

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

ESCUELA DE FARMACIA

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
LA *CAESALPINIA PULCHERRIMA* FRENTE A CEPAS DE *S.*
AUREUS Y *P. AERUGINOSA***

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

ANGELO MONTERO CUBILLO

TUTOR: ADAM AMEY WILLIAMS

SAN JOSÉ

MARZO, 2019

Contenido

RESUMEN.....	14
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	15
Planteamiento del problema.....	15
Hipótesis	16
Objetivos.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos.	16
Justificación	17
Antecedentes.....	19
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	23
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	23
Clasificación taxonómica	23
Distribución y características botánicas	24
Plantas Medicinales y Fitofármacos	27
Extracción de Compuestos.....	29
Extracción por maceración	30
Extracción continua por Soxhlet	31
Tamizaje fitoquímico.....	32
Flavonoides	32
Alcaloides.....	32
Terpenos y esteroides	33
Taninos y fenoles	33
Saponinas	33

Cromatografía de Gases	33
Espectrometría de Masas	34
Bacterias.....	35
Estafilococos.....	37
Características de cultivo e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Patogenia.	41
Infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Tratamiento.....	51
Pseudomonas	53
Características de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Cultivo e identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Patogenia y virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	57
Infección por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Tratamiento.....	60
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.....	61
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	62
Técnica de Bauer & Kirby	62
Formas Farmacéuticas	64
Formas farmacéuticas tópicas	65
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	66
Enfoque.....	66
Método.....	66
Procedimiento de Recolección y Análisis de Datos	67
Extracción de las vainas, hojas y flores de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i> con el método Soxhlet.....	67

Materiales y equipo.	67
Preparación del extracto clorofórmico de las hojas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	68
Preparación del extracto clorofórmico de las flores de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	70
Preparación del extracto clorofórmico de las vainas secas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	72
Preparación del extracto metanólico de las hojas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	74
Preparación del extracto metanólico de las flores de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	76
Preparación del extracto metanólico de las vainas secas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	77
Extracción de las vainas, hojas y flores de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i> con el método de maceración	79
Materiales y equipo	79
Preparación del etanol al 70%.	80
Preparación del extracto acuoso de las hojas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	80
Preparación del extracto acuoso de las flores de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> . ..	81
Preparación del extracto acuoso de las vainas secas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	82
Pruebas de Identificación.....	83
Materiales y equipo	83
Identificación de alcaloides (Reactivo de Dragendorff)	84
Identificación de flavonoides (ensayo de Shinoda).....	84
Identificación de triterpenos y/o esteroides	84
Identificación de fenoles.....	85

Identificación de saponinas	85
Formulación de una Crema a Base del Extracto Metanólico de las Vainas	85
Materiales y equipo	85
Formulación de la crema	86
Medición de la Actividad Antimicrobiana.....	87
Preparación de las placas petri para el cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	87
Cultivo de las bacterias e inoculación de los extractos vegetales.....	87
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	88
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	90
Obtención de los Extractos de las Flores, Hojas y Vainas de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	90
Extracción de las flores, hojas y vainas secas con el equipo soxhlet utilizando como solvente metanol y cloroformo.....	91
Extracción de las flores, hojas y vainas secas por medio de maceración utilizando etanol al 70%	94
Pruebas de Identificación para el Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Obtenidos de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	97
Identificación de flavonoides: Ensayo de Shinoda	98
Identificación de triterpenos y esteroides: ensayo de Libermann-Burchard	101
Identificación de fenoles y taninos.....	105
Identificación de alcaloides: Reactivo de Dragendorff	108
Identificación de Saponinas	110
Caracterización por Cromatografía de Gases Acoplada a un Detector de Masas de los Extractos Clorofórmicos y Metanólicos	112
Análisis de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Obtenidos por Diferentes Técnicas de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	114

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Extractos que Presentaron Actividad Antibacteriana	124
Elaboración y Análisis del Efecto Antibacteriano de la Formulación de una Crema a Base del Extracto Metanólico de vainas	131
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	134
Conclusiones	134
Recomendaciones	136
Referencias.....	137

Figuras

Figura 1. Arbusto de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	24
Figura 2. Flores y Frutos de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	26
Figura 3. Biosíntesis de Metabolitos Secundarios.....	28
Figura 4. Método de Extracción por Maceración	30
Figura 5. Equipo de Extracción Soxhlet.....	31
Figura 6. Conformación Estructural de las Bacterias	36
Figura 7. Microscopía de la Tinción de Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Figura 8. Cultivo Bacteriano <i>S. aureus</i> en Agar Sangre.....	40
Figura 9. Impétigo Ampolloso por <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 10. Impétigo en Lactante por <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figura 11. Ectima Causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Figura 12. Síndrome Estafilocócico de la Piel Escaldada en Persona Adulta	45
Figura 13. Síndrome Estafilocócico de la Piel Escaldada en Lactante.....	47
Figura 14. Tinción de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
Figura 15. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en Agar Mueller-Hinton.....	56
Figura 16. Halos de Inhibición en un Medio de Cultivo por Técnica de Difusión de Disco.....	63
Figura 17. Hojas Secas de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	69
Figura 18. Extracción Clorofórmica de las Hojas	70
Figura 19. Flores Secas de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	71
Figura 20. Extracción Clorofórmica de las Flores.....	72
Figura 21. Vainas Secas y Molidas de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	73
Figura 22. Extracción Clorofórmica de las Vainas.....	74
Figura 23. Extracción Metanólica de las Hojas	76
Figura 24. Extracción Metanólica de las Flores	77

Figura 25. Extracción Metanólica de las Vainas	78
Figura 26. Extracto de las Hojas en Maceración	81
Figura 27. Extracto de las Flores en Maceración	82
Figura 28. Extracto de las Vainas en Maceración	83
Figura 30. Recolección de la Planta <i>Caesalpinia pulcherrima</i> en la Zona de Siquirres	91
Figura 31. Residuos de las Vainas Posterior a la Filtración	95
Figura 32. Residuos de las Hojas Posterior a la Filtración	95
Figura 33. Identificación de Flavonoides en los Extractos Acuosaos Antes de la Prueba.....	99
Figura 34. Identificación de Flavonoides en los Extractos Acuosaos Posterior a la Prueba..	99
Figura 35. Identificación de Flavonoides en los Extractos Metanólicos Antes de la Prueba	100
Figura 36. Identificación de Flavonoides en los Extractos Metanólicos Posterior a la Prueba	100
Figura 37. Identificación de Flavonoides en los Extractos Clorofórmicos Antes de la Prueba	101
Figura 38. Identificación de Flavonoides en los Extractos Clorofórmicos Posterior a la Prueba	101
Figura 39. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Acuosaos Antes de la Prueba	102
Figura 40. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Acuosaos Posterior a la Prueba	102
Figura 41. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos metanólicos Antes de la Prueba	103
Figura 42. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Metanólicos Posterior a la Prueba	103
Figura 43. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Clorofórmicos antes de la Prueba	104

Figura 44. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Clorofórmicos Posterior a la Prueba	104
Figura 45. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Acuosaos Antes de la Prueba	105
Figura 46. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Acuosaos Posterior a la Prueba	106
Figura 47. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Metanólicos Antes de la Prueba	106
Figura 48. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Metanólicos Posterior a la Prueba	107
Figura 49. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Clorofórmicos Antes de la Prueba	107
Figura 50. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Clorofórmicos Posterior a la Prueba	108
Figura 51. Identificación de Alcaloides en los Extractos Acuosaos Antes de la Prueba	109
Figura 52. Identificación de Alcaloides en los Extractos Acuosaos Posterior a la Prueba ..	109
Figura 53. Identificación de Alcaloides en los Extractos Metanólicos Antes de la Prueba	110
Figura 54. Identificación de Alcaloides en los Extractos Acuosaos Posterior a la Prueba ..	110
Figura 55. Identificación de Saponinas en los Extractos Acuosaos	111
Figura 56. Identificación de Saponinas en los Extractos Metanólicos	111
Figura 57. Identificación de Saponinas en los Extractos Clorofórmicos	112
Figura 58. Capilla de Flujo Laminar con Placas de Agar Nutritivo para el Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	115
Figura 59. Rayado de la Placa con la Solución de Tioglicolato Rica en Bacterias de <i>Staphylococcus aureus</i>	116
Figura 60. Placas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con los Inóculos del Extracto	117
Figura 61. Placas de <i>Staphylococcus aureus</i> con los Inóculos del Extracto	117

Figura 62. Efecto Inhibitorio de los Extractos Clorofórmicos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	119
Figura 63. Efecto Inhibitorio de los Extractos Metanólicos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	120
Figura 64. Efecto Inhibitorio de los Extractos Metanólicos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	121
Figura 65. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuosaos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	122
Figura 66. Efecto Inhibitorio de los Extractos Clorofórmicos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	123
Figura 67. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuosaos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	124
Figura 68. Gráfico de la CMI de los Extractos Acuosaos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	125
Figura 69. Gráfico de la CMI de los Extractos Clorofórmicos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	126
Figura 70. Gráfico de la CMI de los Extractos Metanólicos sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	127
Figura 71. Placas de <i>Staphylococcus aureus</i> con los Extractos que Presentaron Actividad Antibacteriana para la Determinación de CMI.....	128
Figura 72. Gráfico de la CMI de los Extractos Acuosaos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	128
Figura 73. Gráfico de la CMI de los Extractos Clorofórmicos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	129
Figura 74. Gráfico de la CMI de los Extractos Metanólicos sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	130
Figura 75. Placas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con los Extractos que Presentaron Actividad Antibacteriana para la Determinación de CMI.....	131
Figura 76. Crema a Base del Extracto Metanólico de Vainas	132
Figura 77. Efecto Antibacteriano de la Crema sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	133

Tablas

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	23
Tabla 2. Toxinas de <i>Staphylococcus aureus</i> y su Efecto Biológico.....	48
Tabla 3. Relación de los Componentes de <i>Staphylococcus aureus</i> y su Efecto Biológico ..	49
Tabla 4. Tratamiento Antibiótico para Infecciones Causadas por Estafilococos en Adultos	51
Tabla 5. Toxinas Producidas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Tabla 6. Formulación de 100 g de Crema	86
Tabla 7. Diluciones de los Extractos de la <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	88
Tabla 8. Porcentaje de Extracción Obtenidos con el Equipo Soxhlet para las Diversas Partes de la Planta <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	92
Tabla 9. Características de los Extractos Obtenidos Mediante el Equipo Soxhlet.....	93
Tabla 10. Cantidad Extraída con la Técnica de Maceración para las Diversas Partes de la Planta <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	96
Tabla 11. Características de los Extractos Acuosos Obtenidos Mediante Maceración.....	97
Tabla 12. Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	98
Tabla 13. Resultados Obtenidos Mediante el Análisis de GC-MS	113
Tabla 14. Concentraciones de los Extractos Colocados en las Placas de Crecimiento Bacteriano.....	118
Tabla 15. Halos de Inhibición Obtenidos de los Extractos de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> ...	118
Tabla 16. Características de la Crema a Base del Extracto Metanólico de Vainas	132

Agradecimientos

Primeramente a Dios por permitirme concluir con esta etapa de estudio, por brindarme salud, sabiduría, paciencia y fuerzas para seguir adelante. Por estar siempre presente en cada uno de mis días durante el transcurso de mi carrera y por bendecirme de esta manera tan grande.

A mis padres, Carlos y Yorleni, que siempre estuvieron presentes, brindándome su apoyo incondicional y por confiar en mí. Por cada uno de los esfuerzos y sacrificios realizados a lo largo de este proceso. Además, por ser ejemplo de superación y lucha, por sus consejos brindados y que a pesar de estar lejos y verlos poco, siempre estuvieron atentos y a mi lado.

A mi familia por nunca decirme no cuando más necesité de su ayuda, por tratar de darme lo mejor de ellos, por apoyarme y darme palabras de motivación. Por estar pendientes y desearme el mejor de los éxitos siempre.

A mis amigas y amigos universitarios que me ayudaron de una u otra forma durante todo el proceso de mi carrera, por estar pendientes, apoyarme en todo momento que lo necesité y brindarme palabras de aliento.

A mi tutor Adam Amey por brindarme la oportunidad de trabajar con él en este proyecto de investigación, por sus conocimientos aportados para guiarme durante este proceso y por su ayuda, así como por su paciencia en toda la elaboración de la tesis. Además, a los profesores que me apoyaron, aconsejaron y dedicaron tiempo durante este proyecto.

Dedicatoria

Quiero dedicarle este gran logro a Dios, dado que sin él no fuese sido posible obtenerlo, por nunca abandonarme y bendecirme siempre.

A mis padres que dieron todo su esfuerzo y amor durante este proceso, además, de que siempre confiaron en mí y nunca dudaron de mis capacidades, se los agradezco de todo corazón y es por ello que este logro es para ustedes.

Pensamiento

“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

RESUMEN

El presente trabajo de investigación trata sobre “ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA *CAESALPINIA PULCHERRIMA* FRENTE A CEPAS DE *S. AUREUS* Y *P. AERUGINOSA*”. Tiene como finalidad evaluar la actividad antibacteriana de distintas partes de esta planta frente a microorganismos de alta resistencia a los antibióticos según la Organización Mundial de la Salud.

Esto se realizó mediante técnicas de extracción continua con el equipo Soxhlet y maceración. Se utilizaron solventes como cloroformo, metanol y etanol al 70%. Por otro lado, se hizo un tamizaje fitoquímico y un análisis con cromatografía de gases acoplado a un detector de masas con la finalidad de identificar compuestos presentes en los distintos extractos obtenidos.

El análisis antibacteriano fue por medio de la técnica de Bauer y Kirby, en la cual se midieron los halos de inhibición para determinar el poder antibacterial de cada extracto. Además, se buscó determinar la concentración mínima inhibitoria de cada extracto.

Se obtuvo que el extracto de las vainas a partir de metanol mostró los mejores resultados de inhibición con halos de 20 mm sobre *Staphylococcus aureus* y 10 mm sobre *Pseudomonas aeruginosa*. Así mismo, se obtuvo que estos extractos contenían 1,2,3-benzenotriol con una coincidencia del 80.9%.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

La capacidad bacteriana de desarrollar mecanismo de resistencia es mayor a la capacidad de la industria farmacéutica para crear nuevos antibióticos que combatan dichos mecanismos. Además de ser un tema clínico se le adjunta el área económica, donde el desarrollo de los antibióticos no es una opción factible para las compañías farmacéuticas. Esto se debe al costo tan elevado y su demanda no es constante, por ser terapias de 7 a 10 días, en comparación con tratamientos crónicos, los cuales son utilizados de por vida (González, 2013, p. 414).

Las bacterias gram positivas son unas de las principales causantes de enfermedades infecciosas frecuentes en los seres humanos; en su mayoría son cocos, estafilococos o estreptococos. Según un estudio realizado en los Estados Unidos, por el proyecto de vigilancia de agentes patógenos de importancia epidemiológica (SCOPE), se reveló que un 60% de las bacteriemias nosocomiales son causadas por este grupo de bacterias, donde cabe destacar el *Staphylococcus aureus*, que posee un 85% de resistencia a las penicilinas y una gran variedad de mecanismos de resistencia a diversos antibióticos (Casellas, 2011, p. 110).

Por otra parte, las bacterias gram negativas, donde se destaca la *Pseudomonas aeruginosa*, son agentes causales de múltiples infecciones intrahospitalarias, y poseen una capacidad de diseminación mayor a los gram positivos. Adjunto a esto, dicha familia es capaz de desarrollar una importante resistencia denominada *Betalactamasas de Espectro Extendido* (BLEE), lo cual es de mucha relevancia clínica, debido a que muchos antibióticos de amplio espectro no son capaces de combatir a esta bacteria (Casellas, 2011, p. 110).

Ante el panorama planteado, la investigación busca evaluar la actividad antibacteriana de la *Caesalpinia pulcherrima* ante las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, con el propósito de obtener otra alternativa terapéutica de origen natural, que pueda servir como base para el tratamiento de las afecciones causadas por estas bacterias. Así mismo, busca identificar los diferentes componentes presentes en cada extracto de la planta y sus diferencias antibacterianas, con el propósito de tener información necesaria para futuras investigaciones.

Dicho estudio se realizará en los laboratorios de la Universidad Internacional de las Américas, donde se cuenta con el equipo necesario para los procesos de extracción e identificación; no obstante, las pruebas microbiológicas se realizarán por una entidad externa a la universidad, debido a la falta de recursos y apoyo proporcionados por parte de la misma.

Por lo expuesto anteriormente se plantea la siguiente pregunta: ¿Es la *Caesalpinia pulcherrima* una alternativa terapéutica para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*?

Hipótesis

La *Caesalpinia pulcherrima* sí cuenta con los metabolitos secundarios para ser utilizada como alternativa terapéutica en el tratamiento de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana de la *Caesalpinia pulcherrima* frente a cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Objetivos Específicos.

Obtener el extracto de los metabolitos secundarios presentes en las hojas, vainas y flores de la *Caesalpinia pulcherrima*.

Realizar un análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de cada parte de la *Caesalpinia pulcherrima*.

Determinar la efectividad antibacteriana de *Caesalpinia pulcherrima* frente a cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Justificación

Las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte a nivel mundial. A pesar de que los antibióticos han aumentado, la esperanza de vida de las personas con alguna complicación patológica relacionada con bacterias, la resistencia microbiana es una amenaza que crece y deteriora día a día la eficacia de estos. Es por ello que, ante la falta de interés por parte de la industria farmacéutica para desarrollar nuevos antibióticos, se ha buscado aprovechar al máximo la medicina natural, con el propósito de implementar una ruta alterna para la innovación de los tratamientos antibacterianos (Alós, 2015, p. 693).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2018 “están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad” (párr. 12), lo cual es algo alarmante y obliga al personal del área de Salud a realizar investigaciones más a fondo sobre la búsqueda de una solución pronta y eficaz.

Al asumir que los costos para el desarrollo de antibióticos y para el desarrollo de otros fármacos son parecidos, es mucho más rentable desarrollar otros medicamentos y no antibióticos. Los tratamientos con fármacos antiinfecciosos generalmente se dan para cortos períodos de tiempo. Claramente, la industria farmacéutica está asignando una baja prioridad o eliminando los programas de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, una situación alarmante ante la emergencia mundial sobre la diseminación y resistencia bacteriana, además, de la escasez de nuevos antibióticos efectivos que aseguren la seguridad del paciente (Moncayo, 2014, pp. 35-36).

Por otra parte, la OMS estableció, en el 2017, una lista de las bacterias con mayor impacto social debido a su resistencia, de las cuales la *Pseudomonas aeruginosa* se encontraba con una prioridad crítica y el *Staphylococcus aureus* con una prioridad elevada; es por ello que la implementación de un nuevo tratamiento farmacológico cobra una gran importancia, y es aquí donde la investigación de productos naturales que provean efectividad contra dichas bacterias cobran una relevancia clínica de gran trascendencia (párr. 17, 19). Así mismo,

Pulipati, Pallavi, Sujan et al. (2012) mencionan la importancia de las plantas medicinales y su uso:

Las plantas medicinales representan una rica fuente de potentes agentes antimicrobianos. Una amplia gama de partes de plantas medicinales (raíz, tallo, flor, fruto, ramitas, exudados y órganos de plantas modificados) se utilizan para extraer como medicamentos que poseen diversas propiedades medicinales. El uso de estas plantas en la medicina tradicional es bien conocido en las zonas rurales de muchos países en desarrollo para el tratamiento de infecciones comunes (p. 360).

En el caso de la planta *Caesalpinia pulcherrima*, las diferentes partes de esta han reportado múltiples usos en la medicina popular como antituberculoso, antiviral, espasmolítico, antimicrobiano, antiinflamatorio y analgésico, los cuales han sido objeto de investigación en muchos países. Al conocer esta información se busca realizar una investigación más a fondo, que provea los recursos necesarios para tomar como alternativa a esta planta, y con ello tener las bases para la elaboración de un fitofármaco que funcione ante alguna infección por las bacterias antes mencionadas.

Se dice que aproximadamente el 20% de las plantas encontradas y estudiadas en el mundo han sido sometidas a pruebas farmacológicas o biológicas, y una cantidad considerable de nuevos antibióticos introducidos en el mercado clínico se han obtenido de recursos naturales o semisintéticos. Es por esto que la investigación aportará una fuente de información de utilidad, para el posible desarrollo de algún nuevo antibiótico, que favorezca al tratamiento de infecciones bacterianas (Devi et al., 2012, p. 699).

Antecedentes

La familia Caesalpinaceae posee una gran variedad de especies, de las cuales se han descrito aproximadamente 500 en todo el mundo. Su origen es un tanto incierto, debido a que algunos autores plantean que es oriunda de la India y naturalizada en varias regiones; por otra parte, se dice que es nativa de Guatemala y México, por lo cual tener un punto definido sobre su origen es difícil. Lo que sí se conoce con certeza es que muchos de los primeros pobladores de las zonas antes mencionadas la utilizaban por sus efectos medicinales, los cuales se diferencian según la parte de la planta utilizada. La especie *Caesalpinia pulcherrima* es utilizada como planta ornamental en Costa Rica; sin embargo, su utilización como alternativa terapéutica es escasa. Caben destacar sus efectos medicinales: actividad antimicrobiana, citotóxica, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiinflamatoria y efecto antioxidante (Ulibarri, 2015 y Ramesh, Sivakumar, Govinda y Kalantri, 2013).

Yik Ling Chew y colaboradores realizaron la publicación “Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia”, en 2011, donde buscaban evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana, además de detectar el contenido fitoquímico de las flores y hojas de diferentes plantas entre ellas la *Caesalpinia pulcherrima*. Para realizar el método de detección fitoquímico y antibacteriano, el material vegetal fue secado con una secadora de frío; se utilizó una extracción con diclorometano y metanol, los cuales luego fueron evaporados para obtener el extracto crudo. Los resultados mostraron una buena actividad frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *A. niger*, *R. oryzae* (pp. 1- 10).

Por otro lado, en la India, los investigadores Chanda y Baravalia realizaron la publicación “Brine shrimp cytotoxicity of *Caesalpinia pulcherrima* aerial parts, antimicrobial activity and characterisation of isolated active fractions”, en agosto del 2011, donde buscaban fraccionar e identificar los compuestos bioactivos de las partes aéreas de la especie *C. pulcherrima* y con ello evaluar su actividad antimicrobiana. El extracto crudo se obtuvo mediante el uso de metanol y, con la ayuda de la cromatografía de capa fina, se pudo separar y analizar cada fracción. Los datos obtenidos mostraron que de las 56 fracciones realizadas solo 13 mostraron actividad antimicrobiana contra Gram negativo y positivo (pp. 1955-1964).

En la “International Journal of Pharma and Bio Sciences” fue publicado un artículo, por parte de A Sheela Devi, Johanna Rajkumar y otros; esto se dio en el 2012, donde se buscaba analizar el efecto antimicrobiano de varias plantas, entre ellas la *C. pulcherrima* contra bacterias multirresistentes. Para ello utilizaron las hojas secas de la planta, y se extrajo con ayuda de un equipo Soxhlet, con diversos disolventes, los cuales fueron evaporados una vez concluido el proceso para obtener el extracto crudo. Se determinó que las extracciones con metanol y acetato de etilo poseen un mayor efecto antibacteriano con respecto a los demás extractos (pp. 698-705).

