriental (IESMO), Managua, en el mes de noviembre del año 2013. Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua.

Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). Metodología de la investigación. México. 6ta Edición. Editorial McGraw-Hill.

Huertas, T. (2016). Unidad didáctica para la identificación cualitativa experimental de Carbohidratos; una estrategia de aula para la construcción de loncheras saludables. Tesis para optar por el grado de máster en enseñanza de las ciencias naturales. Universidad Nacional de Colombia.

- Jano.es. (17 de noviembre de 2016). La investigación en nuevos antibióticos, clave para luchar contra las súper bacterias. Recuperado de <http://www.jano.es/noticia-la-investigacion-nuevosantibioticos-clave-26974>
- Jawetz, Melnick y Adelberg. (2010). Microbiología Médica. China, 25ª Edición, McGraw Hill.
- Konno, H; Miura, M; Nonomura, Y; Takamasa, W; Yamamoto, Y, e Yano, S. (febrero, 2019). Systematic Analysis of selective bactericidal activity of fatty acids against *Staphylococcus aureus* with minimum Inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. Vol. 68: (3): 291-296 Journal of Oleo Science. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30760667>
- Lacueva, M. (2017). Resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Evolución y perspectiva actual. Trabajo Final para optar por el título de Licenciado en Farmacia. Universidad Complutense. España.
- Lima, E., Lima, N., Macedo, D., Meneses, L., Patrocinio, M., Santos, A., Sousa, C., Vasconcelos, G., Vasconcelos, S. y Ximénez, N. (noviembre, 2015). Cocos nucifera (L.) (Arecaceae): A phytochemical and pharmacological review. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol. 48 (11): 953–964. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26292222>
- Lizano, D. (2015). Generalidades de las bacterias. Universidad de Costa Rica. Recuperado de: <http://medicina-ucr.com/tercero/wp-content/uploads/2015/02/EI7.-Generalidades-de-Bacterias-1.a.docx>
- Lopardo, H. (2016). Introducción a la microbiología clínica. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, p. 271. Recuperado de [file:///C:/Users/kta08/Downloads/524-3-1728-1-10-20160427%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/kta08/Downloads/524-3-1728-1-10-20160427%20(1).pdf)
- López, T. (2004). Los aceites esenciales. Revista Elsevier. Vol. 23, pp. 88-91.
- Lozano, C., Gómez, E., Benito, D., Aspiroz, C., Zarazaga, M. y Torres, C. (2011). *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. Revista Internacional Medicina y Microbiología. Tomado de la Revista Elsevier. Vol. 301, pp. 500-505.

- Luján, M. (2017). Unidad 2. Métodos de Separación. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Recuperado de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2017/03/COMPL-TEORICO-UNIDAD-2-M%C3%A9todos-de-Separaci%C3%B3n-2017-FARGNOSI-FCN-UNPSJB.pdf>
- Marks, R. y Motley, R. (2012). Dermatología. Recuperado de: https://books.google.co.cr/books?id=eM_KCQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=snippet&q=45&f=false
- Martínez, A., Montes de Oca, M. y Alemañy, J. (abril, 2017). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. Medisur. Revista en Internet. Vol:15:2. Recuperado de <http://www.medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/3321/2297>
- Miño, G. (2007). Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género *Baccharis*. Trabajo de graduación para optar por el grado de licenciatura en Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/1226>
- Mollinedo, P. y González, C. (2014) Bacterias gram negativas. Revista Boliviana. 49, pp. 2609-2613 Recuperado de http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a05.pdf
- Naranjo, S. (2014). Evaluación del efecto de la microfiltración tangencial sobre las propiedades físico químicas, características sensoriales y estabilidad microbiológica de agua de pipa (*Cocos nucifera L*) durante el almacenamiento en refrigeración. Proyecto final de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. Universidad de Costa Rica.
- Nitbania, F., Juminaa, D, Siswantaa, D. y Solikhah, E. (2016). Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil (*Cocos nucifera L.*). Procedia Chemistry, Elsevier. Vol. 18: 132-140. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187661961600022X>.
- Núñez, C. (2008). Extracciones con equipo Soxhlet. Recuperado de <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>