Franco, Matiz, Pájaro y Gómez, en su publicación “Actividad Antibacteriana in vitro de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz”, realizada en el 2013 en Chile, realizaron un análisis de las fracciones obtenidas de las hojas y flores de las *Caesalpinia pulcherrima*, donde se comparó dicho extracto contra cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. La extracción fue realizada por medio de maceración con éter de petróleo, y posteriormente se fraccionó utilizando cromatografía Flash. Se reportó que dichas fracciones poseen, a bajas concentraciones, una buena actividad inhibitoria sobre las bacterias (pp. 230-237).

“Evaluation of antibacterial activity of fresh and dry flower extracts of *caesalpinia pulcherrima* l” es una publicación realizada en la India por parte de Pulipati, Pallavi, Sujan, Anil y Srinivasa, en el 2012. Los investigadores realizaron un muestreo fitoquímico de las flores secas y frescas, con el fin de probar su actividad antimicrobiana. Se utilizaron diversos solventes orgánicos para realizar las extracciones, además de un extracto acuoso, a los cuales se les realizaron pruebas de identificación fitoquímicas; los extractos revelaron la presencia de taninos, alcaloides, glucósidos, entre otros, que son responsables de su uso medicinal y actividad antimicrobiana (pp. 360-365).

Otros autores de la India realizaron el estudio “Membrane Stabilizing Potential and Antimicrobial Activity of the Pods of *Caesalpinia pulcherrima* (Caesalpiniaceae) against Selected Microbes”, donde se analizó, en el 2013, la actividad de las vainas de la *C. pulcherrima* en la estabilización de la membrana de eritrocitos y su poder antibacteriano; para dicho método se secaron y pulverizaron las vainas, para posteriormente realizar una

extracción con el equipo Soxhlet. Este estudio demostró estabilizar la membrana de los glóbulos rojos humanos, además de su actividad antimicrobiana (pp. 4053-4061).

También en la India, en el 2013, el artículo “Antimicrobial and Antioxidant activity of leaf and flower extract of *Caesalpinia pulcherrima*, *Delonix regia* and *Peltaphorum ferrugineum*”, realizado por Vivek, Sachidananda, Swamy, entre otros, se buscaba determinar y comparar la actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos de hojas y flores de *Caesalpinia pulcherrima*, *Delonix regia* y *Peltaphorum ferrugineum*. Para obtener los extractos se utilizó el material seco y metanol, el cual fue sometido a un equipo Soxhlet para su extracción; los resultados mostraron una marcada actividad contra bacterias y levaduras, además de un efecto antioxidante (pp. 64-71).

Los autores Melfei y Claribel publicaron en Filipinas “Determination of the Antioxidant, Phytochemical and Antibacterial Profiles of Flowers from Selected Ornamental Plants in Nueva Vizcaya, Philippines”, el 27 de septiembre del 2013, donde realizaron un cribado de las diversas funciones antioxidantes, antimicrobianas y de metabolitos secundarios de las flores de diferentes especies de plantas de uso folclórico de esta región. Para este análisis se obtuvo un extracto crudo con etanol, y se determinaron los metabolitos mediante el uso de cromatografía de capa fina; se demostró el efecto antibacteriano y antioxidante en las flores de esta región, donde cabe destacar la presencia de *C. pulcherrima* (pp. 833-841).

Por otro lado, Ribeiro y Lobo estudiaron en Brasil la actividad antimicrobiana con extractos etanólicos de las hojas, flores y vainas de la *C. pulcherrima*, lo que publicaron como “Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Caesalpinia pulcherrima*”, en el 2016. Esto se realizó mediante un secado previo del material vegetal utilizando un horno a 50 °C durante cinco días, una vez concluido este procedimiento se maceró con etanol al 70%. Se obtuvo que los extractos mostraron actividad antimicrobiana ante *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (pp. 853-860).

La revista “Natural Product Research” mencionó la actividad antibacteriana de las saponinas y triterpenoides encontrados en los tallos de la *C. pulcherrima*; su objetivo era elucidarlos para determinar cuáles poseen efecto antimicrobiano; esta investigación se llevó a cabo en la India por Nidhi Asati y R. N. Yadava, en diciembre del 2017. La metodología consistía en secar los tallos al aire, pulverizarlos y extraerlos mediante un aparato Soxhlet; la

separación se llevó a cabo con cromatografía de columna. De los compuestos obtenidos se logró demostrar que el compuesto 1 posee un potente efecto antibacteriano (pp. 499-507).

Este conjunto de artículos sirve de apoyo para evidenciar el efecto antibacteriano de la *Caesalpinia pulcherrima* sobre los microorganismos a estudiar; así mismo, brinda información suficiente que respalda la investigación sobre la actividad de diversas partes de la planta; además, posee una referencia sobre el análisis fitoquímico y de metodología a tomar en cuenta durante la elaboración del proyecto.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En este apartado se expondrán los temas necesarios para la comprensión de este estudio; la temática por abarcar engloba características de la *Caesalpinia pulcherrima* y *S. aureus*, *P. aeruginosa*, además de las técnicas químicas de extracción e identificación de los compuestos obtenidos durante el experimento.

Caesalpinia pulcherrima

La *Caesalpinia pulcherrima* es una planta perteneciente a la familia Fabaceae o Caesalpinaceae; se encuentra ampliamente distribuida tanto en regiones tropicales como subtropicales, en las cuales se destacan América, África y Asia. En América se encuentra desde México hasta Sudamérica. Su origen aún no está bien establecido; probablemente lo tiene en el norte de Centroamérica, y se encuentra naturalizada en los trópicos del Viejo Mundo (Castro, Castro y Ceroni, 2015, p. 202).

Clasificación taxonómica

El departamento de agricultura de los Estados Unidos, en su base de datos, brinda la clasificación taxonómica de la *Caesalpinia pulcherrima* de la siguiente forma:

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la *Caesalpinia pulcherrima*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Género	<i>Caesalpinia</i> L.
Especie	<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw.

Nota: Elaboración propia.

Figura 1. Arbusto de la *Caesalpinia pulcherrima*



Nota: Boething treeland farms.

Distribución y características botánicas

En Costa Rica, su distribución es por todo el país como planta ornamental; además, recibe nombres populares como:

- Hoja de sen.
- Claveliana.
- Malinche.
- Guacamaya.
- Maravilla.
- Malinche enano.

Así mismo, la publicación de Kuru: Revista Forestal (2008), describe las características botánicas de la *Caesalpinia pulcherrima* como:

Árbol pequeño tipo arbusto, de copa irregular y dispersa, rala, extendida, con ramas delgadas en forma de paraguas. Su fuste presenta ejes múltiples, este y las ramas poseen espinas y muchas lenticelas, tanto en el tronco como en ramas. La corteza es delgada, de color blancuzca a gris claro. El follaje es caducifolio, sus hojas son compuestas bipinadas, alternas, de 3 a 9 pares de pinnas por hoja y 6 a 12 hojuelas por pinna; las pinnas son redondeadas en el ápice, pálidas en el envés (p. 2).

Sus flores son muy vistosas, se presentan en inflorescencias terminales, de gran colorido variando desde amarillo hasta rojo, inclusive con tonos mixtos. Produce frutos secos dehiscentes, tipo vaina, color café cuando se encuentran maduros, son coriáceos, aplanados, de aproximadamente 10 cm de largo, en forma de espiral al abrirse. Las semillas presentan una forma aplanada, de aproximadamente 0,8 cm de largo. De testa color verde oscuro, lisa, brillante, lustrosa y muy dura (p. 2).

Figura 2. Flores y Frutos de la *Caesalpinia pulcherrima*



Nota: Rojas y Torres (2008, p. 2).

La *C. pulcherrima* es muy apreciada por sus flores, siendo utilizada en muchas ciudades como cerca viva, en la arborización de calles, parques o jardines; sin embargo, esta especie no solo es utilizada desde su punto de vista ornamental, sino que también se le atribuyen gran cantidad de propiedades medicinales a sus extractos, donde destacan la actividad antimicrobiana y repelente de mosquitos (Castro, Castro y Ceroni, 2015, p. 202).

Así mismo, otro autor ha descrito que “diferentes partes de esta planta han reportado múltiples usos en la medicina popular como antituberculoso, antiviral, espasmolítico, antimicrobiano, antiinflamatorio y analgésico, los cuales han sido objeto de investigación en muchos países” (Franco, Matiz, Pájaro y Gómez, 2013, p. 231).

Plantas Medicinales y Fitofármacos

Las plantas medicinales constituyen un valioso recurso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina natural como alternativa a la atención primaria de salud; gran parte de los tratamientos son a base de extractos que poseen metabolitos que les atribuye la propiedad terapéutica. Esta misma entidad define una planta medicinal como cualquier especie vegetal que contenga sustancias activas, las cuales puedan ser empleadas con fines terapéuticos o que provean principios activos, que sirvan de precursores para la síntesis de nuevos medicamentos (Bermúdez, Oliveira y Velázquez, 2005, p. 453).

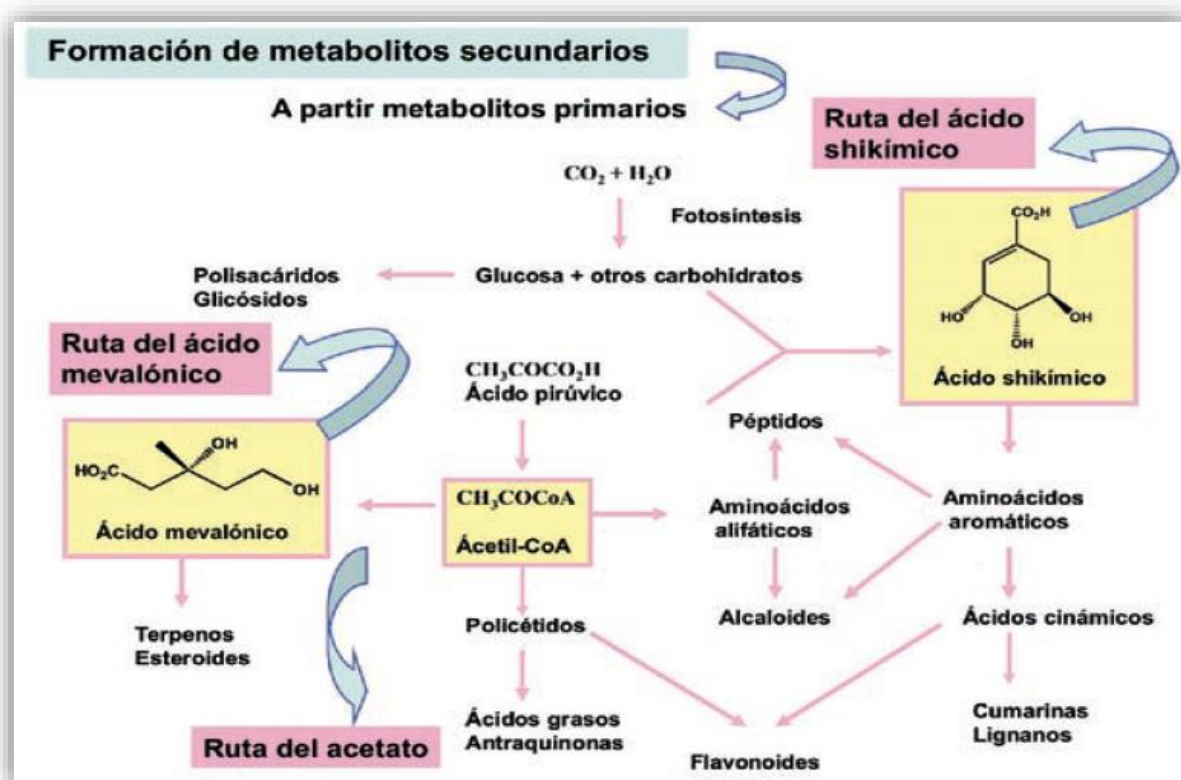
Actualmente, estas plantas son una rica fuente de información y materia prima para el desarrollo de medicamentos semisintéticos; además, las estructuras químicas encontradas en plantas pueden servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas, y las características taxonómicas funcionan de base para la investigación de otras plantas con posible potencial terapéutico (Bermúdez, Oliveira y Velázquez, 2005, p. 453).

Aunada a lo anterior, la fitoterapia se basa en el uso de material vegetal (planta entera, raíces, hojas, flores, semillas, entre otros) para el tratamiento de alguna patología en específico; esta se diferencia de la medicina sintética o convencional al ser de productos o extractos naturales. Muchas de estas preparaciones a base de plantas se emplean utilizando extractos, los cuales se componen de metabolitos secundarios que hacen referencia a sustancias que son el producto secundario de la fotosíntesis, y que intervienen en procesos vegetales como la defensa frente a patógenos y protección a los rayos UV, entre otros. Así mismo, la mezcla de metabolitos secundarios es única para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores (Avello y Cisternas, 2010, p. 1289).

Gutiérrez y Estévez (2009) describen que los metabolitos secundarios en la naturaleza tienen lugar a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis, que tiene lugar en plantas superiores e inferiores, algas y

algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico; a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de productos naturales, como los ácidos grasos, las antraquinonas, los terpenos, esteroides, alcaloides, las cumarinas, los lignanos, entre otros (p. 409).

Figura 3. Biosíntesis de Metabolitos Secundarios



Nota: Gutiérrez y Estévez (2009, p. 410).

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica por la cual son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos; pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial como estructuras privilegiadas, usando el concepto de *farmacología* para aquellos productos

que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Gutiérrez y Estévez, 2009, p. 413).

La implementación de la fitomedicina en el desarrollo de medicamentos con una forma farmacéutica definida recibe el nombre de *fitomedicamento* o *fitofármaco*, que según la publicación “Fitofármacos” hace mención a la Organización Mundial de la Salud, la cual define a los fitofármacos:

Productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, 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 (p. 3).

Extracción de Compuestos

La separación y extracción de solutos o compuestos bioactivos presentes en plantas son procedimientos muy empleados en la agroindustria alimenticia, industria farmacéutica y en la industria cosmética, en general. Para la separación de estos de la fase sólida (material orgánico, partes de plantas, tejidos) se hace necesario poner en contacto directo con una fase líquida que sea afín a los compuestos de interés; ambas fases deben entrar en contacto íntimo, y los solutos difunden desde la fase sólida a la fase líquida cuando se llega a un equilibrio químico, lo cual permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como *lixiviación*, y existen diferentes métodos (Martínez, 2016, p. 15).

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo con los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible (Rivas, Oranday y Verde, 2016, p. 6).

Extracción por maceración

Como mencionan Rivas, Oranday y Verde:

Este es un método de extracción sólido-líquido, donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco; se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol, en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción. Otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa (2016, p. 6).

Figura 4. Método de Extracción por Maceración



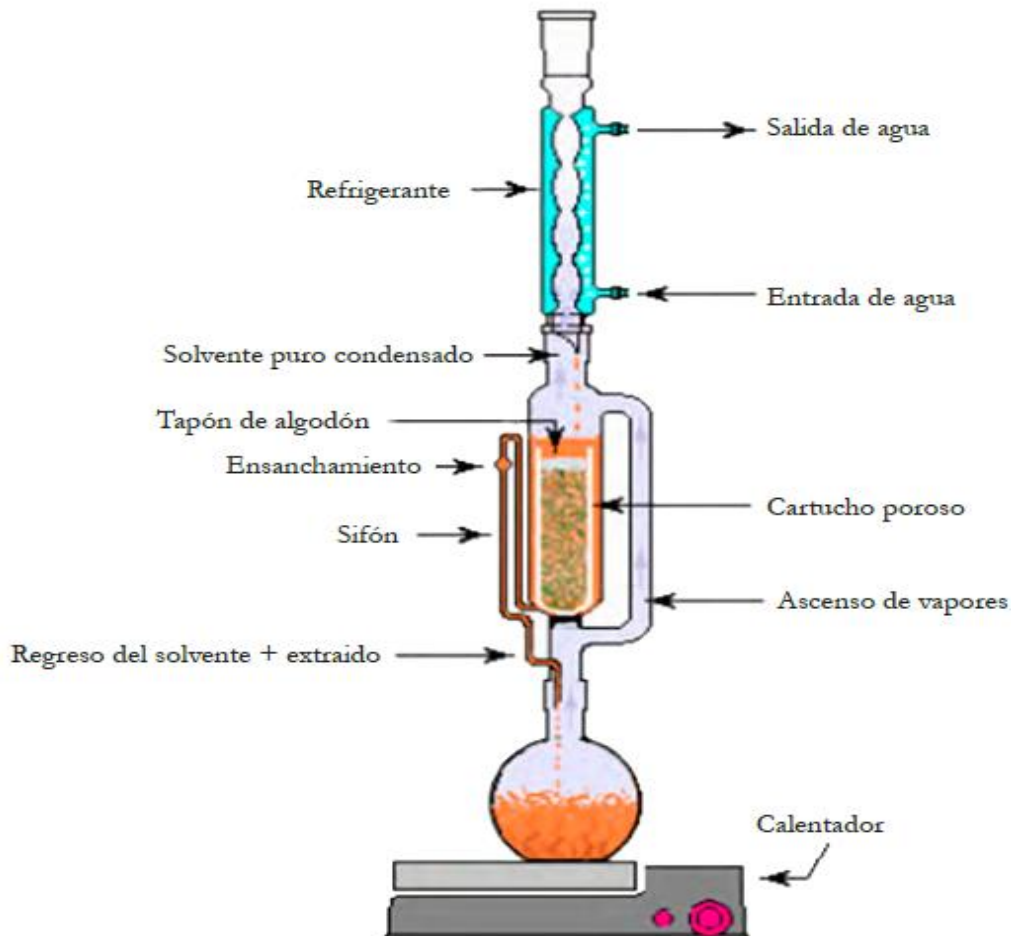
Nota: Montero (2017, p. 33).

Montero (2017) menciona que la materia vegetal debe estar limpia y completamente triturada, picada o macerada. Se debe colocar una cantidad bastante grande del material vegetal y agregar el solvente escogido. Se debe dejar tapado por un mínimo de 24 horas o un máximo de dos semanas. Transcurrido el tiempo se pasa por un colador. Cabe recalcar que se debe evitar la fermentación del principio activo; es decir, formación de moho (p. 50).

Extracción continua por Soxhlet

Este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados; se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet, donde se hace pasar el solvente; este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o días (Rivas, Oranday y Verde, 2016, p. 6).

Figura 5. Equipo de Extracción Soxhlet



Nota: Rivas, Oranday y Verde (2016, p. 7).

Acerca de los extractos que se obtienen respectivamente, se recomienda concentrarlos en un rotavapor, para la recuperación del solvente, que puede volver a ser utilizado.

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas iniciales de una investigación, lo cual consiste en determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios de un extracto vegetal y, a partir de esto, orientar el proyecto a la separación o elucidación de los mismos, dependiendo del interés del investigador (Quispillo, 2013, p. 15).

Este mismo autor menciona que un tamizaje fitoquímico se basa en reacciones de color y precipitación, lo cual permite la evaluación rápida, con reacciones sensibles, de bajo costo y reproducibles de los compuestos o grupos funcionales. Además, describe que este análisis se utiliza como una orientación, puesto que para una identificación más concisa se deberían emplear equipos específicos como cromatografía de gases, espectro infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (Quispillo, 2013, p. 15).

Flavonoides

Calvo (2004) indica que extractos vegetales tratados con virutas de Mg y HCl muestran de inmediato una coloración anaranjada, roja, roja azulada o violeta si están presentes flavonas, flavonoles o xantonas. Ocasionalmente colores verdes y azules se asocian a flavononas y flavononoles respectivamente (p. 2).

Alcaloides

Las disoluciones de varios ácidos de metales pesados, como el silicotúngstico, cloroplatínico, fosfomolibdico, forman precipitados con la mayoría de los alcaloides, igualmente el mercuriyoduro de potasio (reactivo de Mayer), el yoduro de bismuto (Dragendorff) o el yodo-yoduro de potasio (Wagner). Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que solo son positivas

con ciertos grupos de alcaloides. Los principales colores de precipitación son los anaranjados-marrones (Calvo, 2004, p. 12).

Terpenos y esteroides

Estos compuestos constituyen sin duda, el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. Estos compuestos tienen en común que se pueden considerar formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas, derivadas del isopreno (Coy, Parra y Cuca, 2014, p. 34).

Taninos y fenoles

Coy, Parra y Cuca (2014) mencionan que químicamente los taninos son polímeros de polifenoles que poseen de un 1 a un 2% de hidróxidos fenólicos libres. Estos compuestos, al igual que los fenólicos, precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe a la reacción producida por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo) (p. 34).

Saponinas

Troisi y colaboradores mencionan que las saponinas son compuestos que se encuentran distribuidos en muchas plantas; estos son glucósidos con una aglicona. Su nombre se relaciona con una característica distintiva, la cual es la capacidad de formar espuma. Su nombre probablemente proviene de la planta *Saponaria*, cuyas raíces se han usado históricamente para formar jabón (del latín sapo =jabón) (p. 318).

Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica muy utilizada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos volátiles o semivolátiles de mezclas complejas, por lo cual esta técnica se emplea para confirmar la presencia de los compuestos de una determinada muestra. Para ello, se compara el cromatograma de la muestra con el de una sustancia pura o estándar (Mora y Vargas, 2018, p. 102).

El funcionamiento del equipo consiste en la inyección de la fase móvil, la cual es un gas inerte (helio), a través de una fase estacionaria que se encuentra dentro de un horno a una temperatura determinada. La separación de los compuestos depende del tipo de fase estacionaria que se emplee y su afinidad por la misma; cuanta más afinidad tenga, el tiempo de retención será mayor, y tardará más tiempo en salir de la columna.

Por otro lado, se dice que los datos brindados por este equipo de análisis no son datos que puedan verificar inequívocamente la presencia de un compuesto, sobre todo cuando se analizan muestras con múltiples compuestos similares, y es por ello que se acopla a un espectrofotómetro de masas, el cual sí logra identificar compuestos previamente separados sin equivocaciones (Mora y Vargas, 2018, p. 103).

Espectrometría de Masas

Según la USP 38, la espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica basada en la medición de la relación masa/carga de especies iónicas relacionadas con el analito que se está investigando. La MS se puede usar para determinar la masa molecular y la composición elemental de un analito, así como para elucidar en detalle la estructura del analito. Además de ser reconocida como una poderosa herramienta de elucidación estructural, la MS también se usa ampliamente para mediciones cuantitativas (p. 555).

La MS es una técnica sensible y altamente específica para la identificación de analitos. La identificación o verificación de estructuras (es decir, la comparación contra un estándar auténtico) mediante MS es particularmente potente cuando se usa junto con una técnica de separación, tal como cromatografía de gases o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se puede obtener mayor especificidad en el análisis usando espectrometría de masas en tándem (MS/MS) o espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) (USP 38, p. 556).

Los métodos basados en MS para pruebas cualitativas pueden proveer información mediante la detección del ion o iones moleculares relacionados con la masa molecular del

analito como primer nivel. Los diversos métodos instrumentales de la MS permiten realizar determinaciones de masa molecular para una amplia variedad de sustancias, incluyendo biomoléculas de alto peso molecular (por ejemplo, proteínas y polímeros), junto con la información de masa molecular; la MS también puede proveer información estructural única mediante la generación de fragmentos iónicos. Las diferentes formas de fragmentación disponibles en la MS moderna permiten obtener fragmentos iónicos estructuralmente relevantes para una amplia gama de sustancias importantes en el entorno farmacopeico (por ejemplo, moléculas pequeñas y péptidos). De esta forma, la medida de la masa molecular por MS puede utilizarse para la confirmación de una estructura, o incluso para la identificación de un compuesto esperado, especialmente si se utiliza con estándares analíticos o acoplados a un método cromatográfico.

Los estudios avanzados, que implican una o más dimensiones de análisis de masas, se pueden usar también para obtener detalles estructurales específicos (fragmentos iónicos que corresponden a partes estructuralmente únicas de la molécula esperada) (USP 38, p. 1795).

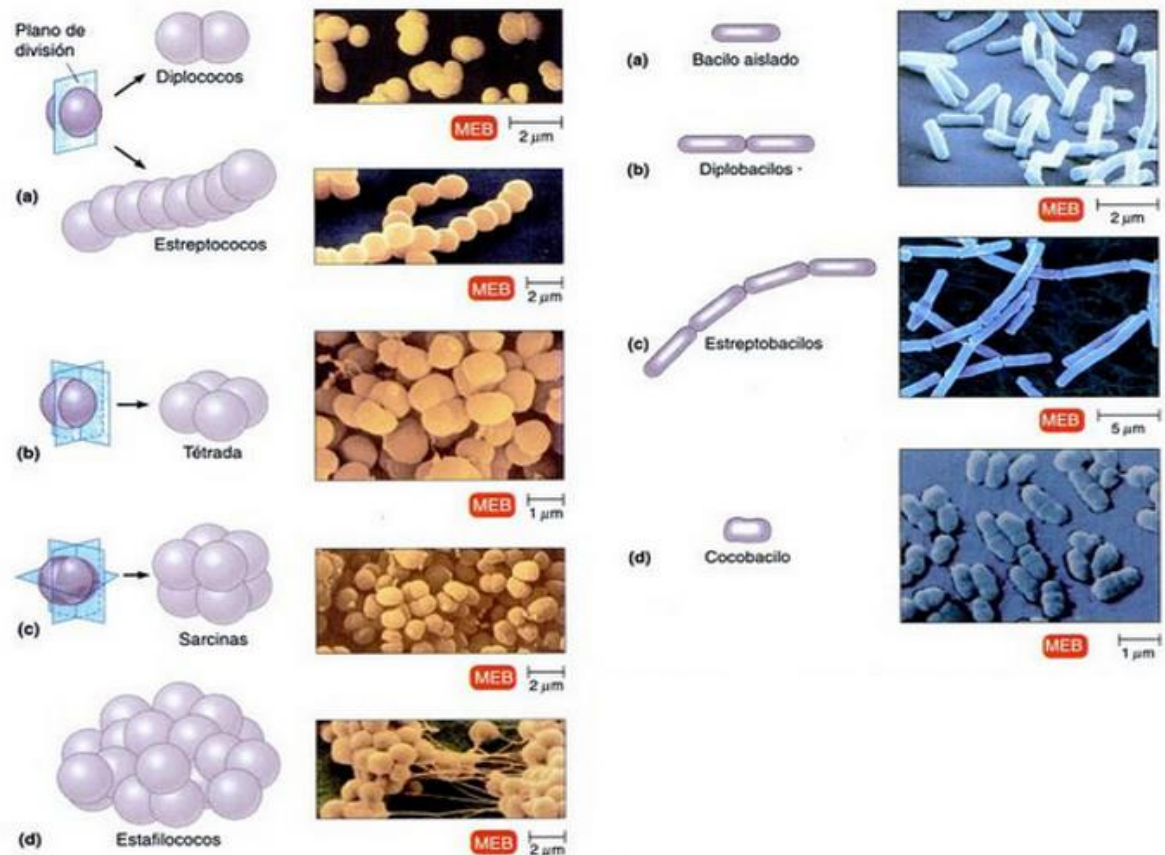
Bacterias

Las bacterias son microorganismos con una sola célula, por lo que son relativamente simples, de tamaños y formas muy variables, donde la mayoría miden entre 0,2-2 micrómetros de diámetro y de 2 a 8 micrómetros de largo. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, es por ello que estas células se denominan *procarionotas*. Estas células suelen presentar diversas formas; dentro de ellas están las que poseen formas de bastón y se llaman *bacilos*, y las de forma esférica u ovalada se conocen como *cocos*.

Además, los cocos pueden ser elongados o con uso de sus lados planos; también existen los diplococos, los cuales se encuentran unidos en pares después de su división, y por otro lado se encuentran los estreptococos, que forman cadenas de bacterias posteriores a su división; así mismo, existe división de cocos en dos planos denominados *tétradas*, en tres planos llamados *sarcinas* y en planos múltiples formando racimos de uvas, que se les conoce

como *estafilococos*. Dichas características favorecen a la identificación y reconocimiento de los mismos (Tortora, Funke y Case, 2007, pp. 4 y 78).

Figura 6. Conformación Estructural de las Bacterias



Nota: Tortora, Funke y Case (2007, p. 78).

Según estos mismos autores, los conjuntos individuales de bacterias pueden formar pares, cadenas, racimos u otros agrupamientos; estas formaciones suelen ser características de un género o especie de bacteria en particular. Así mismo, la mayoría de las bacterias poseen recubrimientos denominados *paredes celulares*, que en gran parte están constituidas por un complejo de hidratos de carbono y proteínas llamadas *peptidoglucanos*. La principal función de la pared es mantener la forma y evitar la ruptura de la célula cuando existen diferencias

de presión hidrostáticas internas o externas. Desde una perspectiva clínica, la pared celular cobra un papel muy importante, dado que muchos mecanismos de antibióticos actúan o ejercen su efecto a este nivel estructural; así mismo, determina la virulencia.

El método de reproducción bacteriana consiste en la división de dos células iguales; este proceso se conoce como *fisión binaria*. Por otra parte, la nutrición: la mayoría de las bacterias lo hace por medio de sustancias químicas orgánicas, las cuales se encuentran en la naturaleza en organismos ya sean vivos o muertos. Por otra parte, algunas pueden producir sus propios alimentos mediante fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de sustancias inorgánicas. Además de esto, algunas también poseen movimiento mediante apéndices como flagelos, los cuales se encuentran anclados a la pared celular de las mismas (Tortora, Funke y Case, 2007, p. 4).

Una clasificación de las bacterias que poseen pared celular son las grampositivas, las cuales poseen una pared bacteriana compuesta por varias capas de peptidoglucano, que conforman una estructura gruesa y rígida; así mismo, la pared celular de los estreptococos grampositivos está recubierta por diversos polisacáridos que facilitan su clasificación bacteriana. A diferencia de las gramnegativas, que contienen solamente una capa delgada de peptidoglucano, este peptidoglucano está unido a lipoproteínas; además, no poseen ácidos teicoicos y una escasa cantidad de peptidoglucano, lo cual aumenta su susceptibilidad a la ruptura (Tortora, Funke y Case, 2007, p. 85).

Estafilococos

Los estafilococos son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, que poseen tamaños que oscilan entre 0.5 y 1.5 micras de diámetro. Una de sus características es que se pueden dividir en conjuntos de racimos que parecen uvas. Hasta el momento se han descrito al menos 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Dicho género posee una gran capacidad de adaptación en el medio ambiente, por esta causa posee la capacidad de afectar a diferentes seres vivos (Zendejas, Ávalos y Soto, 2014, p. 130).

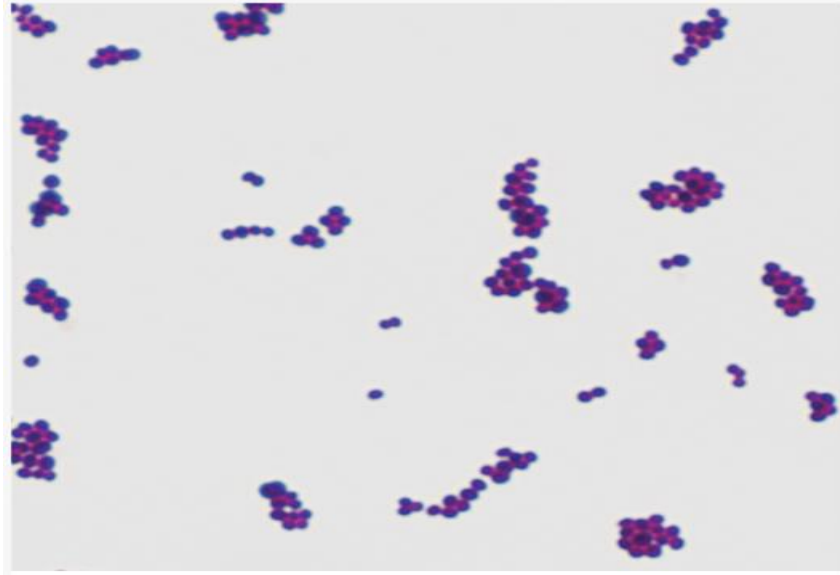
Carroll et al. (2016) mencionan que:

los estafilococos se desarrollan con rapidez en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que van desde un color blanco hasta un amarillo intenso. Algunos son miembros de la microbiota normal de la piel y mucosas del ser humano; otros causan supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia letal. Los estafilococos patógenos suelen producir hemólisis, coagular el plasma y producir diversas enzimas y toxinas extracelulares. El tipo de intoxicación alimentaria más frecuente se debe a una enterotoxina estafilocócica termoestable. Los estafilococos desarrollan con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos y pueden plantear problemas terapéuticos difíciles (p. 185).

El género *Staphylococcus* tiene por lo menos 45 especies. Las cuatro especies encontradas con mayor frecuencia y las más importantes en términos clínicos son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* y *Staphylococcus saprophyticus*. *S. aureus* es coagulasa positiva, lo cual lo distingue de otras especies.

Casi todas las personas presentarán algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida, la cual fluctúa en gravedad desde una intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas leves hasta infecciones graves que ponen en riesgo la vida. Los estafilococos coagulasa negativos son microbiota humana normal y a veces causan infecciones, a menudo relacionadas con dispositivos implantados, como prótesis articulares, derivaciones y catéteres intravasculares, sobre todo en los niños muy pequeños, en los ancianos y en los pacientes inmunodeprimidos (2016, p. 186).

Figura 7. Microscopía de la Tinción de Gram de *Staphylococcus aureus*



Nota: Carroll et al. Microbiología Médica (2016, p. 27e).

Características de cultivo e identificación de *Staphylococcus aureus*.

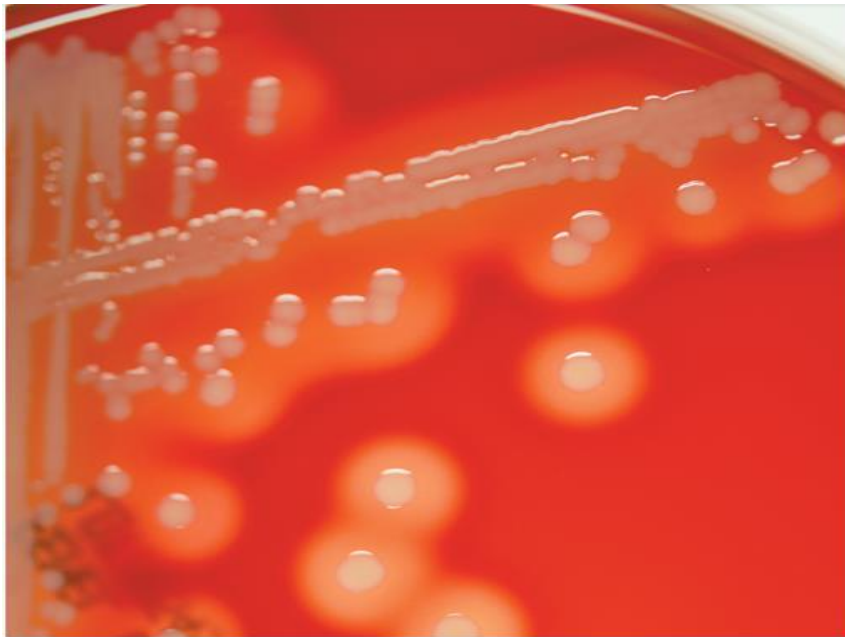
Rojas (2017) describe que el *S. aureus* posee dos componentes en la pared celular: ácido lipoproteico, el cual juega un papel en la adherencia, mientras que la parte covalente del peptidoglicano se une a las proteínas con función de adhesinas. La mayoría de los estafilococos produce catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativa (p. 42).

Además, Carroll et al. (2016) establecen que el cultivo de los estafilococos es de rápido crecimiento en casi todos los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerofílicas. Se desarrollan con más rapidez a una temperatura de 37 °C, pero forman un mejor pigmento a una temperatura de 20 a 25 °C. Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y brillantes. Una característica peculiar de este grupo de bacterias es la del *S. aureus*, el cual suele formar colonias de color gris a amarillo dorado profundo (p. 187).

Para el aislamiento selectivo de *Staphylococcus aureus* se emplea el agar sal manitol, que contiene una concentración de cloruro sódico del 7.5%, el cual es el agente activo del medio e inhibe parcial o completamente a los organismos bacterianos diferentes de los estafilococos.

Los estafilococos coagulasa (+) (*Staphylococcus aureus*) producen colonias de color amarillo y un medio circundante de ese mismo color, 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, Ávalos y Soto, 2014, p. 135).

Figura 8. Cultivo Bacteriano *S. aureus* en Agar Sangre



Nota: Carroll et al. Microbiología Médica (2016, p. 27e).

Para la identificación de *Staphylococcus aureus* Zendejas, Ávalos y Soto (2014) describen que es necesario utilizar pruebas bioquímicas y medios de cultivo específicos que permitan su fácil determinación, dentro de los cuales se encuentran agar Baird-Parker, sal manitol (antes mencionado), N° 110, DNAsa; por otra parte, las pruebas bioquímicas

realizadas para la identificación son catalasa y coagulasa. A continuación, se describen cada una de las siguientes pruebas y medios de cultivo: (p. 135)

Agar Baird-Parker: es un medio moderadamente selectivo para *Staphylococcus aureus*, el cual se compone de piruvato sódico, que favorece a la recuperación de bacterias lesionadas; además, posee compuestos como telurito, cloruro de litio y glicina, que enriquecen el medio para su crecimiento; este se expresa con un aspecto negro y un halo transparente, debido a la actividad lipolítica (p. 135).

Agar estafilococos N° 110: es un medio sumamente selectivo para el aislamiento de estafilococos patógenos a partir de muestras clínicas y no clínicas; este método se basa en la fermentación de manitol para la formación de una pigmentación característica de color amarillento (p. 135).

Agar DNAsa: es utilizado para la identificación de estafilococos potencialmente patógenos, debido a que manifiesta actividad desoxirribonucleasa, lo que es indicador de su patogenicidad; así mismo, la aparición de halos transparentes alrededor de la zona de crecimiento indica la presencia de enzimas que hidrolizan el ADN (p. 135).

En cuanto a las pruebas bioquímicas, se encuentran la catalasa, que consiste en la capacidad de la bacteria de producir la enzima catalasa encargada de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; esto funciona como mecanismo de defensa ante células fagocíticas del cuerpo humano. Se dice que la prueba es positiva cuando se da la liberación de burbujas, que es la reacción característica antes mencionada (p. 136).

Por otra parte, se tiene que la prueba denominada *coagulasa* es utilizada para diferenciar y determinar las distintas especies de estafilococos; el *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de coagular dicha enzima, lo que lo hace un factor característico y específico para su reconocimiento. La principal función de esta enzima es unirse al fibrinógeno y formar fibrina insoluble, lo cual tiende a formar depósitos donde las bacterias pueden agregarse (p. 136).

Patogenia.

Zendejas, Ávalos y Soto (2014) mencionan que la patogenicidad de las infecciones por *Staphylococcus aureus* se relaciona con diversos componentes de la superficie bacteriana; de

manera general, los componentes del microbio son peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de la proteína A. Así mismo, la patogenia provocada por este microorganismo surge cuando se produce la combinación de los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped; estas condiciones propician que *Staphylococcus aureus* posea características de virulencia y daño bastante particulares; aunado a esto, la situación se ve agravada debido a que el patógeno ha ido desarrollando múltiple resistencia contra los antibióticos, propiciando que cada vez sea mucho más difícil el tratamiento y la curación de las enfermedades ocasionadas por esta bacteria (p. 130).

Además, se dice que la capacidad patógena de una determinada cepa de *S. aureus* es el efecto combinado de factores extracelulares y toxinas junto con las propiedades invasivas de la cepa. En un extremo de la gama de la enfermedad está la intoxicación alimentaria estafilocócica, que se atribuye únicamente a la ingestión de la enterotoxina preformada; en el otro extremo están la bacteriemia estafilocócica y los abscesos diseminados en todos los órganos (Carroll et al, 2016).

Infección por *Staphylococcus aureus*.

Una infección causada a nivel tópico por *Staphylococcus aureus* aporta características como un “grano”, infección del folículo piloso o absceso. Suele haber una reacción inflamatoria intensa, circunscrita y dolorosa que supura del centro y que cicatriza con rapidez cuando se drena el pus.

Aunado a esto, en el Manual Merck Sharp & Dohme (MSD) en su versión para profesionales de la salud (2017), publican “Infecciones por estafilococos”, donde describen que:

“Las infecciones de la piel son la forma más común de enfermedad por estafilococos. Las infecciones superficiales pueden ser difusas, con pústulas vesiculosas y formación de costras (impétigo), o a veces celulitis o abscesos focales con abscesos nodulares (forúnculos y ántrax). Son comunes los abscesos cutáneos profundos. Pueden producirse infecciones cutáneas necrosantes graves” (párr. 11).

Figura 9. Impétigo Ampolloso por *Staphylococcus aureus*



Nota: Impétigo y ectima, Manual MSD (2017).

Así mismo, mencionan en la publicación “Infecciones bacterianas de la piel: Impétigo y ectima”, que el impétigo es una infección superficial de la piel que muestra el desarrollo de costras y ampollas causadas por estreptococos, estafilococos o ambos. La ectima es una forma ulcerativa del impétigo. Además, describe que el impétigo se puede clasificar en ampolloso o no ampolloso, donde cabe destacar que el *Staphylococcus aureus* es la causa más importante del impétigo no ampolloso y la causa de todos los impétigos ampollosos.

Figura 10. Impétigo en Lactante por *Staphylococcus aureus*



Nota: Impétigo y ectima, Manual MSD (2017).

El impétigo no ampollar se manifiesta con vesículas o pústulas dispuestas en racimos que se rompen y ocasionan una costra melicérica sobre las lesiones; por otra parte, el impétigo ampollar es muy similar, a diferencia de que las vesículas suelen agrandarse formando ampollas, que suelen romperse para posteriormente dejar una costra melicérica delgada. Cuando el impétigo se complica se conoce como *ectima*, que es la formación de úlceras pequeñas, superficiales y purulentas, con un aspecto como el de un sacabocados, con la aparición de costras gruesas de color marrón y un halo eritematoso. Una característica de estas patologías es el prurito, dolor y malestar leve; el rascado es una causa de diseminación de la infección por la inoculación del microorganismo en otras partes de la piel (Manual MSD: Impétigo y ectima, 2017, párr. 1-5).

Figura 11. Ectima Causada por *Staphylococcus aureus*



Nota: Impétigo y ectima, Manual MSD (2017).

Otra de las afecciones que afectan la piel, como lo menciona el Manual MSD en su publicación “Síndrome estafilocócico de la piel escaldada”, es causado por *Staphylococcus aureus*, el cual es una epidermólisis aguda causada por toxinas estafilocócica. Los lactantes y niños son los más susceptibles, principalmente aquellos menores a seis años; rara vez es encontrada en personas mayores, a menos que tengan insuficiencia renal o estén inmunocomprometidos. Esta enfermedad es producida por estafilococos coagulasa positiva del grupo II, quienes producen la toxina exfoliatina, ocasionando el desprendimiento superior de la epidermis justo por debajo del estrato granuloso (párr. 1-2).

Figura 12. Síndrome Estafilocócico de la Piel Escaldada en Persona Adulta



Nota: Síndrome estafilocócico de la piel escaldada, Manual MSD (2017).

En lactantes, la infección primaria suele comenzar durante los primeros días de vida en el muñón del cordón umbilical o en el área del pañal; en niños un poco mayores suele afectar la cara. La toxina, una vez que ingresa a la circulación, afecta toda la piel del niño.

Por lo general, la lesión inicial suele ser costrosa y superficial; en un periodo a las 24 horas siguientes la piel circundante se vuelve dolorosa y de color escarlata, y esto se extiende a otras zonas con rapidez. La piel se torna muy sensible a la palpación, manifestando dolor, y se observa la presencia de arrugas; la consistencia de la piel es similar a la de un papel. Aparecen ampollas grandes y transitorias en la piel eritematosa, que se rompen rápidamente y ocasionan erosiones; estas ampollas se manifiestan principalmente en zonas de fricción como glúteos, manos y pies (Manual MSD: Síndrome estafilocócico de la piel escaldada, 2017, párr. 3).

Figura 13. Síndrome Estafilocócico de la Piel Escaldada en Lactante



Nota: Síndrome estafilocócico de la piel escaldada, Manual MSD (2017).

Las ampollas intactas pueden desplazarse lateralmente si se presionan suavemente; la piel afectada suele desprenderse fácilmente y en colgajos grandes. Esta descamación ocurre luego de las 36-72 horas, y los pacientes se presentan muy enfermos (malestar general, temblores y fiebre); las áreas donde ocurre esta descamación aparecen escaldadas y, ante la pérdida de barrera que ofrece la piel, se puede desarrollar una sepsis como complicación, además de desequilibrios hidroelectrolíticos.

Otro tipo de infección por *S. aureus* se relaciona con la contaminación directa de una herida; por ejemplo, infección de una herida posoperatoria por estafilococos o infección después de un traumatismo (osteomielitis crónica subsiguiente a una fractura abierta, meningitis consecutiva a una fractura del cráneo). Si *S. aureus* logra diseminarse y sobrevivir puede producir lo que se conoce como una bacteriemia, por lo que sería posible tener

complicaciones como una endocarditis, meningitis, osteomielitis o infección pulmonar. Las características de la sintomatología clínica son muy similares a los provocados por otras infecciones del torrente sanguíneo. La afectación secundaria en un órgano o sistema se acompaña de signos y síntomas de disfunción orgánica (Carroll et al., 2016).