- Núñez, J. (2007). Detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia antibacteriana en niños portadores asintomáticos de Pachuca, Hidalgo. Trabajo final de investigación para obtener el título de médico cirujano. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. Recuperado de: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/627>
- Ochoa, A; Sarmiento, A. (2018). Estudio Fitoquímico de la Especie Vegetal *Bucquetia glutinosa*. (Melastomataceae) y Evaluación de su Actividad Biológica. Para optar por el grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales Bogotá, Colombia.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (5 de febrero, 2018). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>.
- Pahissa, A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. España. Editorial ICG Marge, S.L.
- Palacios, M. (2013). *Alcaloides*. Recuperado de http://files.uladech.edu.pe/docente/32924394/Farmacognosia_y_Fitoquimica/Sesion_14/TEMA_14.pdf
- Parrotta, J. (2000). Biotecnología de árboles nativos, exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales: Palma de coco, coco, coconut palm. United States Department of Agriculture (USDA). Recuperado de: https://data.fs.usda.gov/research/pubs/iitf/Bioecologia_gtr15.pdf#page=164
- Pereira, S., Vega, D. y Almeida, M. (2013). Actividad antimicrobiana in vitro de *Cedrela odorata* L. (cedro). Revista Cubana de Plantas Medicinales, Volumen 18, pp. 39-45.
- Reller, B., Weinstein, M., Jorgensen, J. y Ferraro, M. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 49, pp.1749-1755.
- Rivas, C., Oranday, M. y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Book Google, México, Omniscience. Recuperado: https://books.google.co.cr/books?id=8kgcDQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Investigaci%C3%B3n+en+plantas+de+importancia+m%C3%A9dica&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwikv_eztLPiAhXQwFkK


HR2HA3MQ6AEIKTAA#v=onpage&q=Investigaci%C3%B3n%20en%20plantas%20de%20importancia%20m%C3%A9dica&f=false

- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3era. edición. México. Editorial Médica Panamericana.
- Shanson, D. (1981). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. Revista Hospital Infection. Revista Elsevier. Vol. 2, pp. 11-36.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de P-productos fito terapéuticos. Área de Ciencia y Tecnología del Convenio Andrés Bello. Colombia.
- Serra, M. (junio, 2017) La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas. Vol. 16:(3), pp. 402-419. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011.
- Seija, V. (2006). Bacteriología y virología médica: Etiopatogenia microbiológica: género *Staphylococcus aureus*. Revista de la Universidad de la República. Paraguay Vol. 4, pp. 257-265.
- Sierra, I., Gómez, S. y Pérez, D. (2009). Análisis Instrumental. Editorial Netbiblo, S.L España.
- Solano, C. (2017). Análisis del efecto del aceite de coco ante el *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* (in vitro). Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Odontología. Universidad Latina. Costa Rica.
- Soler, N. y López, M. (2014). Interpretación Ambiental de Inbioparque, La Finca Materiales de Comunicación Ambiental (Costa Rica). Proyecto para optar por la Licenciatura de Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de Barcelona. España. Recuperado de https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2014/hdl_2072_248574/PFC_INBioparque_LopezSoler_materials.pdf
- Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M.W. y Song, F. (febrero, 2017). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca Catechu* L. and *Cocos nucifera* L. Revista Elsevier. Vol. 96, pp. 110-119. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016308160>.