El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo capaz de producir componentes superficiales llamados *toxinas* y producir enzimas extracelulares. Estos componentes son capaces de provocar severas intoxicaciones alimentarias, lo cual es una patología asociada a este tipo de bacteria; dependiendo de la cantidad ingerida de alimento así va a ser la severidad de la afectación. Además, Zendejas, Ávalos y Soto (2014) describen los tipos de toxinas y el efecto biológico que produce sobre las células.

Tabla 2. Toxinas de *Staphylococcus aureus* y su Efecto Biológico

Toxinas	Efecto biológico
Citotoxinas (α , β , δ y γ leucocidina de PV)	Mecanismo poro-perforador sobre las membranas de leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos
Toxina exfoliativa (ETA y ETB)	Proteasas, que rompen los puentes intercelulares en el estrato granuloso de la epidermis
Enterotoxinas (A-E, G-I)	Super antígenos (estimula la proliferación de células T y la liberación de citosinas): estimula la liberación de mediadores químicos en los mastocitos, aumentando el peristaltismo
Toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1	Super antígenos (estimulan la proliferación de células T y la liberación de citosinas); produce extravasación o la destrucción de las células endoteliales

Nota: Zendejas, Ávalos y Soto (2014, p. 132).

Por otra parte, se establece que existen tres factores principales en la infección de *Staphylococcus aureus*, los cuales relacionan sus efectos sobre el organismo humano, lo que conlleva a complicaciones graves. Estos factores son:

1. Adhesión de la bacteria a la célula hospedadora.
2. Promoción del daño y diseminación tisular.
3. Protección de la bacteria frente a mecanismo de defensa del sistema inmune del huésped.

Tabla 3. Relación de los Componentes de *Staphylococcus aureus* y su Efecto Biológico

Componentes de la estructura	Efecto biológico
Cápsula	Es una adhesina, impide la quimiotaxis y la fagocitosis; además 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 la función ciliar, estimula respuesta inflamatoria, media en el daño tisular con producción de radicales tóxicos de oxígeno.
Enzimas	
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina.
Catalasa	Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno.
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos.
Fibronolisina	Disuelve los coágulos de fibrina.
Lipasa	Hidroliza lípidos.
Nucleasa	Hidroliza el ADN.
Penicilinas	Hidroliza la penicilina.

Nota: Zendejas, Ávalos y Soto, 2014, p. 133.

Tratamiento.

En cuanto al tratamiento, el Manual MSD, en la publicación “Infecciones por estafilococos”, cita que el abordaje de las infecciones estafilocócicas incluye el drenaje de los abscesos, el desbridamiento del tejido necrótico, la extracción de cuerpos extraños (como catéteres vasculares) y la administración de antibióticos; de estos últimos es importante conocer la resistencia que puedan presentar las bacterias, dado que muchas de las cepas de estafilococos poseen penicilinasas y enzimas que inactivan a los antibióticos beta-lactámicos (penicilina G y ampicilina) (párr. 32 y 34).

Además, menciona que las cepas extrahospitalarias frecuentemente son sensibles a penicilinas resistentes a penicilinasas (como meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina), a diversas cefalosporinas, a carbapémicos (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem), a tetraciclinas, a algunos macrólidos y fluoroquinolonas. También a la combinación de trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX). Aunado a esto, el Manual MSD establece la siguiente tabla de tratamiento para *Staphylococcus aureus*, de acuerdo con su grado de infección o condiciones del paciente.

Tabla 4. Tratamiento Antibiótico para Infecciones Causadas por Estafilococos en Adultos

Infección	Fármacos
Infecciones cutáneas extrahospitalarias (no MRSA)	Dicloxacilina o cefalexina 250-500 mg orales cada 6 hs, durante 7-10 días.
<i>Pacientes alérgicos a penicilinas</i>	Eritromicina 250-500 mg orales cada 6 hs; claritromicina 500 mg orales cada 12 hs; azitromicina 500 mg orales el primer día, luego 250 mg orales cada 24 hs en los días 2-5; o clindamicina 300 mg por vía oral cada 6 hs.
Infecciones cutáneas extrahospitalarias, probablemente debidas a MRSA	Trimetoprima/sulfametoxazol 160/800 mg VO cada 8-12 hs o clindamicina 300 mg VO cada 6 h o 600 mg VO cada 8 hs. Linezolid 600 mg VO cada 12 hs o tedizolid 200 mg VO cada 24 hs.

<i>Pacientes alérgicos a sulfas</i>	Clindamicina 600 mg orales cada 8 hs o doxiciclina 100 mg orales cada 12 hs.
Infecciones graves, poco probable que debidas a MRSA	Nafcilina u oxacilina 1-2 g IV cada 4-6 hs, o cefazolina 1-2 g IV cada 8 hs.
<i>Pacientes alérgicos a penicilinas</i>	Clindamicina 600 mg IV cada 8 hs o vancomicina 15 mg/kg cada 12 hs.
Infecciones graves, muy probablemente debidas a MRSA	Vancomicina 15 mg/kg IV cada 12 hs, linezolidina 600 mg IV cada 12 hs, tedizolida 200 mg IV cada 24 hs, daptomicina 4-6 mg/kg cada 24 hs (no para infecciones pulmonares), ceftobiprol 500 mg IV cada 8 hs (no disponible en los EE. UU.) o ceftarolina 600 mg IV cada 12 hs.
MRSA confirmado	Según sensibilidades informadas.
Estafilococos resistentes a vancomicina*	Linezolidina 600 mg IV cada 12 hs, quinupristina/dalfopristina 7,5 mg/kg cada 8 hs, daptomicina 4-6 mg/kg cada 24 hs, dalbavancina 1000 mg IV seguidos por 500 mg IV una semana más tarde, oritavancina 1200 mg IV una vez, ceftobiprol 500 mg IV cada 8 hs (no disponible en los EE: UU.) o ceftarolina 600 mg IV cada 12 hs.
*No hay datos clínicos disponibles, pero los fármacos mencionados parecen ser activos in vitro; las dosis no se han establecido.	
MRSA =<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina.	

Nota: Infecciones por estafilococos, Manual MSD (2017).

Por otro lado, se tiene que el tratamiento para el síndrome de la piel escaldada consiste en la administración inmediata de antibióticos antiestafilocócicos penicilinasas resistentes por vía IV como primera elección. Posteriormente, se administra nafcilina 12,5 a 25 mg/kg IV cada 6 h en los recién nacidos > 2 kg y 25 a 50 mg/kg para los niños mayores hasta que se observe mejoría, seguidos de cloxacilina por vía oral, 12,5 mg/kg cada 6 hs (para lactantes y niños que pesan ≤ 20 kg) y 250 a 500 mg cada 6 hs (para niños mayores). La vancomicina o la linezolidina se deben considerar en áreas con una alta prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina o en pacientes que no responden a la terapia inicial. Los corticoides están

contraindicados. Se pueden utilizar emolientes (por ejemplo, vaselina blanca) para evitar la pérdida insensible de agua a través de la piel ulcerada. Sin embargo, se deben minimizar el tratamiento tópico y la manipulación del paciente (Manual MSD: Síndrome estafilocócico de la piel escaldada, 2017, párr. 8).

En cuanto al tratamiento recomendado para el impétigo, mencionado por el Manual MSD en su publicación “Impétigo y ectima”, se dice que debe lavarse con suavidad el área afectada utilizando agua y jabón varias veces al día para eliminar las costras. Para el impétigo localizado, la primera elección es el uso de antibiótico tópico como mupirocina en crema, tres veces por día durante 7 días o retapamulina en crema, 2 veces al día durante 5 días. También es eficaz el ácido fusídico en crema al 2%, tres a cuatro veces al día hasta la resolución de las lesiones. Pueden ser necesarios antibióticos por vía oral (por ejemplo, dicloxacilina o cefalexina 250 a 500 mg 4 veces al día [12,5 mg/kg 4 veces por día en los niños], durante 10 días) en pacientes con lesiones extensas o resistentes. En pacientes alérgicos a la penicilina puede utilizarse clindamicina 300 mg por vía oral cada 6 horas, o eritromicina 250 mg por vía oral cada 6 horas, aunque la resistencia a estas drogas es un problema creciente (Manual MSD: Impétigo y ectima, 2017, párr. 9).

Pseudomonas

El libro de Microbiología Médica (2016) describe que las pseudomonas son bacilos gramnegativos, móviles y aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles. Las pseudomonas tienen una amplia distribución en el suelo, el agua, las plantas y los animales. *Pseudomonas aeruginosa* a menudo está presente en pequeñas cantidades en el microbiota intestinal normal y en la piel del ser humano, y es el principal microorganismo patógeno del grupo.

Por otro lado, las primeras descripciones de infecciones por *P. aeruginosa* en la literatura datan de la década de 1800, cuando los médicos comenzaron a informar acerca de una “condición” que causaba coloración azul-verdosa de los vendajes y se asociaba con un olor “peculiar”. La coloración fue caracterizada inicialmente por Fordos en 1869, quien extrajo el pigmento azul cristalino denominado *piocianina* (Fragozo y Villalobos, 2016, p. 20).

Su nombre fue descrito por un botánico alemán, quien empleó por primera vez el término “Pseudomonas”, que deriva del griego pseudo (falsa) y monas (unidad); así mismo, por el color habitual de las colonias se explica el nombre “aeruginosa” de la especie, que en latín significa moho (Fragozo y Villalobos, 2016, p. 20).

Características de *Pseudomonas aeruginosa*.

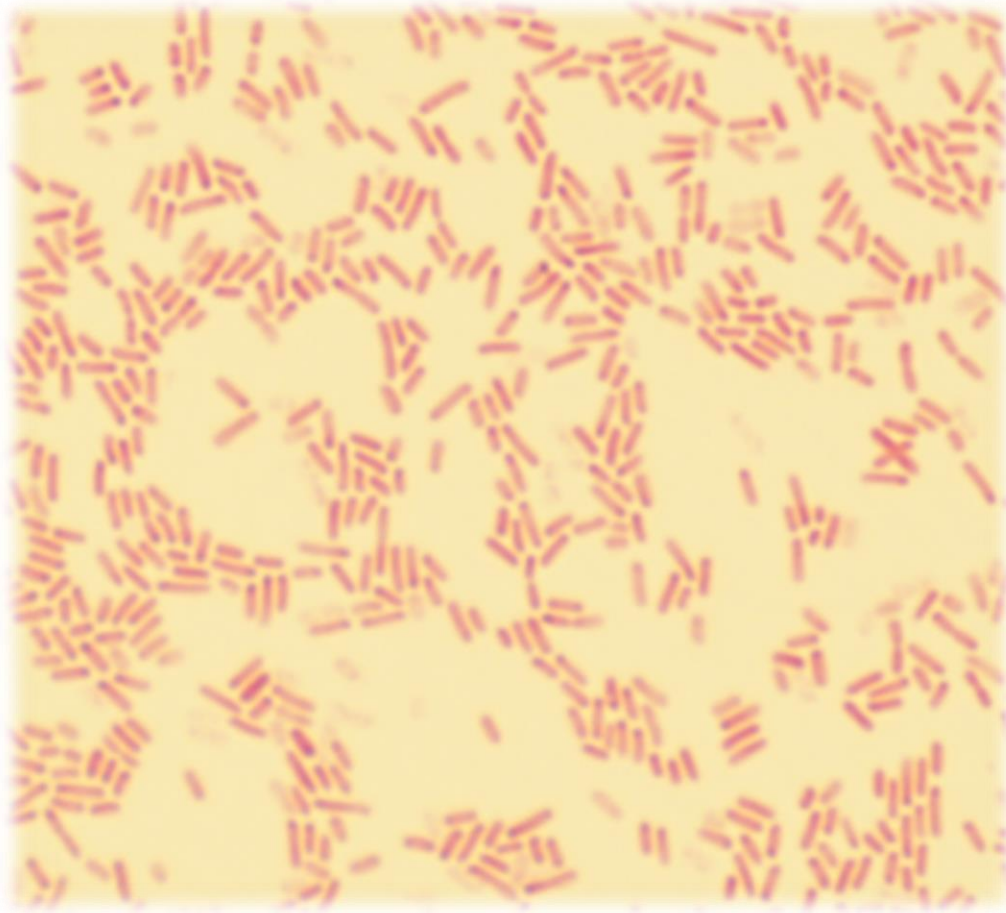
Se dice que se distribuye de manera amplia en la naturaleza y suele encontrarse en medios húmedos en los hospitales; puede colonizar al ser humano normal, en quien es un saprófito; causa enfermedades en personas con defensas afectadas. Además, es una bacteria móvil, con forma de bastón, mide casi $0.6 \times 2 \mu\text{m}$, gramnegativa y se observa como bacteria individual, en pares y, a veces, en cadenas cortas (Carroll et al., 2016).

Aunado a esto, Fragozo y Villalobos (2016) mencionan que las pseudomonas son oxidasas positivas y que tienen la capacidad de crecer a temperaturas de 37 a 42 °C; su facilidad de crecimiento en varios tipos de medios de cultivo permite observar colonias redondeadas, lisas y con un color característico a uva, y se aprecia un color verde-azulado. Dicho color se debe a la producción de compuestos, como piocianina, que ocasiona un color azul, la pioverdina un color verde; algunas cepas pueden producir otros pigmentos como piorrubina, que se expresa visualmente de un color rojo oscuro, y la piomelanina, que se observa de color negro (p. 19).

Este mismo autor describe que otra característica microbiológica de la pseudomonas es la producción de un polisacárido extracelular conocido como alginato; la formación excesiva de esta sustancia da lugar a la formación de una colonia de fenotipo mucóide, la cual ha sido aislada en pacientes con fibrosis quística y otras infecciones crónicas (p. 20).

Por otro lado, Ochoa y colaboradores, en el 2013, citan que la *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista capaz de tolerar ambientes con bajas concentraciones de oxígeno y altamente versátil, el cual puede sobrevivir en lugares con bajos niveles de nutrientes y con rangos de temperatura que van desde los 4 °C hasta los 42 °C. Estas características le permiten adherirse y sobrevivir en distintos lugares como equipos médicos, aires acondicionados y otras superficies hospitalarias, lo que ocasiona una diseminación fácil y, con ello, el desarrollo de infecciones intrahospitalarias, principalmente en pacientes inmunocomprometidos (p. 139).

Figura 14. Tinción de Gram de *Pseudomonas aeruginosa*



Nota: Carroll et al. Microbiología Médica (2016, p. 27e).

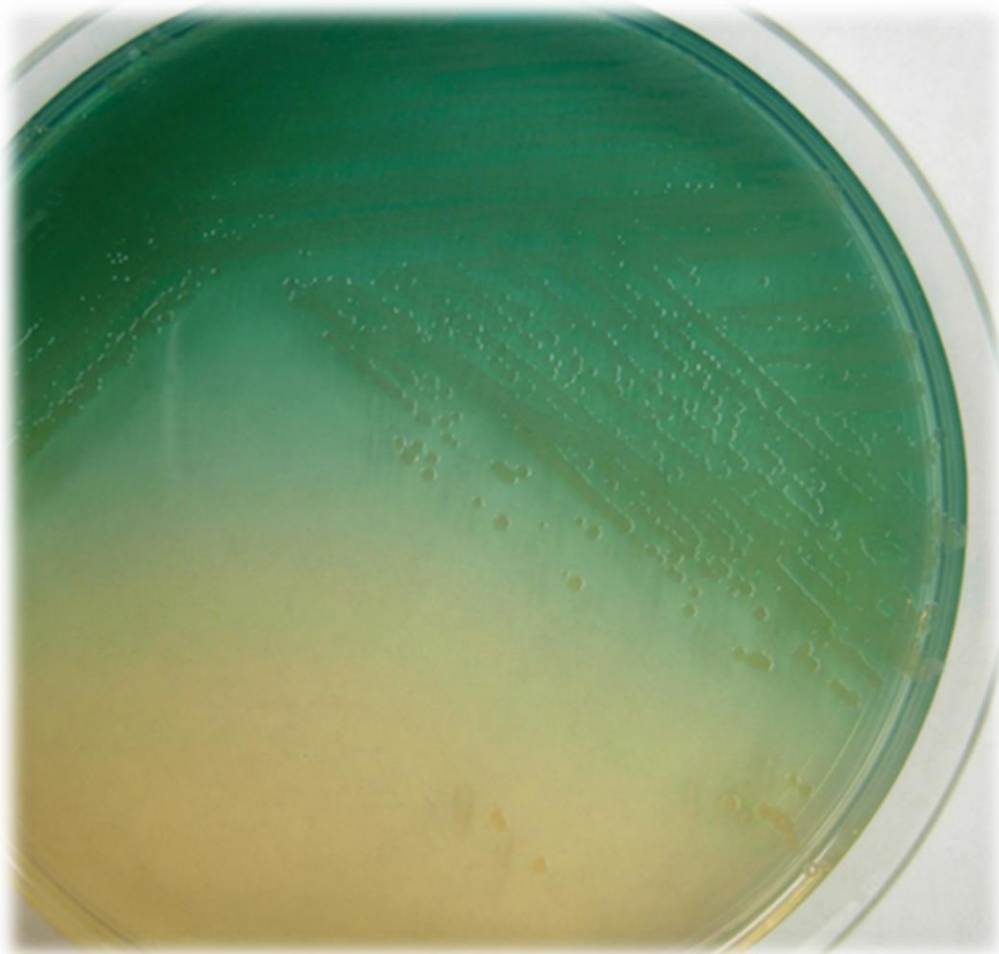
Cultivo e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Carroll et al. (2016) mencionan que la *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo aerobio obligado, por lo que se multiplica con facilidad en muchos tipos de medios de cultivo; produce en ocasiones un olor dulce o parecido al de las uvas o a la tortilla de maíz; algunas cepas originan hemólisis. Esta bacteria tiende a formar colonias redondas y lisas con un color verdoso fluorescente; suele producir el pigmento azulado no fluorescente denominado “piocianina”, que se difunde en el agar. Otras pseudomonas no elaboran esta sustancia. Muchas cepas de *P. aeruginosa* también generan el pigmento fluorescente “pioverdina”, el cual le confiere un color verdoso al agar.

Así mismo, para su cultivo pueden ser utilizadas placas de agar sangre que resultan muy útiles para la diferenciación del cultivo de bacilos intestinales gramnegativos. Además, esta bacteria no es fermentadora de lactosa, lo cual es una característica que la distingue de cepas que sí lo hacen.

Aunado a esto, Guzmán, en el 2016, describe que ante una posible infección por *Pseudomonas aeruginosa* se debe tomar una muestra y llevar a un medio de cultivo adecuado, dentro de los que menciona el agar sangre, donde esta bacteria va a producir una β -hemólisis y provoca un olor característico a uvas. También cita que en el agar MacConkey se puede apreciar un gran crecimiento de colonias pálidas con la presencia de un pigmento verdoso. Algunas pruebas usadas son las de oxidasa y ureasa, donde ambos resultados deben ser positivos (p. 20).

Figura 15. Crecimiento de *P. aeruginosa* en Agar Mueller-Hinton



Nota: Carroll et al. Microbiología Médica (2016, p. 27e).

Patogenia y virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Carroll et al. (2016) citan que esta bacteria tiene acción patógena solo cuando se introduce en zonas sin defensas normales, como el caso de las mucosas y la piel afectadas por daño hístico directo, como ocurre en las quemaduras; cuando se introducen catéteres o sondas por vía intravenosa o vesical, o cuando existe neutropenia, como en la quimioterapia oncológica. Las bacterias se adhieren a las mucosas o la piel y las colonizan, las invaden de forma local y provocan un cuadro generalizado. Las causas de los procesos mencionados son las fimbrias, las enzimas y las toxinas que esta produce. El lipopolisacárido interviene de forma directa en la aparición de fiebre, estado de choque, oliguria, leucocitosis y leucopenia, coagulación intravascular diseminada y síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto.

En la publicación de Fragozo y Villalobos (2016), mencionan que se han identificado varios factores de virulencia, en los cuales la bacteria es capaz de modular en algunos medios hostiles, mediante transferencia horizontal de genes; dentro de dichos factores cabe destacar:

El flagelo es uno de los principales medios de adhesión de la bacteria a las células del huésped; esta estructura le confiere motilidad, adherencia a superficies celulares y formación de biopelículas. A nivel genómico se han identificado cinco alelos de Pili A, donde el más conocido es el perteneciente al grupo IV, cuya expresión se ve incrementada principalmente en la fase temprana de las infecciones agudas.

Otro factor de virulencia es el sistema de moléculas de secreción, el cual consiste en la liberación de sustancias en un medio que le permita a la *Pseudomonas aeruginosa* diseminarse con facilidad y colonizar al huésped. Este proceso se lleva a cabo mediante el sistema de moléculas de secreción de tipo 1, el cual se encarga de liberar toxinas de tipo proteasa en los espacios extracelulares que inhiben la formación de fibrina; el sistema de moléculas de secreción tipo 2 se encarga de secretar proteínas precursoras de efectos citotóxicos y mediadores de la inflamación; por último, el sistema de secreción tipo 3 es el responsable de que se introduzca directamente en el citoplasma de la célula huésped una exotoxina.

En la siguiente tabla, el DataBio describe las principales toxinas producidas por esta bacteria y sus efectos a nivel celular del huésped.

Tabla 5. Toxinas Producidas por *Pseudomonas aeruginosa*

Toxina	Efecto
Endotoxina.	Responsable de la estimulación excesiva del sistema inmunitario, puede provocar shock séptico y producir la muerte.
Exotoxina A.	Citotóxica. Inhibe la síntesis proteica celular, es responsable de necrosis tisular y afecta la respuesta del hospedador a la infección.
Exoenzima S (ExoS).	Citotóxica. Facilita la adhesión de la bacteria a las células epiteliales y la necrosis tisular.
Exoenzima T (ExoT).	
Exoenzima U (ExoU).	Citotóxica. Produce lesiones en las células epiteliales, es responsable de bacteremia e, incluso, de shock tóxico.

Nota: DataBio *Pseudomonas aeruginosa* (2017).

Por otro lado, se dice que la *P. aeruginosa* es una de las causantes de infecciones en heridas y quemaduras, originando una especie de pus azul verdoso; la meningitis es otra complicación producida por esta bacteria y se disemina cuando se realiza una punción lumbar o durante un método neuroquirúrgico; la infección de vías urinarias se da cuando esta bacteria se transmite mediante catéteres, sondas e instrumentos o por soluciones de lavado. Además,

la necrosis hemorrágica de la piel suele presentarse en los casos de septicemia por esta misma bacteria; las lesiones son llamadas *ectima gangrenosa*, las cuales están rodeadas por eritema y casi nunca contienen pus (Carroll et al., 2016).

Infección por *Pseudomonas aeruginosa*.

El Manual MSD cita, en su publicación “Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados”, que la mayoría de las infecciones por *P. aeruginosa* se producen en pacientes internados, en especial los debilitados o inmunocomprometidos. La *P. aeruginosa* es una causa frecuente de infecciones en las unidades de cuidados intensivos. Los pacientes infectados por HIV, especialmente los que están en etapas avanzadas, y los pacientes con fibrosis quística, tienen riesgo de adquirir infecciones por *P. aeruginosa* extrahospitalaria.

Además, describe que las infecciones por pseudomonas pueden aparecer en muchos sitios anatómicos, entre ellos, la piel, los tejidos subcutáneos, el hueso, los oídos, los ojos, las vías urinarias, los pulmones y las válvulas cardíacas. El sitio afectado varía según la puerta de entrada y la susceptibilidad del paciente. Por lo general las afectaciones en piel se presentan en pacientes quemados, donde las bacterias se acumulan debajo de la cicatrización de la herida, pudiendo ocasionar una bacteriemia; otras zonas donde suele invadir esta bacteria son heridas punzantes profundas en los pies, lo que puede conllevar a la formación de fístulas, celulitis y osteomielitis; el líquido drenado de estas heridas suele tener un aroma dulce y frutal (párr. 7).

Otro tipo de patología ocasionada por esta bacteria es la foliculitis, adquirida en tinas de baño, producida por el mal tratamiento químico del agua; las manifestaciones clínicas más relevantes son dolor leve, prurito e irritación, también la presencia de una pústula superficial. El ectima gangrenoso es una lesión causada por *Pseudomonas aeruginosa*, y se caracteriza por el desarrollo de áreas eritematosas con úlceras centrales de color púrpura negruzco y de aproximadamente 1 centímetro de diámetro; por lo general se localizan en zonas inguinales, axilares o anogenital. Este ectima ocurre típicamente en pacientes con bacteriemia producida por *P. aeruginosa* (Manual MSD: Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados, 2016, párr. 7-9).

Adicional a las infecciones a nivel de piel, esta bacteria también afecta las vías aéreas, urinarias, y en ocasiones es capaz de causar endocarditis bacteriana; se dice que la principal

causa de afectación aérea es asociada al respirador, lo que ocasiona una neumonía en el paciente. En personas con fibrosis quística es común que la *P. aeruginosa* desarrolle un cuadro de bronquitis. Por otro lado, las infecciones urinarias son una causa frecuente a nivel intrahospitalario, especialmente en pacientes que han sido sometidos a procesos de intervención urológica o que padecen de uropatías obstructivas; también suelen colonizar el tracto urinario de pacientes con catéteres, especialmente si están recibiendo antibióticos de amplio espectro.

Tratamiento.

Carroll y sus colaboradores mencionaron, en el 2016, que las infecciones clínicamente importantes por *P. aeruginosa* no deben tratarse con un solo fármaco, debido a que la tasa de éxito es baja con tal tratamiento, y las bacterias pueden presentar rápidamente resistencia cuando se utilizan fármacos individuales. Por lo general, se recomienda utilizar una penicilina como la piperacilina activa contra *P. aeruginosa*, en combinación con un aminoglucósido, por lo general tobramicina. También describen que existen otros fármacos que tienen actividad contra *P. aeruginosa* como lo son aztreonam, carbapenémicos como el imipenem o el meropenem y las quinolonas más recientes, incluida ciprofloxacina. De las cefalosporinas más recientes, la ceftazidima y la cefoperazona tienen actividad contra *P. aeruginosa*; se utiliza ceftazidima con un aminoglucósido en el tratamiento primario de las infecciones por *P. aeruginosa*. Los índices de susceptibilidad de *P. aeruginosa* ante los antibióticos varían según las diferentes zonas geográficas, y se deben realizar pruebas de susceptibilidad como un complemento para seleccionar el tratamiento antimicrobiano adecuado, que pueda producir los mejores resultados, evitando el desarrollo de resistencia bacteriana (p. 229).

Por otro lado, el Manual MSD, en la publicación “Infecciones por Pseudomonas y patógenos relacionados”, describe el tratamiento para infecciones sistémicas, el cual se basa en la terapia parenteral, donde menciona que actualmente se ha logrado descubrir que medicamentos como beta-lactámicos con actividad antipseudomonas, como la ceftazidima o alguna fluoroquinolona, producen resultados equivalentes a los de una terapia combinada de aminoglucósido + beta-lactámico. Además, indica que en casos de bacteriuria sintomática se

puede tratar con 500 mg de levofloxacinó vía oral por día, o 500 mg de ciprofloxacino vía oral dos veces al día.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Los autores Rivas, Oranday y Verde (2016) citan que desde la antigüedad las plantas han sido empleadas para diferentes fines, ya sean en el área de alimentos, en la cosmetología y en la médica, principalmente enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades. Los productos naturales, tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros, proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. A este respecto, el desarrollo de productos farmacéuticos comienza con la identificación de los principios activos, para después, utilizando diversos ensayos biológicos, obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, ya sea obteniendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) o la concentración mínima bactericida (CMB) (p. 79).

Taroco, Seija y Vignoli (2006) destacan a la CMI como la concentración mínima de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). Por otra parte, la CMB es la concentración mínima de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada (pp. 663-664).

Además, Rojas (2017) menciona que la interpretación que se le debe dar al halo de inhibición es a tres niveles distintos: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R). Para realizar este ensayo, se recomienda el uso del medio de cultivo Mueller-Hinton para pruebas de sensibilidad o antibiograma. El halo de inhibición que se genera tiende a ser circular alrededor del disco impregnado con la sustancia, el cual posee una simetría que es fácilmente medible (p. 24).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Son técnicas esenciales en la investigación, y los resultados pueden variar, dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas. Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados hasta detalles como la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de actividad antimicrobiana, pueden influir en los resultados de una manera contundente. Los métodos antimicrobianos y antifúngicos están clasificados en tres grupos principales: difusión, dilución y métodos bioautográficos (Rivas, Oranday y Verde, 2016, p. 80).

Estas pruebas de sensibilidad deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Aunque no existe una reglamentación o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas, como está establecido para los antibióticos, la mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar la resistencia o susceptibilidad a antibióticos (Rivas, Oranday y Verde, 2016, p. 80).

La metodología recomendada para este tipo de prueba es el método de difusión, debido a que es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y de crecimiento rápido. Este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y, además, presenta la ventaja de ser reproducible; el método se desarrolla con base en los fundamentos descritos por Bauer, Kirby, Sherris y Turck (1966) en el método de Kirby-Bauer. Esta técnica se puede realizar en pozo o disco, ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS), de los Estados Unidos (Rivas, Oranday y Verde, 2016, p. 80).

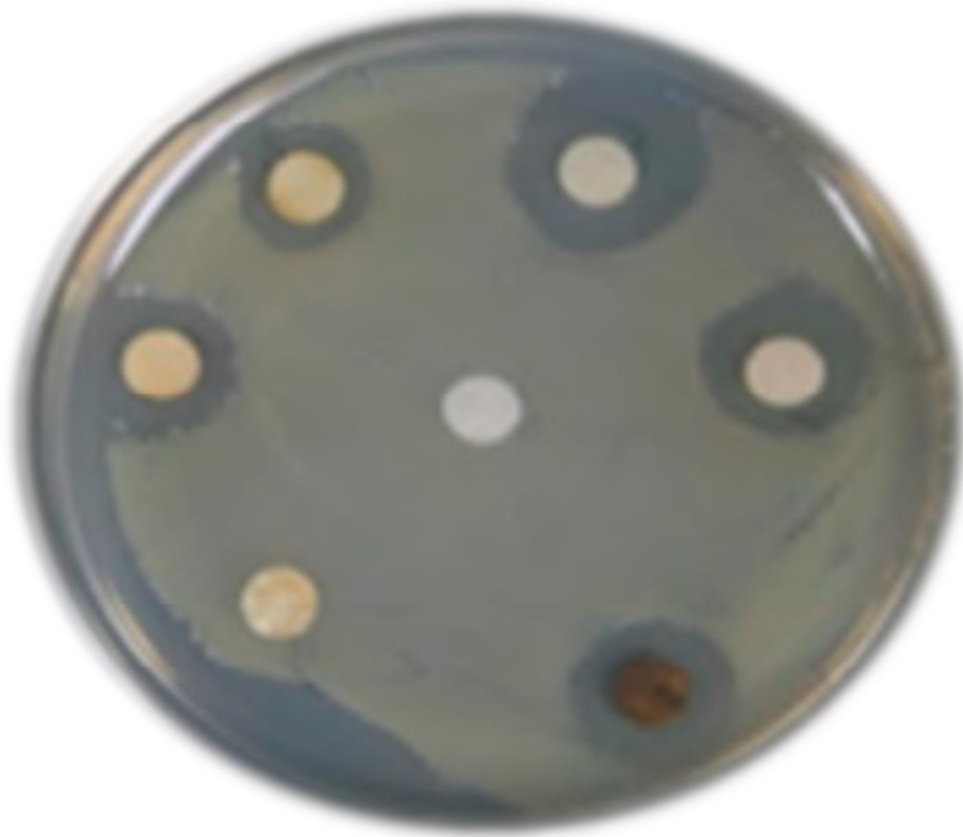
Técnica de Bauer & Kirby

La técnica de difusión en agar, como lo menciona el Dr. Marco Luis Herrera, es cualitativa, y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible, intermedio o resistente, y está diseñada específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus sp.*, o los integrantes de la familia Enterobacteriaceae; en este método el inóculo bacteriano es llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de McFarlane;

este es aplicado sobre la placa donde se realiza el cultivo, por lo general agar Müeller-Hinton, que tenga un pH entre 7,2 y 7,4, medido a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio de cultivo, se procede a rayar sobre la superficie del cultivo la cepa a incubar; luego, en un tiempo no mayor a 15 minutos, se coloca el antibacteriano, del cual se desea medir su actividad.

La placa debe incubarse por un tiempo de 18 a 24 horas y a una temperatura de 35 °C con aire ambiente. Para la medición del halo generado después de transcurrido el tiempo anterior se expone la placa a la luz, y con una regla milimétrica, se miden los halos generados por el antibacteriano.

Figura 16. Halos de Inhibición en un Medio de Cultivo por Técnica de Difusión de Disco



Nota: Rivas, Oranday y Verde (2016, p. 82).

Este tipo de técnica posee ventajas como:

- Fácil de efectuar y de gran reproducibilidad.
- Bajo precio.
- No requiere equipo especial.
- Sus resultados son fácilmente interpretados por los clínicos.
- Es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar.

No obstante, también posee desventajas, como que es una técnica que solamente brinda información cualitativa; además, otra desventaja importante es que existen microorganismos de crecimiento lento, por lo cual deberían modificarse los parámetros de crecimiento y cultivo para poder obtener resultados satisfactorios.

Por otro lado, se dice que los medios más recomendados son infusión cerebro y corazón (ICC), agar soya tripticasa (TSA), agar Mueller-Hinton (MH) o agar nutritivo. Las temperaturas de incubación varían dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ para la mayoría de las bacterias, y el tiempo de incubación puede variar de 24-48 hs (Rivas, Oranday y Verde, 2016, p. 80).

Morales (2012) menciona que la técnica de Bauer y Kirby categoriza la eficacia del antibacteriano con respecto a los halos de inhibición producidos, en este caso clasifica como resistente a los microorganismos con halos menores o iguales a 6 mm, intermedios de 7 a 9 mm y sensible mayores a 9 mm.

Formas Farmacéuticas

Una forma farmacéutica es la combinación de uno o más fármacos con excipientes para facilitar la administración, dosificación y liberación del medicamento en el paciente. En cuanto a la calidad del producto, se debe considerar el diseño, materiales, fabricación y análisis. Un análisis no solo debe considerar las propiedades físico-químicas y biológicas de la forma farmacéutica, sino que es relevante tomar en cuenta la vía de administración para la cual se desea formular, y su régimen de dosificación (USP 38, p. 1398).

Formas farmacéuticas tópicas

La USP 38 describe que los medicamentos de aplicación, vía tópica, se dividen en dos categorías generales: medicamentos que se aplican para generar una acción localizada y los que se aplican para conseguir efectos sistémicos, después de su absorción a través de la piel en el torrente sanguíneo. Los de acción localizada pueden presentarse en la superficie del sitio de aplicación (por ejemplo, estrato córneo, epitelio ocular), en los tejidos subyacentes (por ejemplo, epidermis o dermis) y en tejidos subcutáneos (por ejemplo, músculo o articulación). Los medicamentos de aplicación tópica incluyen: cremas, geles, ungüentos, pastas, suspensiones, lociones, espumas, atomizadores, aerosoles, soluciones y sistemas transdérmicos de liberación de fármacos (p. 76).

La administración vía tópica es la vía por la cual se aplica un medicamento semisólido o líquido, directamente sobre la piel o mucosas. La absorción va a depender de los vasos sanguíneos localizados en la zona de la aplicación; de esto depende una rápida acción local. Dentro de este tipo de aplicación se encuentran la cutánea, transdérmica, oftálmica, ótica y nasal (Valverde, 2018, p. 76).

Las cremas contienen una mezcla de agua y sustancias grasas; estas juntas realizan una mezcla emulsionante que resulta ser muy estable. En su formulación se pueden usar distintos excipientes que son los principales causantes de la clasificación; entre ellos están las cremas lipófilas e hidrófilas (Montero, 2018, p. 55).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En el presente apartado se presentará la metodología a utilizar para la elaboración de esta investigación experimental; así mismo, se analizará el método que conlleva la investigación, fuentes de información utilizadas como base de apoyo, los criterios de inclusión y exclusión de la información utilizada y las categorías de análisis.

Enfoque

La presente investigación tendrá un enfoque cuantitativo, el cual se describe como secuencial (que representa, como dijimos, un conjunto de procesos) y probatorio. Cada etapa precede a la siguiente y no podemos “brincar” o eludir pasos durante el proceso. El orden es riguroso; sin embargo, podemos redefinir alguna fase para poder obtener los resultados esperados (Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p. 4).

Debido a que es una investigación experimental, donde se analizará el extracto obtenido de las hojas, flores y vainas de la *Caesalpinia pulcherrima*, del cual serán evaluados sus componentes químicos y la actividad antibacteriana que estos poseen frente a cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Método

El método utilizado para la elaboración del proyecto de investigación es experimental, y se llevará a cabo en los laboratorios de la Universidad Internacional de las Américas. Como lo explican Hernández, Fernández y Baptista (2014), un experimento se basa en realizar una acción en la cual se observan y explican los resultados obtenidos; además, se dice que el investigador posee dos variables: las independientes (las cuales manipula) y las dependientes (reflejan el efecto de las independientes). Dentro de las variables manipulables se encuentran las extracciones de la planta y la prueba en los cultivos bacterianos; por otra parte, el resultado obtenido de la efectividad antibacteriana sobre las cepas sería la variable dependiente (p. 129).

Procedimiento de Recolección y Análisis de Datos

Las etapas, descritas a continuación, son las utilizadas para la elaboración del experimento; además, se incluyen materiales y equipo para la obtención de los resultados:

Extracción de las vainas, hojas y flores de la *Caesalpinia pulcherrima* con el método Soxhlet

En este segmento se describirá el procedimiento de extracción y los materiales utilizados durante los diferentes procesos del experimento.

Materiales y equipo.

- Calentador y agitador.
- Pastilla de agitación.
- Balón de reflujo con fondo plano de 500 mL.
- Cartucho Soxhlet.
- Condensador.
- Hielera.
- Bomba de inmersión.
- Beaker de 1000 mL.
- Balanza granataria.
- Gasa.
- Rotavapor Yamato RE 801.
- Viales.
- Microespátula.
- Varilla de vidrio.
- Embudo.
- Probeta de 500 mL.
- Cloroformo.
- Metanol.
- Hojas, flores y vainas de *Caesalpinia pulcherrima*.

Preparación del extracto clorofórmico de las hojas de *Caesalpinia pulcherrima*.

Se lavaron las hojas con agua destilada; una vez realizado esto se procedió a secar el material vegetal a la sombra durante siete días. Transcurrido este tiempo se separaron, en la mayor cantidad posible, las hojas de las ramas; posteriormente, con ayuda de un beaker de 1000 mL, donde se colocaron las hojas y se pesaron, para luego ser depositadas en el cartucho del equipo Soxhlet, se realizó por diferencia de peso en una balanza granataria, obteniéndose un peso de 13,3 gramos de hojas secas. Seguidamente se colocó en el cartucho del equipo Soxhlet, al cual previamente se le había colocado una gasa en el fondo de la boquilla de salida con ayuda de una varilla de vidrio, con el fin de evitar el paso de material vegetal al balón o la obstrucción del conducto. El solvente utilizado en esta extracción fue cloroformo, del cual se tomaron 300 mL con ayuda de una probeta, y se llevaron a un balón de reflujo, con capacidad de 500 mL, junto con una pastilla de agitación. A dicho balón se le acopló el cartucho y el refrigerante, el cual estaba unido a una bomba de inmersión con agua y hielo, con el propósito de recircular el agua, evitando un gasto excesivo de la misma; seguidamente, se procedió a extraer, durante un lapso de 4 horas, a una temperatura aproximada de 250 °C, según el calentador, y una agitación constante de 150 rpm.

Una vez ocurrido este proceso, se almacenó el extracto sellado en la refrigeradora para su previa evaporación; este método se realizó con ayuda del Rotavapor YAMATO RE 801; para ello se transfirió el contenido del balón utilizado en el equipo Soxhlet a uno adaptable al rotavapor; para esto se utilizó un embudo, con el fin de evitar pérdidas de muestra, y se les realizaron lavados con cloroformo a las paredes del balón. Seguidamente, se dio inicio a la evaporación del solvente, ajustando el baño maría del rotavapor a 55 °C y una rotación de 65 rpm durante aproximadamente 2 horas, o hasta eliminar el solvente por completo y obtener el extracto sólido.

Posteriormente se procedió a sacar la muestra sólida del balón; para ello se utilizó una microespátula, con la cual se raspó la cera y se almacenó en un vial, para luego realizarle pruebas de identificación y los análisis respectivos.

Figura 17. Hojas Secas de la *Caesalpinia pulcherrima*



Nota: Elaboración propia.

Figura 18. Extracción Clorofórmica de las Hojas

Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto clorofórmico de las flores de *Caesalpinia pulcherrima*

Se realizó una metodología similar a la de la extracción clorofórmica con las hojas, con ciertas modificaciones, como que una vez transcurrido el tiempo de secado se separaron, en la mayor cantidad posible, las flores de los tallos y las hojas, con el fin de tener solamente flores y no otras partes de la planta que pudiesen interferir. Por otro lado, se pesó un total de 23,61 gramos de flores secas y se utilizaron 300 mL de cloroformo, y se procedió a seguir los mismos pasos de la metodología antes mencionada.

Figura 19. Flores Secas de la *Caesalpinia pulcherrima*



Nota: Elaboración propia.

Figura 20. Extracción Clorofórmica de las Flores



Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto clorofórmico de las vainas secas de *Caesalpinia pulcherrima*.

Se realizó una metodología similar a la de la extracción clorofórmica con las hojas, con ciertas modificaciones, como la limpieza de las vainas secas, que se hizo con una servilleta humedecida con agua destilada; una vez realizado esto se procedió a secar los residuos de agua con servilletas, y se dejaron a la sombra por dos días. Transcurrido este tiempo, se molieron las vainas secas, con ayuda de un molino, de manera que quedara en trozos más pequeños. Por otro lado, se pesaron un total de 104,35 gramos de vainas molidas y se

utilizaron 300 mL de cloroformo; se procedió a seguir los mismos pasos de la metodología antes mencionada.

Figura 21. Vainas Secas y Molidas de la *Caesalpinia pulcherrima*



Nota: Elaboración propia.

Figura 22. Extracción Clorofórmica de las Vainas



Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto metanólico de las hojas de *Caesalpinia pulcherrima*

Se lavaron las hojas con agua destilada; una vez realizado esto se procedió a secar el material vegetal a la sombra durante siete días. Transcurrido este tiempo se separaron en la mayor cantidad posible las hojas de las ramas; posteriormente, con ayuda de un beaker de 1000 mL, donde se colocaron las hojas y se pesaron, para luego ser depositadas en el cartucho

del equipo Soxhlet; esto se realizó por diferencia de peso en una balanza granataria, obteniéndose un peso de 16,22 gramos de hojas secas. Seguidamente se colocó en el cartucho del equipo Soxhlet, al cual previamente se le había colocado una gasa en el fondo de la boquilla de salida con ayuda de una varilla de vidrio, con el fin de evitar el paso de material vegetal al balón o la obstrucción del conducto. El solvente utilizado en esta extracción fue metanol, del cual se tomaron 300 mL con ayuda de una probeta, y se llevaron a un balón de reflujo, con capacidad de 500 mL, junto con una pastilla de agitación. A dicho balón se le acopló el cartucho y el refrigerante, el cual estaba unido a una bomba de inmersión con agua y hielo, con el propósito de recircular el agua, evitando un gasto excesivo de la misma; seguidamente, se procedió a extraer, durante un lapso de 4 horas, a una temperatura aproximada de 250 °C, según el calentador, y una agitación constante de 150 rpm.

Una vez realizado este proceso, se almacenó el extracto sellado en la refrigeradora para su previa evaporación; este método se realizó con ayuda del Rotavapor YAMATO RE 801; para ello se transfirió el contenido del balón utilizado en el equipo Soxhlet a uno adaptable al rotavapor; para esto se utilizó un embudo, con el fin de evitar pérdidas de muestra, y se les realizaron lavados con metanol a las paredes del balón. Seguidamente, se dio inicio a la evaporación del solvente, ajustando el baño maría del rotavapor a 60 °C y una rotación de 65 rpm durante aproximadamente 2 horas, o hasta eliminar el solvente por completo y obtener el extracto líquido.

Posteriormente, se procedió a sacar la muestra líquida del balón; para ello se utilizó un gotero, se almacenó en un vial para luego realizarle pruebas de identificación y los análisis respectivos.

Figura 23. Extracción Metanólica de las Hojas



Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto metanólico de las flores de *Caesalpinia pulcherrima*

Se realizó una metodología similar a la de la extracción metanólica con las hojas, con ciertas modificaciones, como que una vez transcurrido el tiempo de secado se separaron, la mayor cantidad posible, las flores de los tallos y hojas, con el fin de tener solamente flores y no otras partes de la planta que pudiesen interferir. Por otro lado, se pesaron un total de 18.95 gramos de flores secas y se utilizaron 300 mL de metanol; se procedió a seguir los mismos pasos de la metodología antes mencionada.

Figura 24. Extracción Metanólica de las Flores



Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto metanólico de las vainas secas de *Caesalpinia pulcherrima*

Se realizó una metodología similar a la de la extracción metanólica con las hojas, con ciertas modificaciones como la limpieza de las vainas secas, que se hizo con una servilleta humedecida con agua destilada; una vez realizado esto, se procedió a secar los residuos de agua con servilletas y se dejaron a la sombra por dos días. Transcurrido este tiempo se molieron las vainas secas con ayuda de un molino, de manera que quedara en trozos más pequeños. Por otro lado, se pesaron un total de 108,16 gramos de vainas molidas y se utilizaron 300 mL de cloroformo, y se procedió a seguir los mismos pasos de la metodología antes mencionada.

Figura 25. Extracción Metanólica de las Vainas



Nota: Elaboración propia.

Extracción de las vainas, hojas y flores de la *Caesalpinia pulcherrima* con el método de maceración

En este segmento se describirá el procedimiento de extracción y los materiales utilizados durante los diferentes procesos del experimento.