- Torres, A. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite de coco sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro. Tesis para la Licenciatura en Odontología. Universidad Central del Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13457/1/T-UCE-0015-821.pdf>
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). Introducción a la microbiología. Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A.
- Valares, C. (2011). Variación del Metabolismo Secundario en Plantas debida al genotipo y al ambiente. Grado para optar por Licenciatura en el área de Ecología. Universidad de Extremadura. España. Recuperado de: <http://biblioteca.unex.es/tesis/9788469494332.pdf>
- Vázquez, N. (2017). Evaluación del uso de fitoquímico para el tratamiento de bacterias multirresistentes. Proyecto final de Licenciatura en Biotecnología. Universidad Argentina de la Empresa (UADE). Recuperado de: <https://repositorio.uade.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/6597/PROYECTO%20FINAL%20DE%20INGENIER%C3%8DA%20-%20NICOL%C3%81S%20MART%C3%8DN%20V%C3%81ZQUEZ.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Velázquez, M. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. Revista Salud Pública, México, Vol:47. Pp. 381-387. Tomado de Revista Scielo. Recuperado de: https://www.scielo.org/scielo.php?pid=S0036-3634200500050009&script=sci_arttext&tlng=en
- Villalta, I; Benítez, N. (2009). Estudio Etnobotánico, Etnomédico, y Fitoquímico de Plantas que la Población Salvadoreña Utiliza como Antiparasitarias, de Cultivo Sostenible y Poco Investigadas. Revista de la Universidad Alberto Masferre, El salvador. Vol. 32, pp.1-15
- Zendejas, G., Ávalos, H. y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Revista Biomédica. Vol. 25, pp. 129-134.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba confirmatoria de la bacteria *Staphylococcus aureus* por parte del laboratorio microbiológico

 PTL08-FR08 SUBCULTIVO DE CEPAS CONTROL V3		
Lote Interno:	OWFHOX	
Fecha:	02/10/2019	
Realizado por:	Priscila Guzmán	
Código de la Cepa:	ATCC 6538	
Nombre de la Cepa:	Staphylococcus aureus	
Lote del Fabricante:	No se indica	
Proveedor de la Cepa:	CIET-Universidad de Costa Rica	
La Cepa de control de reserva va ser utilizada como:	Tipo preparación cepa	# viales o tubos preparados
	Cepa de control de Trabajo	4
MEDIOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES POR ENSAYAR	Agar Baird Parker	Paso
	Agar Manitol Sal	Paso
EL SUBCULTIVO DE LAS CEPAS CONTROL:	Cumple	

Anexo 2. Acreditación del laboratorio de Microbiología



Anexo 3. Resultados de la cromatografía de gases acoplado a masas



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

CIPRONA Centro de Investigaciones en
Productos Naturales

13 de marzo de 2019
CIPRONA-284-2019

Señora:
Karina Torres Agüero

Estimada señora:
A continuación, le informo el resultado del análisis realizado a una muestra por usted provista.

Producto:
Muestra de aceite de coco sin número de lote, ni fecha determinado.

Técnica de detección utilizada:

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, confrontando los espectros de masa con las librerías de NIST21, WILEY139 y con el patrón de referencia (C4-C24 Even carbon saturated FAMES_Supelco 49453U).

Resultado:

Se realizó la metilación del aceite para la valoración del perfil de ácidos grasos. Se muestran los resultados para los compuestos mayoritarios observados en el cromatograma.

Tabla 1. Compuestos identificados por GC-MS en muestra de aceite de coco

Tiempo de retención	Área	% Área	Compuesto
4 098	140452406	5.72	Ácido octanoico, metil ester
7 671	130843343	5.33	Ácido decanoico, metil ester
12 434	945510184	38.48	Ácido dodecanoico, metil ester
16 986	555042665	22.60	Ácido tetradecanoico, metil ester
21 287	309575821	12.60	Ácido hexadecanoico, metil ester
24 572	35045995	1.43	9,12-Ácido octadecadienoico, metil ester
24 767	189496039	7.71	9-Ácido octadecenoico, metil ester
25 255	122720046	5.00	Ácido octadecanoico, metil ester
	2456481994	100	

% de área relativa = área de cada pico/área total del cromatograma *100



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

CIPRONA Centro de Investigaciones en
Productos Naturales

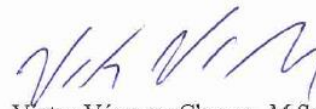
Página 2

Se adjunta la evidencia de la presencia de los compuestos identificados la cual se obtuvo por un análisis de espectrometría de masas y el respectivo cromatograma. Ver figura 1.