Materiales y equipo

- Balanza granataria.
- Balón de 1000 mL.
- Erlenmeyer de 500 mL.
- Etanol al 70%.
- Kitasato.
- Embudo Büchner.
- Bomba de vacío.
- Papel filtro.
- Etanol absoluto.
- Embudo.
- Balón aforado de 1000 mL.
- Probeta de 1000 mL.
- Papel parafilm.
- Recipiente de vidrio ámbar.
- Rotavapor Yamato RE 801.
- Hojas, flores y vainas de *Caesalpinia pulcherrima*.

Preparación del etanol al 70%.

En un balón aforado de 1000 mL se colocaron, con ayuda de una probeta, 700 mL de etanol al 99,99%; posteriormente se procedió a aforar con agua destilada y se agitó vigorosamente para tener una disolución homogénea.

Preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Caesalpinia pulcherrima*.

Se lavaron las hojas con agua destilada; una vez realizado esto se procedió a secar el material vegetal a la sombra durante siete días. Transcurrido este tiempo se separaron, en la mayor cantidad posible, las hojas de las ramas; posteriormente, en un balón de 1000 mL, se colocaron las hojas y se pesaron en una balanza granataria, obteniéndose un peso de 30,18 gramos de hojas secas. Seguidamente, se adicionó etanol al 70%, previamente preparado, del cual se tomaron 750 mL con ayuda de una probeta. Posteriormente a esto, se selló el balón con papel parafilm y se almacenó en un lugar donde no tuviera contacto directo con la luz, por un periodo de ocho días a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este periodo, se procedió a filtrar el extracto para eliminar el material vegetal; esto se realizó con ayuda de un embudo Büchner acoplado a un Kitasato y una bomba de vacío; el filtrado se transfirió con ayuda de un embudo a un recipiente ámbar; se realizaron lavados al Kitasato con etanol absoluto, para evitar pérdidas de muestra, y el recipiente fue sellado con papel parafilm, para su previa evaporación del etanol.

Para la evaporación se utilizó el Rotavapor YAMATO RE 801; para ello se transfirió el contenido del recipiente ámbar a un balón de 1000 mL adaptable al rotavapor; para esto se utilizó un embudo, con el fin de evitar pérdidas de muestra, y se les realizaron lavados con etanol absoluto a las paredes del recipiente. Seguidamente se dio inicio a la evaporación del solvente, ajustando el baño maría del rotavapor a 70 °C y una rotación de 65 rpm durante aproximadamente 1 hora, hasta eliminar el etanol por completo y obtener el extracto acuoso, el cual fue almacenado en un frasco ámbar en refrigeración.

Una vez realizada la eliminación del etanol utilizado en la extracción por maceración los extractos procederán a llamarse extractos acuosos.

Figura 26. Extracto de las Hojas en Maceración

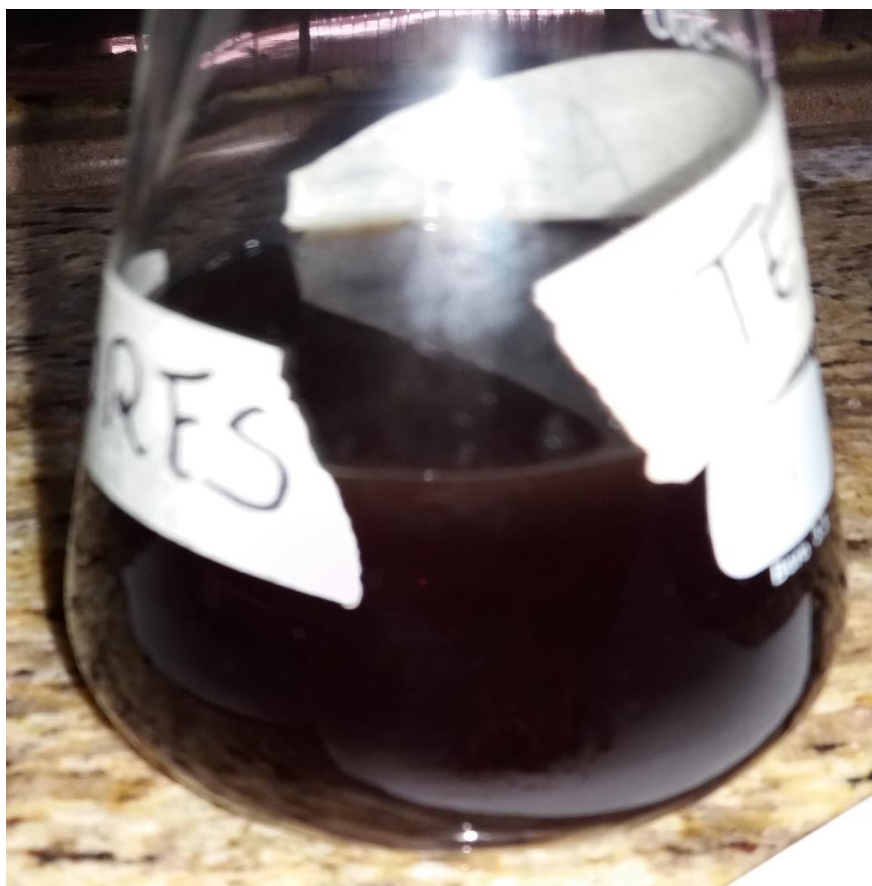


Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto hidroalcohólico de las flores de *Caesalpinia pulcherrima*.

Se realizó una metodología similar a la de la extracción hidroalcohólica con las hojas, con ciertas modificaciones, como que una vez transcurrido el tiempo de secado se separaron la mayor cantidad posible las flores de los tallos y hojas, con el fin de tener solamente flores y no otras partes de la planta que pudiesen interferir. Por otro lado, en este caso no se utilizó un balón; en lugar de este se utilizó un erlenmeyer de 500mL, donde se pesaron un total de 26,42 gramos de flores secas y se utilizaron 400 mL de etanol al 70%; se procedió a seguir los mismos pasos de la metodología antes mencionada.

Figura 27. Extracto de las Flores en Maceración

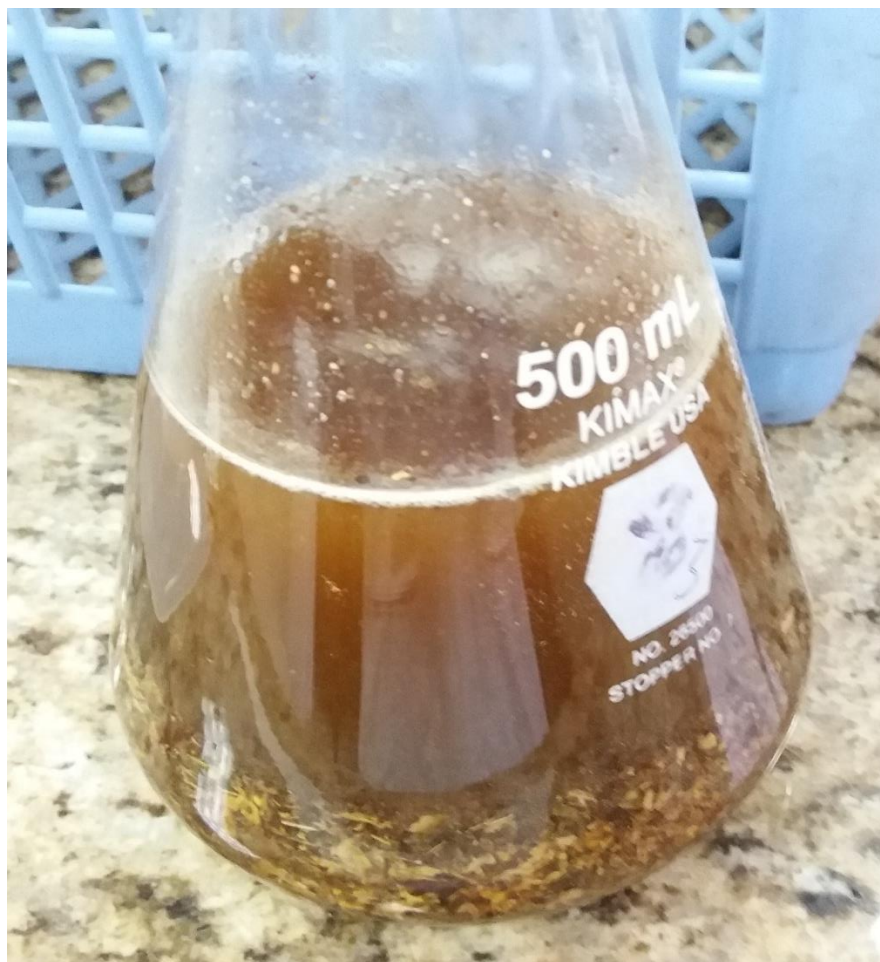


Nota: Elaboración propia.

Preparación del extracto hidroalcohólico de las vainas secas de *Caesalpinia pulcherrima*.

Se realizó una metodología similar a la de la extracción hidroalcohólica con las hojas, con ciertas modificaciones, como la limpieza de las vainas secas, que se realizó con una servilleta humedecida con agua destilada; una vez hecho esto, se procedió a secar los residuos de agua con servilletas, y se dejaron a la sombra por dos días. Transcurrido este tiempo, se molieron las vainas secas, con ayuda de una licuadora, hasta obtener un polvo grueso. Por otro lado, en este caso no se utilizó un balón, sino que, en lugar de este, se usó un erlenmeyer de 500mL, donde se pesaron un total de 101,39 gramos de vainas molidas y se utilizaron 300 mL de etanol al 70%; se procedió a seguir los mismos pasos de la metodología antes mencionada.

Figura 28. Extracto de las Vainas en Maceración



Nota: Elaboración propia.

Pruebas de Identificación

A continuación, se describen las pruebas de identificación realizadas a los diferentes extractos de la *Caesalpinia pulcherrima*, con el fin de obtener un análisis fitoquímico de los compuestos que estos puedan presentar; además, se mencionan los materiales y reactivos para la realización de las mismas.

Materiales y equipo

- Extractos de hojas, flores y vainas de *Caesalpinia pulcherrima*.
- Pinza para tubos de ensayo.
- Tubos de ensayo.
- Gotero.
- Beaker 250 mL.
- Gradilla de tubos de ensayo.
- Espátula.
- HCl al 10 %.
- Reactivo de dragendorff.
- Virutas de magnesio.
- Ácido acético.
- Ácido sulfúrico.
- Cloruro de hierro (III) al 10 %.

Identificación de alcaloides (Reactivo de Dragendorff)

En un tubo de ensayo limpio y seco se colocó 1mL del extracto previamente diluido con etanol; posteriormente se agregó 1mL de HCl al 10%. Realizada esta combinación, se procedió a calentar por 10 min y luego se enfrió a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó el reactivo de Dragendorff. El blanco se realizó siguiendo los mismos pasos, pero sin la adición del extracto vegetal.

Identificación de flavonoides (ensayo de Shinoda)

Para esta prueba se utilizó un tubo de ensayo limpio, donde se colocó 1 mL del extracto vegetal; posteriormente, en la capilla de extracción y con una pinza, se sostuvo el tubo de ensayo, al cual se le añadió una punta de espátula de virutas de magnesio y unas 10 gotas de HCl al 10%, con cuidado y por la pared del tubo. Se agitó suavemente y se observó el resultado. El blanco se preparó siguiendo los mismos pasos, pero sin la adición del extracto vegetal.

Identificación de triterpenos y/o esteroides

En un tubo de ensayo seco y limpio se colocó 1 mL del extracto vegetal diluido en etanol; seguidamente, se sostuvo con una pinza y se llevó a la capilla, donde se le adicionó 1 mL de

anhídrido acético, se agitó vigorosamente y, por último, con mucho cuidado, se agregaron 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Para la muestra blanco se hizo la misma metodología, pero sin la adición del extracto vegetal.

Identificación de fenoles

Se colocó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto diluido en etanol o agua; posteriormente se agregó 1 mL de FeCl_3 al 10%, se agitó y se observó la coloración. La muestra blanco consistía en la adición de 1 mL de etanol o agua sin el extracto vegetal y el mismo reactivo.

Identificación de saponinas

En un tubo de ensayo se colocó 3 mL del extracto acuso y se agitó vigorosamente por 1 minuto. Se observó el resultado transcurridos 15 minutos.

Formulación de una Crema a Base del Extracto Metanólico de las Vainas

En este segmento se describirán los pasos para la elaboración de una crema antibacteriana a base del extracto metanólico de las vainas. El propósito de esta elaboración es verificar si en una forma farmacéutica el extracto posee efecto antibacterial.

Materiales y equipo

- Balanza granataria.
- Beaker.
- Calentador-agitador.
- Espátula.
- Termómetro.
- Varilla de agitación.
- Tubo de aluminio.
- Pastilla de agitación.
- Alcohol cetílico.
- Ácido esteárico.

- Glicerina.
- Metilparabeno.
- Propilparabeno.
- Aceite mineral.
- Trietanolamina.
- Propilenglicol.
- Agua.

Formulación de la crema

Primeramente, se procedió a pesar los reactivos para esta formulación, y se rotularon respecto a su polaridad, como se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Formulación de 100 g de Crema

Reactivo	Cantidad (g)	Fase
Alcohol cetílico	2	I
Ácido esteárico	7	I
Glicerina	10	II
Metilparabeno	0.15	II
Propilparabeno	0.05	II
Aceite mineral	20	I
Trietanolamina	2	II
Propilenglicol	10	II
Extracto	3	
Agua c.s.p	100	II

Fase I: oleosa, Fase II: acuosa.

Nota: Elaboración propia.

En un beaker rotulado como 1 se colocó el alcohol cetílico, ácido esteárico y aceite mineral; se procedió a calentar en una plantilla a 70 °C y se agitó hasta disolver todos los compuestos. Simultáneamente, en un beaker 2 se colocó el propilenglicol con los parabenos, se agitó y calentó a 45 °C hasta disolver. En este mismo beaker 2, una vez disueltos los parabenos, se adicionó la glicerina y el agua; además, se aumentó la temperatura a 70 °C. Ambos beaker se mantuvieron en agitación por 20 minutos.

Posteriormente, se verificó que ambos beaker tuvieran una temperatura similar a 70 °C; al beaker 2 se le adicionó la trietanolamina. Una vez corroborado esto se vertió la fase I sobre la fase II y se agitó vigorosamente hasta formar una crema uniforme. Concluido este proceso, se pesó un total de 30 gramos de crema base, a los cuales se les añadieron 3 gramos del extracto de las vainas, con la finalidad de obtener una crema al 10%.

De los 30 gramos producidos se envasaron 20 gramos en un tubo de aluminio, el cual era el envase primario del producto, con el fin de protegerlo de factores externos que pudiesen afectar la estabilidad del producto terminado.

Medición de la Actividad Antimicrobiana

En este segmento se describirá paso a paso el proceso de cultivo de las bacterias, así como la adición de los extractos vegetales obtenidos, con la finalidad de poder obtener los resultados que esta investigación tiene como objetivo.

Preparación de las placas petri para el cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

En una placa petri estéril y con ayuda de una capilla de flujo laminar, se procedió a añadir una fina capa de aproximadamente 0,5 cm de un agar nutritivo, el cual se encontraba a una temperatura de 55 °C. Posteriormente se dejó solidificar el agar sobre la placa por aproximadamente 10 min. Con una pipeta plástica y estéril se realizaron los pocillos, donde se iban a colocar los extractos vegetales. Cabe destacar que se utilizaron 6 placas en total, 3 para *Staphylococcus aureus* y 3 para *Pseudomonas aeruginosa*; en cada placa se realizaron 4 pocillos, donde cada uno correspondía a las flores, hojas, vainas y blanco, y se separó por extracto metanólico, clorofórmico y acuoso, todo esto debidamente rotulado.

Cultivo de las bacterias e inoculación de los extractos vegetales

Una vez concluido con el proceso anterior, se cultivaron las bacterias en placas separadas y debidamente rotuladas; para esto se utilizó un aplicador estéril, el cual fue sumergido y humedecido en un medio con tioglicolato, que contenía la cepa de *Staphylococcus aureus* o *Pseudomonas aeruginosa*. Se procedió a rayar la placa con el aplicador y con cuidado de no romper el agar, en cuatro direcciones distintas.

Posteriormente, con una pipeta de 5 μ L se inocularon los extractos vegetales en los pocillos correspondientes; es importante destacar que, una vez inoculado el extracto, se procedió a cambiar la punta de la pipeta por una nueva y estéril. Concluido este proceso, se taparon las placas petri y se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

En cuanto a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), se realizó la misma metodología descrita anteriormente, con la diferencia que acá se utilizaron un total de 5 placas, 3 de *Staphylococcus aureus* y 2 de *Pseudomonas aeruginosa*, donde se hicieron entre 8 y 10 pocillos por placa, en la cuales se colocaron 5 μ L de los extractos diluidos que presentaron actividad antibacteriana. Las diluciones de los extractos se muestran a continuación:

Tabla 7. Diluciones de los Extractos de la *Caesalpinia pulcherrima*

Extracto	Concentración de partida	Dilución	Concentración final
Flores cloroformo	0,3754 g/mL	1:2	0,1251 g/mL
	0,1251 g/mL	1:1	0,0626 g/mL
	0,0626 g/mL	1:2	0,0208 g/mL
Hojas cloroformo	0,0695 g/mL	1:2	0,0232 g/mL
	0,0232 g/mL	1:1	0,0158 g/mL
	0,0158 g/mL	1:1	0,0057 g/mL
Flores acuosas	100 %	4:1	75 %
		4:2	50 %
		4:3	25 %
Hojas acuosas	100 %	4:1	75 %
		4:2	50 %
		4:3	25 %
Vainas acuosas	100 %	4:1	75 %
		4:2	50 %
		4:3	25 %

Flores metanol	100 %	1:1	50 %
	50 %	1:1	25 %
	25 %	1:1	12,5 %
Hojas metanol	100 %	1:1	50 %
	50 %	1:1	25 %
	25 %	1:1	12,5 %
Vainas metanol	100 %	1:1	50 %
	50 %	1:1	25 %
	25 %	1:1	12,5 %

Nota: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos serán expresados mediante tablas en el caso de las pruebas de identificación; además, con la ayuda de gráficos, se explicará la actividad antibacteriana de cada extracto obtenido; el procedimiento será expuesto mediante la utilización de fotografías del proceso.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo se reportan los datos obtenidos durante la elaboración del proyecto mediante tablas y figuras que representen de una forma más sencilla y versátil la interpretación de los resultados; así mismo, se ordena de una manera secuencial con respecto a cómo se fue realizando cada uno de los pasos. Este segmento tiene como finalidad analizar la actividad antibacteriana de la *Caesalpinia pulcherrima* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Obtención de los Extractos de las Flores, Hojas y Vainas de la *Caesalpinia pulcherrima*

La primera etapa de la investigación consistió en la obtención de los extractos crudos de las flores, hojas y vainas secas mediante las técnicas de extracción de maceración con etanol al 70% y soxhlet con cloroformo y metanol. Para esto se secaron las flores y hojas a la sombra durante un periodo de siete días, con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua presente en el material vegetal; además, se molieron las vainas secas, con el propósito de tener una mayor superficie de contacto y poder extraer la mayor cantidad de compuestos.

El material vegetal fue recolectado en la provincia de Limón, específicamente en la zona de Siquirres durante el periodo de enero a marzo del 2019; se recolectaron para toda la investigación aproximadamente 500 gramos de flores, 1 kilo de vainas y 800 gramos de hojas. Su almacenamiento posterior al secado fue una bolsa de cierre hermético, en un lugar fresco con una temperatura entre 20 y 27 °C; además, la identificación botánica de la planta fue realizada por el botánico Rafael Acuña.

Figura 30. Recolección de la Planta *Caesalpinia pulcherrima* en la Zona de Siquirres



Nota: Elaboración propia.

Extracción de las flores, hojas y vainas secas con el equipo soxhlet utilizando como solvente metanol y cloroformo

Los resultados obtenidos para la extracción mediante esta técnica con los distintos solventes y materiales vegetales se describen en la tabla 5, donde se muestran las cantidades utilizadas de material vegetal y porcentaje de rendimiento.

Tabla 8. Porcentaje de Extracción Obtenidos con el Equipo Soxhlet para las Diversas Partes de la Planta *Caesalpinia pulcherrima*

Tipo de extracto	Cantidad utilizada de material vegetal	Cantidad extraída	Porcentaje de extracción
Hojas cloroformo	13,37 g	0,1875 g	1,4024 %
Flores cloroformo	23,61 g	0,8016 g	3,3951 %
Vainas cloroformo	104,35 g	0,4142 g	0,3969 %
Hojas metanol	16,22 g	1,3596 g	8,3822 %
Flores metanol	18,95 g	1,8631 g	9,8317 %
Vainas metanol	108,16 g	6,7498 g	6,2406 %

Nota: Elaboración propia.

Ecuación 1. Cálculo del Rendimiento de Extracción Obtenido con el Equipo Soxhlet

$$\text{Rendimiento de la extracción} = \frac{\text{cantidad obtenida del extracto}}{\text{cantidad utilizada de material vegetal}} \times 100$$

La selección del cloroformo y metanol se basó en estudios realizados por distintos autores, quienes buscaban realizar extractos de la *Caesalpinia pulcherrima* con la finalidad de elucidar compuestos o determinar actividad antibacteriana. Es por ello que se eligieron estos solventes y esta técnica de extracción, debido a que, según lo investigado, mostraba mejores resultados. Además, se buscaba la extracción de compuestos polares y no polares con el propósito de identificar con cuál extracto se podía obtener una mayor actividad antibacteriana.

Los pesos utilizados se basaron en la capacidad del cartucho del equipo soxhlet; además, se colocó una cantidad de solvente abundante con el propósito de poder extraer la mayor cantidad de compuestos y evitar la saturación del solvente; esto se realizó mediante una extracción continua por un periodo de 4 horas, donde el solvente se encontraba en constante ebullición; se observó que se dieron unas 5-6 vueltas del solvente sobre el material vegetal.

Posteriormente a este proceso, se almacenó el extracto en el mismo balón y se selló con papel parafilm en refrigeración a una temperatura de 8 °C para evitar pérdidas; al día siguiente, con ayuda de un embudo de espiga, se trasvasó el contenido a un balón de 500 mL

adaptable al rotavapor, porque la cantidad de solvente utilizada fue de 300 mL. Cabe destacar que se le hicieron lavados al balón con el cual se realizó la extracción con el solvente correspondiente, para evitar pérdidas del extracto. Al rotavapor se le ajustó una bomba de succión para generar un vacío en el sistema, y así utilizar una menor temperatura para evaporar el solvente, evitando algún tipo de descomposición de los compuestos presentes en el extracto.

Aunado a esto, cuando se observó una considerable disminución del solvente, se procedió a trasvasar el contenido a un balón de 50 mL, con el fin de ir concentrando la muestra y evitar pérdidas cuando se recolectara el extracto, dado que los extractos clorofórmicos se presentaron en forma de ceras, y solían adherirse a las paredes del balón una vez que se retiraba del baño maría; es por ello que se realizaron lavados con el mismo solvente a las paredes del balón para así poder concentrarlo. En cuanto a los extractos metanólicos, las flores, vainas y hojas mostraron una consistencia líquida-viscosa. En la tabla 6 se muestran las características de los extractos obtenidos con cada uno de los solventes.