Sin otro particular se despide.


B.Q. María Isabel Ríos Marín
Encargada Apoyo Servicios
cc. archivo

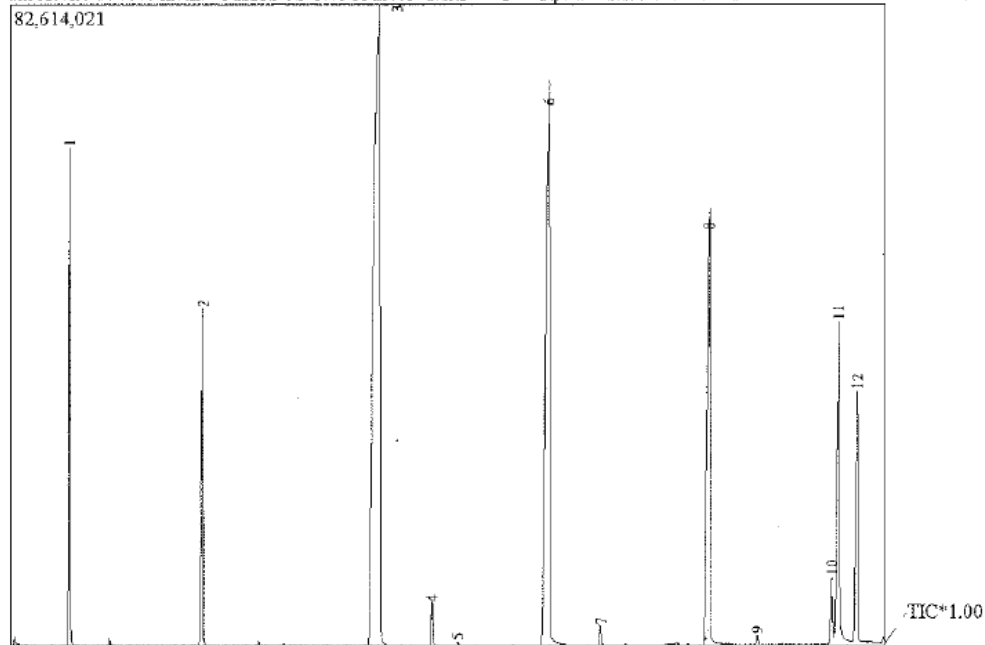



Victor Vásquez Chaves, M.Sc
Químico Analista

Sample Information

Analyzed : 18/10/2019 11:50:03
Sample Name : Aceite de coco metilado KTA_02
Sample ID : Aceite de coco metilado KTA_02

am Aceite de coco metilado KTA_02 C:\GCMS\solution\Data\Data1\prestacion servicios\varios\Aceite de coco metilado KI



Peak Report TIC

Peak#	R. Time	Area	Area%	Name
1	4.098	140452406	5.72	Octanoic acid, methyl ester
2	7.671	130843343	5.33	Decanoic acid, methyl ester
3	12.434	945510184	38.49	Dodecanoic acid, methyl ester
4	13.831	15332101	0.62	
5	14.531	1185146	0.05	
6	16.986	555042665	22.60	Tetradecanoic acid, methyl ester
7	18.355	7501092	0.31	
8	21.287	309575821	12.60	Hexadecanoic acid, methyl ester
9	22.570	3777156	0.15	
10	24.572	35045995	1.43	9,12-Octadecadienoic acid, methyl est
11	24.767	189496039	7.71	9-Octadecenoic acid, methyl ester
12	25.255	122720046	5.00	Octadecanoic acid, methyl ester
		2456481994	100.00	

Figura 1. Cromatograma de muestra aceite de Coco