Tabla 9. Características de los Extractos Obtenidos Mediante el Equipo Soxhlet

Característica organoléptica	Extractos clorofórmicos			Extractos metanólicos		
	Hojas	Flores	Vainas	Hojas	Flores	Vainas
Apariencia	Cera muy pegajosa	Cera ligeramente dura	Cera suave	Líquido viscoso	Líquido muy viscoso	Líquido muy viscoso
Color	Verde musgo	Amarillo oscuro	Café	Verde oscuro	Amarillo oscuro	Rojizo oscuro
Olor	Igual a las hojas de la planta, pero más concentrado	Muy fuerte, similar a las flores	Amaderado	Similar a las hojas, pero un poco más fuerte	Igual a las flores	Amaderado

Nota: Elaboración propia.

Extracción de las flores, hojas y vainas secas por medio de maceración utilizando etanol al 70%

La elección de esta técnica de extracción se basó en el estudio realizado por Ribeiro y Lobo en 2016, donde buscaban actividad antibacteriana de la *Caesalpinia pulcherrima*; ellos mostraron que mediante la maceración era posible obtener extractos con efecto antibacteriano. En las preparaciones para maceración, en el caso de las hojas, se utilizó un balón de 1000 mL, porque el equipo de laboratorio solo contaba con una balón de dicha capacidad; fue por ello que para los demás extractos se utilizó un erlenmeyer de 500 mL, donde se depositó la máxima cantidad de flores y vainas, considerando que la adición del solvente, que en este caso fue etanol al 70%, no rebalsara el recipiente; el etanol al 70% fue preparado con un balón aforado de 1000 mL y etanol absoluto, para así obtener una concentración más exacta. Dichas preparaciones de los extractos se taparon con papel parafilm y se almacenaron durante 8 días, en un lugar donde no tuviese contacto con la luz y con una temperatura menor a 25 °C, para evitar algún tipo de descomposición de los compuestos.

Posteriormente a este lapso, se procedió a filtrar cada extracto mediante un embudo buchner con papel filtro y con una bomba de vacío, dado que existían residuos pequeños de material vegetal que podían interferir los análisis de los extractos, como se muestra en las figuras 31 y 32. Cabe destacar que las flores no presentaron liberación de residuos.

Figura 31. Residuos de las Vainas Posterior a la Filtración



Nota: Elaboración propia.

Figura 32. Residuos de las Hojas Posterior a la Filtración



Nota: Elaboración propia.

Por otra parte, una vez filtrado el extracto se llevó al rotavapor, con el propósito de eliminar el etanol y obtener el extracto acuoso; para ello se trasvasó el contenido filtrado a un balón de 500 mL para el caso de las flores y vainas, y a un balón de 1000 mL para las hojas; es importante destacar que se realizaron lavados con etanol absoluto a las paredes del kitasato donde fue filtrado el extracto; se utilizó etanol absoluto, dado que no le agregaba agua al extracto acuoso y se iba a evaporar con el resto de etanol. La evaporación se llevó a cabo por un periodo de 2 horas aproximadamente o hasta ver que ya no se condensaba el etanol en el refrigerante del rotavapor. Sucedió esto, se almacenó el extracto acuoso en una botella ámbar y en refrigeración, para evitar algún tipo de descomposición.

Los resultados obtenidos para la extracción, mediante la técnica de maceración con etanol al 70%, se describen en la tabla 7, donde se muestran las cantidades utilizadas de material vegetal y porcentaje de rendimiento.

Tabla 10. Cantidad Extraída con la Técnica de Maceración para las Diversas Partes de la Planta *Caesalpinia pulcherrima*

Parte de la planta	Peso del material vegetal	Volumen de etanol 70 %	Cantidad extraída
Hojas	30,18 g	750 mL	230 mL
Flores	26,42 g	400 mL	80 mL
Vainas	101,39 g	300 mL	64 mL

Nota: Elaboración propia.

Por otro lado, se determinaron las características organolépticas de los extractos acuosos, las cuales se describen a continuación, en la tabla 11.

Tabla 11. Características de los Extractos Acuosa Obtenidos Mediante Maceración

Característica organoléptica	Extractos acuosa		
	Hojas	Flores	Vainas
Apariencia	Líquido amarillento con solutos verdes	Líquido un poco denso	Líquido fluido
Color	Amarillo claro	Cereza intenso	Vino
Olor	Muy leve a hojas	Suave olor a flores	Leve aroma amaderado

Nota: Elaboración propia.

Pruebas de Identificación para el Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Obtenidos de la *Caesalpinia pulcherrima*

En la realización del tamizaje fitoquímico se tomaron en cuenta las pruebas más representativas, dentro de las cuales se destacan flavonoides, triterpenos y esterolea, fenolea y taninoa, alcaloidea y saponinaa. Los extractoa, en el caso de ser ceraa, como loa clorofórmicoa, se diluyeron en etanol absoluto, de igual forma loa metanólicoa y acuosa, porque la mayoría de laa pruebaa tienen como requisito que el extracto se encuentre diluido en este solvente. Para esto se tomó una pequeña cantidad del extracto (acuoso, clorofórmico y metanólico), se depositó en un vial y se adicionaron 15 mL de etanol absoluto.

Tabla 12. Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de *Caesalpinia pulcherrima*

Prueba fitoquímica	Extracto clorofórmico			Extracto metanólico			Extracto acuoso		
	Flores	Hojas	Vainas	Flores	Hojas	Vainas	Flores	Hojas	Vainas
Flavonoides	-	-	-	+++	+++	++	+++	+++	+++
Triterpenos y esteroides	+++	+++	-	+++	+++	+++	+	-	+
Fenoles y taninos	-	-	-	++	++	++	+++	++	+++
Alcaloides	-	-	-	-	-	++	-	-	+++
Saponinas	-	-	-	-	++	+++	-	++	++

(+++) = muy positivo; (++) = positivo; (+) levemente positivo; (-) negativo.

Nota: Elaboración propia.

Identificación de flavonoides: Ensayo de Shinoda

Según Bagnarello (s.f.), la presencia de flavonoides muestra coloraciones rojas, rosadas, naranjas y violetas; es por ello que los extractos metanólicos y acuosos presentaron resultados positivos, como se muestra en la tabla 9. Por otro lado, los extractos clorofórmicos no presentaron la presencia de estos compuestos, lo cual se podría relacionar con que estos extractos son no polares y, por tanto, no tienen la capacidad de extraer los flavonoides; además, que al momento de disolver las ceras quedaron suspendidas partículas insolubles, debido a que el solvente utilizado era polar.

Figura 33. Identificación de Flavonoides en los Extractos Acuósos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 34. Identificación de Flavonoides en los Extractos Acuósos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 35. Identificación de Flavonoides en los Extractos Metanólicos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 36. Identificación de Flavonoides en los Extractos Metanólicos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 37. Identificación de Flavonoides en los Extractos Clorofórmicos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 38. Identificación de Flavonoides en los Extractos Clorofórmicos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Identificación de triterpenos y esteroides: ensayo de Libermann-Burchard

La presencia de coloraciones azules, violetas, verdes y rojas es un indicativo de la presencia de triterpenos y esteroides, tal y como lo indica Bagnarello en su Protocolo de

tamizado fitoquímico, por lo que se puede afirmar que en los extractos metanólicos fue donde se pudo encontrar una mayor cantidad de triterpenos, seguido por el extracto clorofórmico y, por último, en menor proporción en los acuosos, debido a su alta polaridad y por la técnica de extracción que no involucraba aplicación de calor, por lo que no es capaz de disolver estas unidades terpenoides tan poco polares.

Figura 39. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Acuosos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 40. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Acuosos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

**Figura 41. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos metanólicos
Antes de la Prueba**



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

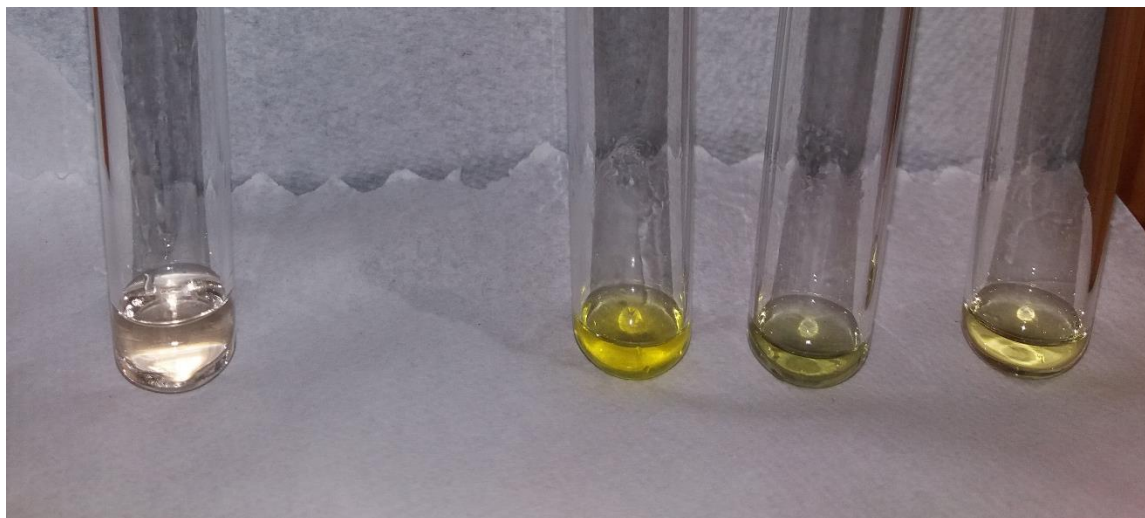
**Figura 42. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Metanólicos
Posterior a la Prueba**



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

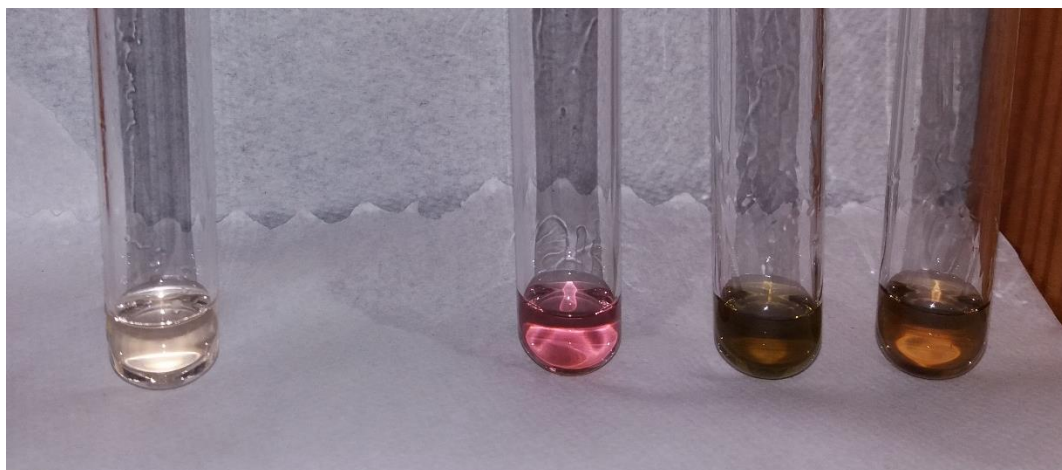
Figura 43. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Clorofórmicos antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 44. Identificación de Triterpenos y Esteroles en los Extractos Clorofórmicos Posterior a la Prueba



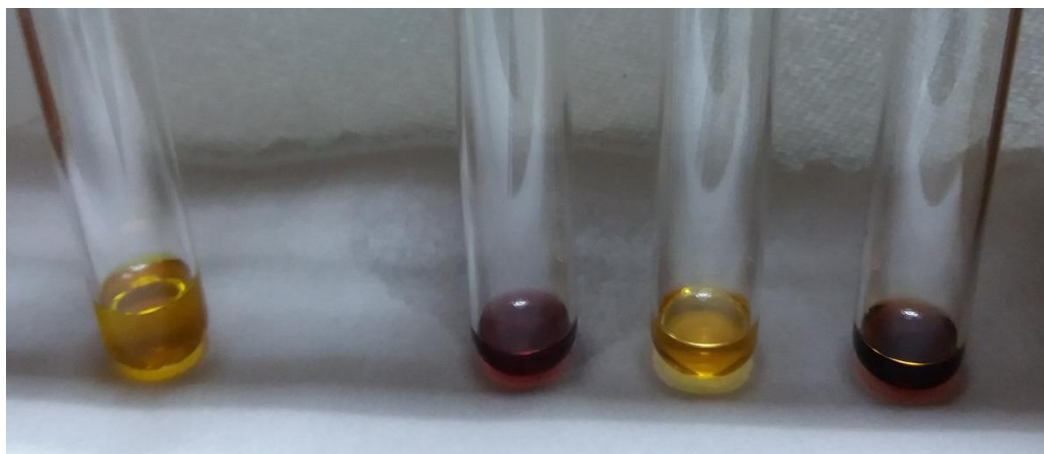
De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Identificación de fenoles y taninos

De acuerdo con la tabla 9, se puede observar la presencia de fenoles y taninos en los extractos acuosos y metanólicos; esto se relaciona con la capacidad de estos compuestos para formar puentes hidrógeno, por lo que esta prueba es un indicador positivo, en contraste con los resultados clorofórmicos, de los cuales ninguno presentó un cambio de color positivo al ser extractos no polares. Según lo descrito por Bagnarello, estos compuestos tienden a formar precipitados y coloraciones verdes para taninos hidrolizables o azules para taninos condensados. Por otro lado, Carvajal, Hata, Sierra y Rueda (2009) mencionan que los fenoles pueden formar colores rojos, azules, verdes o morados, lo cual también es indicativo de la presencia de estos en los extractos acuosos y metanólicos.

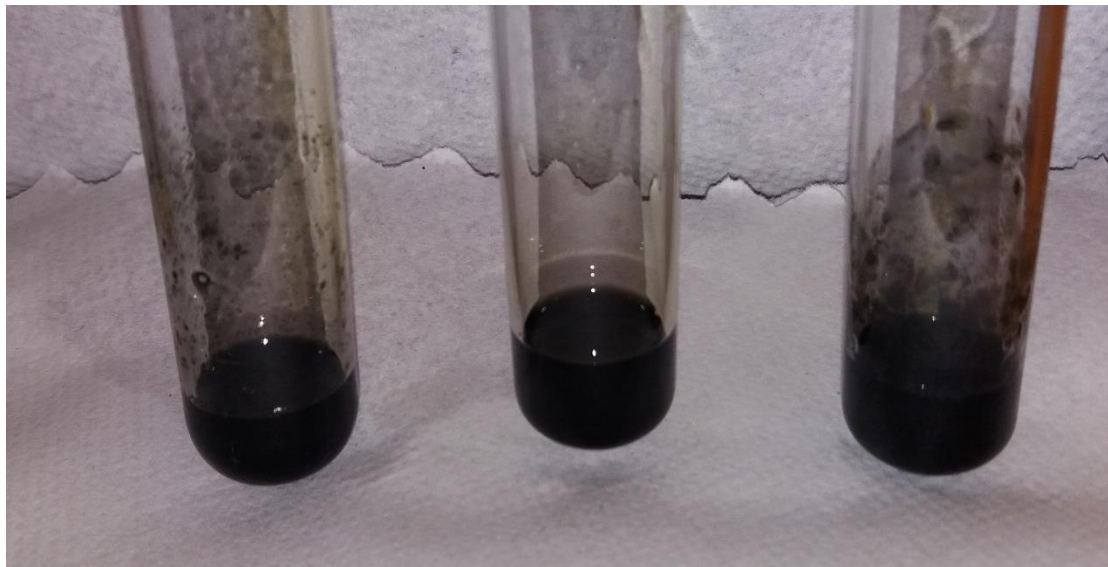
Figura 45. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Acuosos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

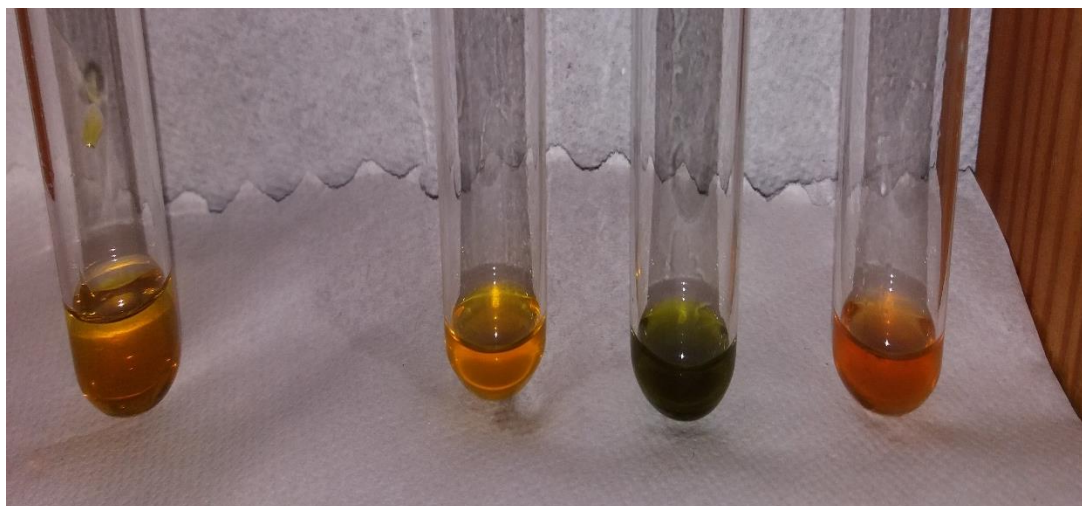
Figura 46. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Acuosos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

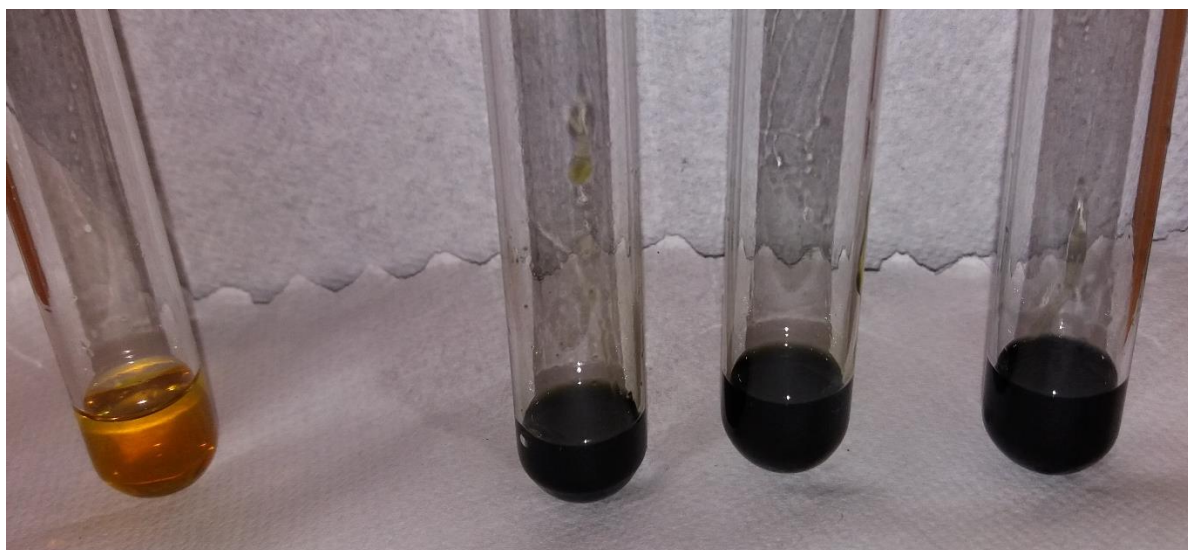
Figura 47. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Metanólicos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

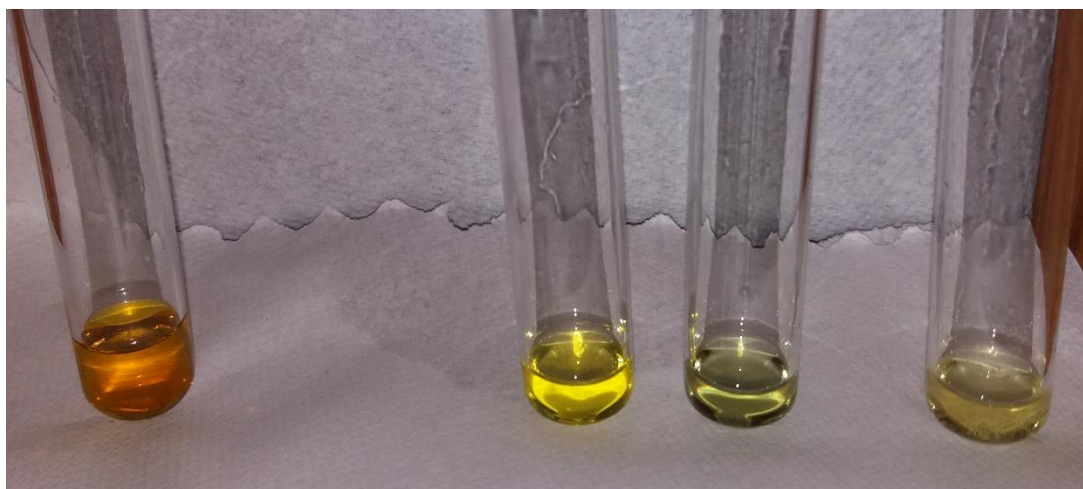
Figura 48. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Metanólicos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 49. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Clorofórmicos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

**Figura 50. Identificación de Fenoles y Taninos en los Extractos Clorofórmicos
Posterior a la Prueba**



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

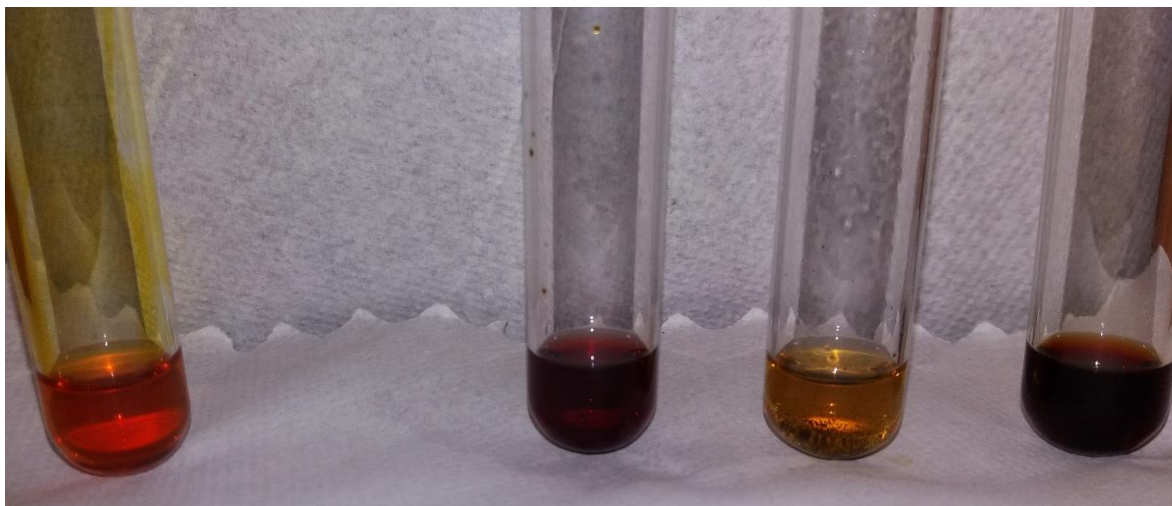
Nota: Elaboración propia

Identificación de alcaloides: Reactivo de Dragendorff

Con respecto a las figuras 51-54, se observa que la reacción resultó ser positiva para los extractos con las vainas en metanol y acuosas, al presentar un precipitado color crema cuando se dio la adición del reactivo, lo cual coincide con lo descrito por Bagnarello, quien menciona que una leve turbidez o precipitado rojo, naranja, blanco, crema o marrón es indicador de la presencia de alcaloides.

Por otro lado, los extractos clorofórmicos no reaccionaron frente a este; es posible que al utilizar un solvente de diferente polaridad la disolución de compuestos no sea la adecuada y fluctúen los resultados. Cabe destacar que los extractos que se encontraban disueltos en etanol se evaporaron hasta la sequedad, porque el etanol es capaz de disolver el precipitado por el cual la prueba indica que es positivo.

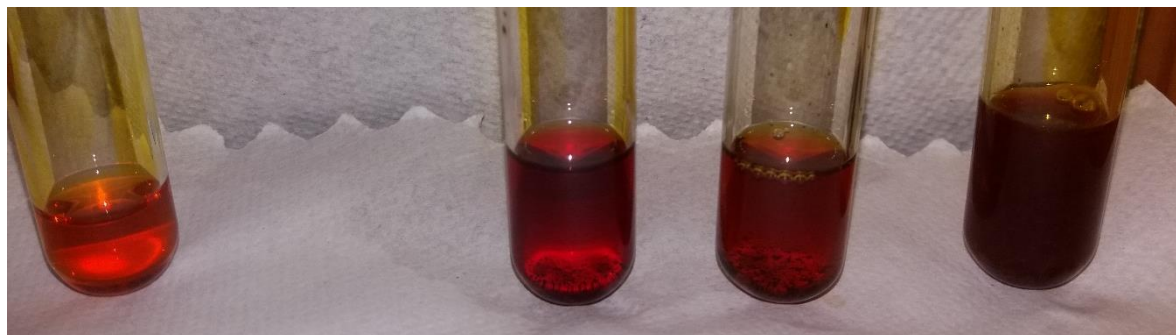
Figura 51. Identificación de Alcaloides en los Extractos Acuosos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

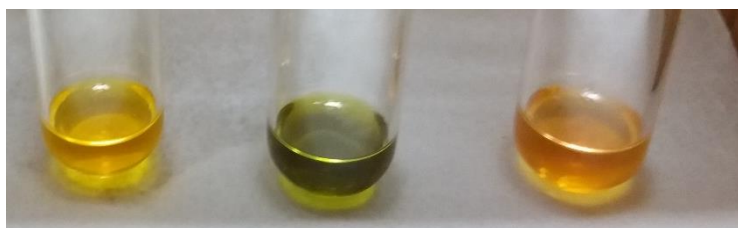
Figura 52. Identificación de Alcaloides en los Extractos Acuosos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 53. Identificación de Alcaloides en los Extractos Metanólicos Antes de la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 54. Identificación de Alcaloides en los Extractos Acuósos Posterior a la Prueba



De izquierda a derecha el orden va: blanco, flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Identificación de Saponinas

En relación con la tabla 12, la presencia de saponinas se dio en los extractos metanólicos y acuósos de las hojas y vainas, debido a que este tipo de compuestos posee la característica de formar espuma luego de una agitación vigorosa. Tal como lo indica Bagnarello, la espuma debe permanecer por al menos 15 minutos para obtener un resultado positivo. Los extractos clorofórmicos no presentaron presencia de estos compuestos.

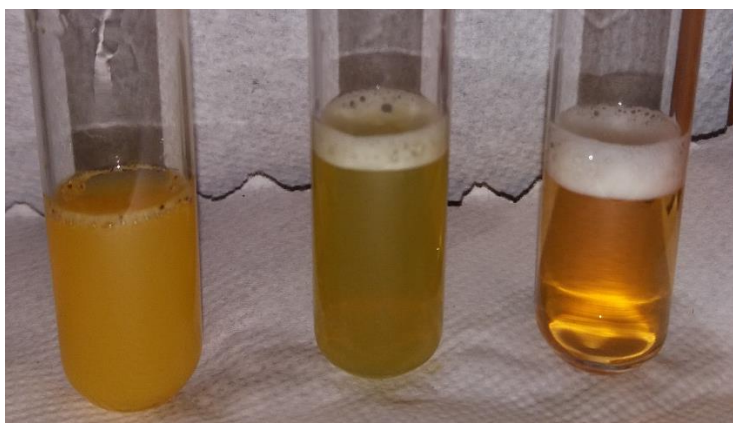
Figura 55. Identificación de Saponinas en los Extractos Acuósos



De izquierda a derecha el orden va: flores, hojas y vainas.

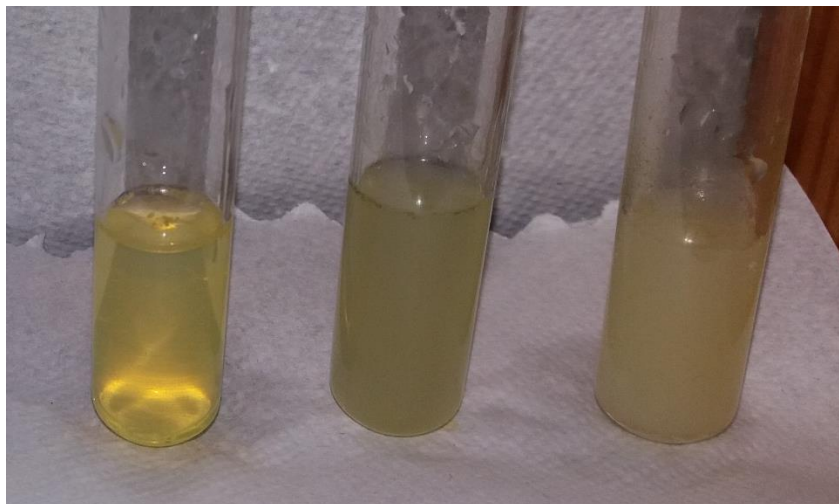
Nota: Elaboración propia.

Figura 56. Identificación de Saponinas en los Extractos Metanólicos



De izquierda a derecha el orden va: flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Figura 57. Identificación de Saponinas en los Extractos Clorofórmicos

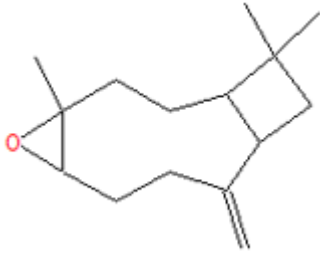
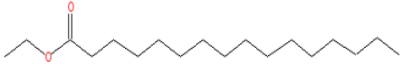
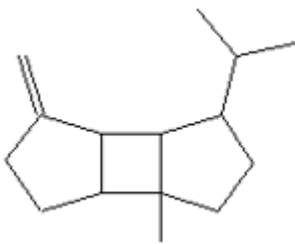
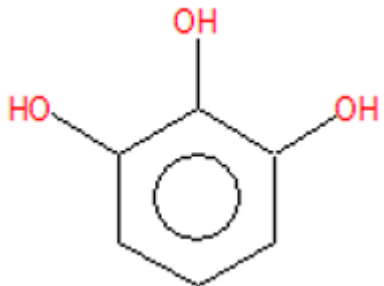
De izquierda a derecha el orden va: flores, hojas y vainas.

Nota: Elaboración propia.

Caracterización por Cromatografía de Gases Acoplada a un Detector de Masas de los Extractos Clorofórmicos y Metanólicos

Para una identificación más exacta y precisa de los compuestos presentes en los extractos obtenidos a través del equipo soxhlet, se empleó un análisis por cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS), lo cual es un método de caracterización química confiable que permite determinar estructuras moleculares y sus cantidades presentes en la muestra analizada.

Tabla 13. Resultados Obtenidos Mediante el Análisis de GC-MS

Extracto	Estructura	Componente	Tiempo de retención (min)	Probabilidad de coincidencia (%)
Flores cloroformo		Óxido de cariofileno	10.003	68.7
Hojas cloroformo		Ácido hexadecanoico etil-éster	14.060	77.8
Vainas cloroformo		[1,2:3,4]dicyclopentodecahidro-3a-metil-6-metileno-1-(metiletil)-ciclobutano	8.265	76.6
Flores metanol	-	-	-	-
Hojas metanol	-	-	-	-
Vainas metanol		1,2,3-Benzenotriol	8.737	80.9

Nota: Elaboración propia.

Se observa mediante el análisis que los compuestos mayoritarios en el caso de los extractos hechos con cloroformo, se asocian a compuestos no polares como terpenos y derivados de ácidos grasos saturados como lo fue el ácido hexadecanoico etil-éster; esto se relaciona con la hidrofobicidad del solvente y las estructuras presentes en las flores, hojas y vainas. El porcentaje de coincidencia fue del 68,2% para el óxido de cariofileno en flores, un 77,8% ácido hexadecanoico etil-éster en hojas y 76,6 % [1,2:3,4] dicitropenteno-decahidro-3a-metil-6-metileno-1-(metiletil)-ciclobutano en vainas, por lo que existe una alta probabilidad de que los resultados de actividad antibacteriana se asocien a estos compuestos.

Por otro lado, en el análisis de GC-MS para los extractos metanólicos, se observó que las hojas y flores no pudieron ser cuantificadas por el equipo, debido a la presencia de resinas en el extracto, que interfirieron al momento de realizar la lectura con el detector. Sin embargo, las vainas mostraron la presencia de 1,2,3-benzenotriol con un 80,9% de coincidencia; este es un polifenol, al cual se le confiere actividad antibacteriana por el tipo de grupo funcional que presenta.

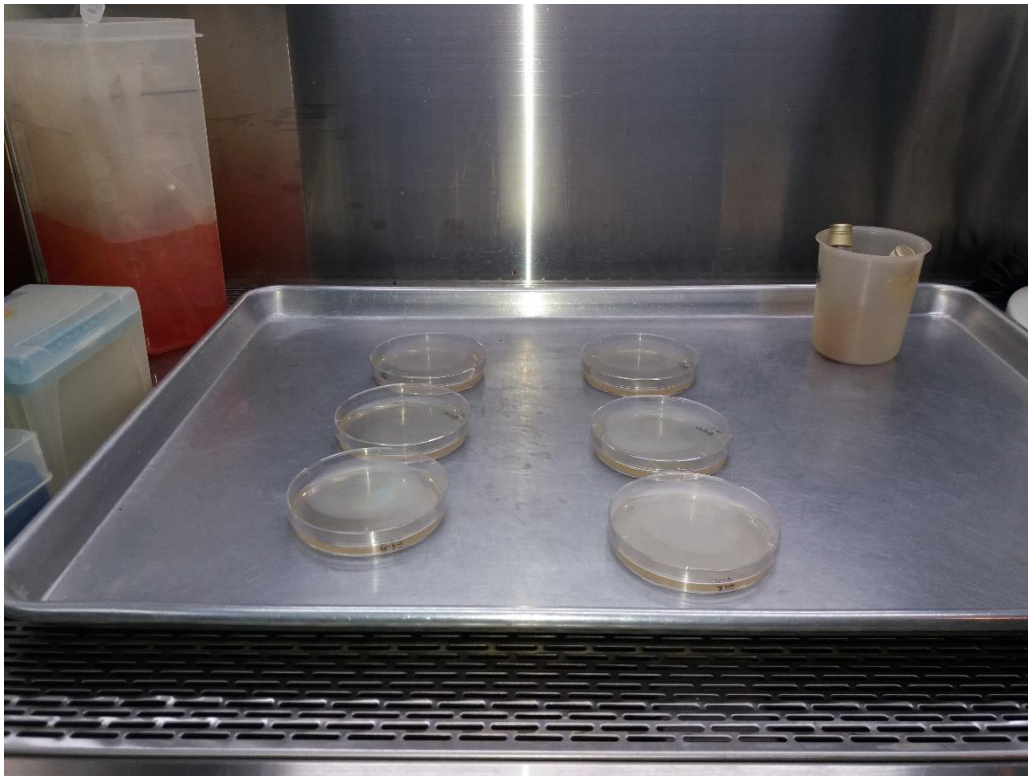
Cabe destacar que a los extractos acuosos no se les realizó este análisis, debido a que el equipo utilizada era externo a la universidad, lo cual refiere que se debían enviar las muestras un mes antes para su análisis, y las mismas estuvieron listas el 11 de marzo de 2019, por razones de recolección de la planta. Es por ello que no se le realizó dicho análisis.

Análisis de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Obtenidos por Diferentes Técnicas de la *Caesalpinia pulcherrima*

La evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante la técnica de Kirby-Bauer, la cual consistía en la utilización de placas Petri con un agar nutritivo, donde favoreciera el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Es importante destacar que las cepas se encontraban en un medio denominado tioglicolato, que favorece al crecimiento exponencial de las bacterias para poder ser replicadas en la placa con el agar correspondiente. Todo el proceso de manipulación de bacterias, preparación de los medios de cultivo e inoculación de los extractos se realizó en una capilla de flujo laminar

y con materiales estériles, como se observa en la figura 51. Todo este proceso se llevó a cabo en los laboratorios Microlabs, en Guadalupe, bajo la supervisión del Dr. Roldán Ajún Chaverri; además; las cepas utilizadas son propias de la compañía, con una pureza e identificación del 99.99999%.

Figura 58. Capilla de Flujo Laminar con Placas de Agar Nutritivo para el Cultivo de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

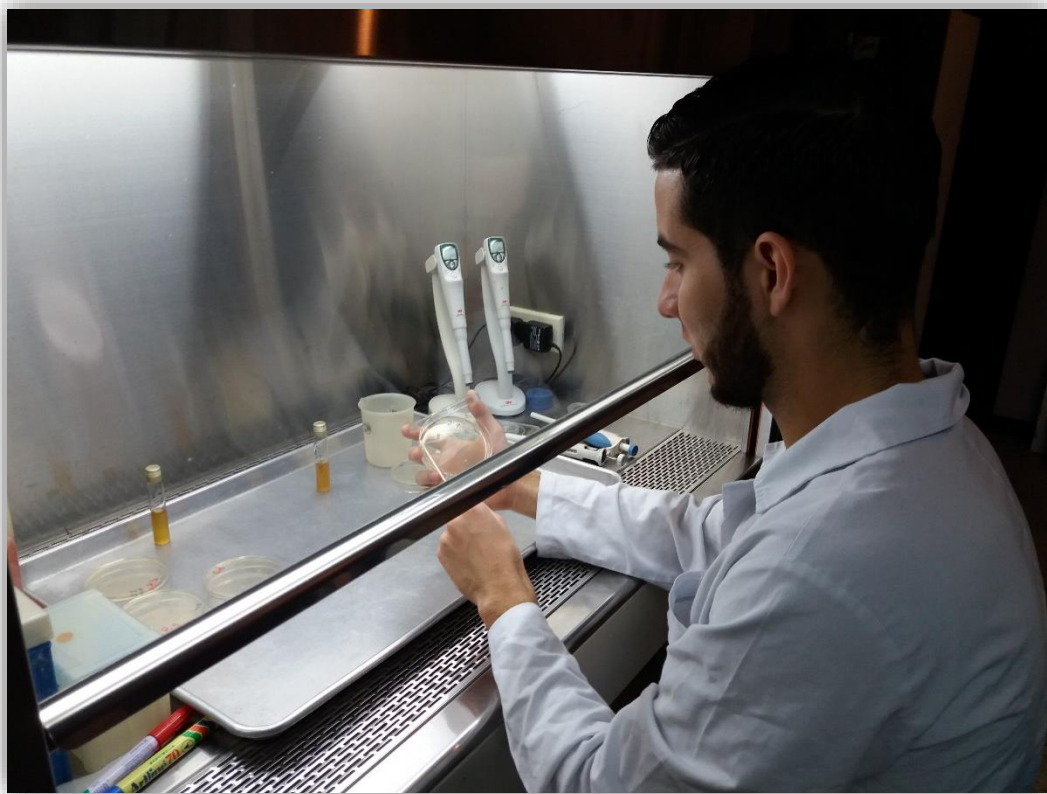


Nota: Elaboración propia.

Las placas para los medios de cultivo se separaron por bacterias y por tipo de solvente utilizado; es por ello que se utilizaron tres placas para *S. aureus* y tres para *P. aeruginosa*; cada una de ellas portaba extractos metanólicos, clorofórmicos y acuosos. Se hizo dicha separación para observar, de una mejor manera, los halos de inhibición que pudiesen generar los extractos; así mismo, se buscaba evitar algún tipo de contaminación cruzada en caso de que alguno de los solventes fuese a afectar todo el medio de cultivo. Las placas fueron debidamente rotuladas; se procedió a realizar los pocillos dentro del agar con ayuda de una

pipeta plástica; estos tenían una capacidad de 5 μL , que fue la cantidad agregada del extracto; seguidamente, el rayado de la placa fue en cuatro direcciones, para tener un crecimiento uniforme de bacterias y, con ello, eliminar cualquier tipo de fluctuación al momento de observar los crecimientos bacterianos.

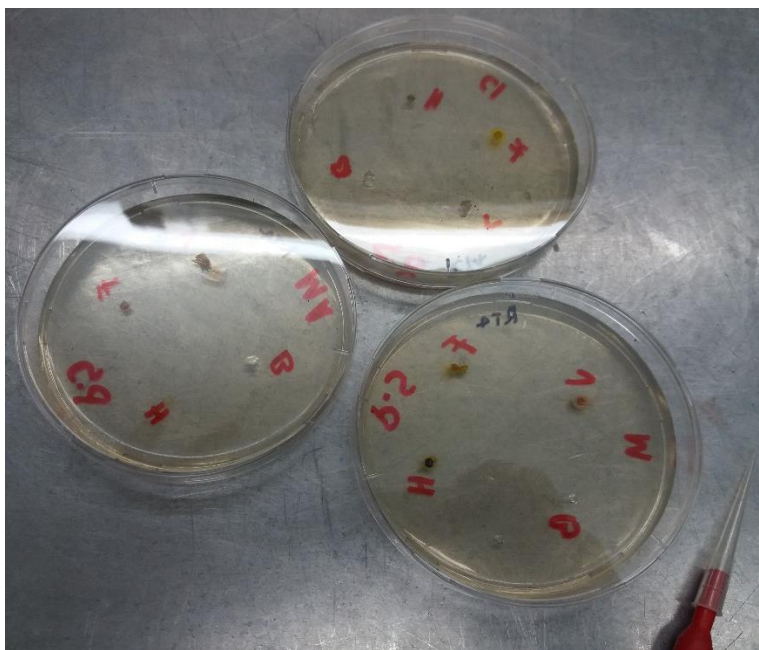
Figura 59. Rayado de la Placa con la Solución de Tioglicolato Rica en Bacterias de *Staphylococcus aureus*



Nota: Elaboración propia.

Cabe destacar que, para cada adición del extracto a la placa se utilizó una punta pipeta estéril sin combinar o reutilizar para los demás extractos; esto no solo varió por extracto, sino también por placa de bacterias, debido a que se podía dar una contaminación cruzada. Concluido dicho proceso, se dejaron difundir los 5 μL del extracto a través de la placa y, seguidamente, se colocó en la incubadora a $37,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

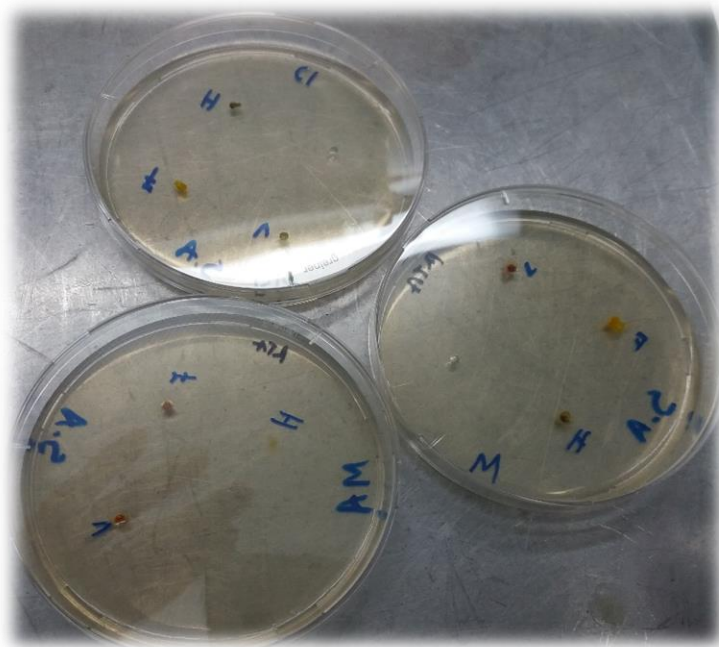
Figura 60. Placas de *Pseudomonas aeruginosa* con los Inóculos del Extracto



P.S: *Pseudomonas aeruginosa*, F: flores, H: hojas, V: vainas, B: blanco, M: metanol, MA: maceración y Cl: cloroformo

Nota: Elaboración propia.

Figura 61. Placas de *Staphylococcus aureus* con los Inóculos del Extracto



S.A: *Staphylococcus aureus*, F: flores, H: hojas, V: vainas, M: metanol, MA: maceración y Cl: cloroformo

Nota: Elaboración propia.

Tabla 14. Concentraciones de los Extractos Colocados en las Placas de Crecimiento Bacteriano

	Extractos clorofórmicos			Extractos metanólicos			Extractos acuosos		
	Flores	Hojas	Vainas	Flores	Hojas	Vainas	Flores	Hojas	Vainas
Concentración	0,3754 g/mL	0,0695 g/mL	0,1068 g/mL	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
Cantidad colocada	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Blanco	Cloroformo			Metanol			Agua		

Nota: Elaboración propia.

Para la elaboración de las concentraciones de los extractos a colocar en los medios de cultivo se utilizó, en el caso de las flores, una balanza analítica, debido a que estos se presentaron en forma de ceras; en esta se pesaron 0,7508 g del extracto de flores, 0,139 g del extracto de hojas y 0,2136 g del extracto de vainas; cada uno de ellos se diluyó con 2 mL de cloroformo, con la finalidad de disolver todos los compuestos extraídos, y así evitar fluctuaciones en la medición de la actividad antibacteriana.

Por otro lado, los extractos metanólicos y acuosos se utilizaron puros, dado que se presentaron en forma líquida, y no era posible cuantificar una masa exacta de los compuestos presentes. A razón de esto, se asumió el extracto puro como una concentración del 100%.

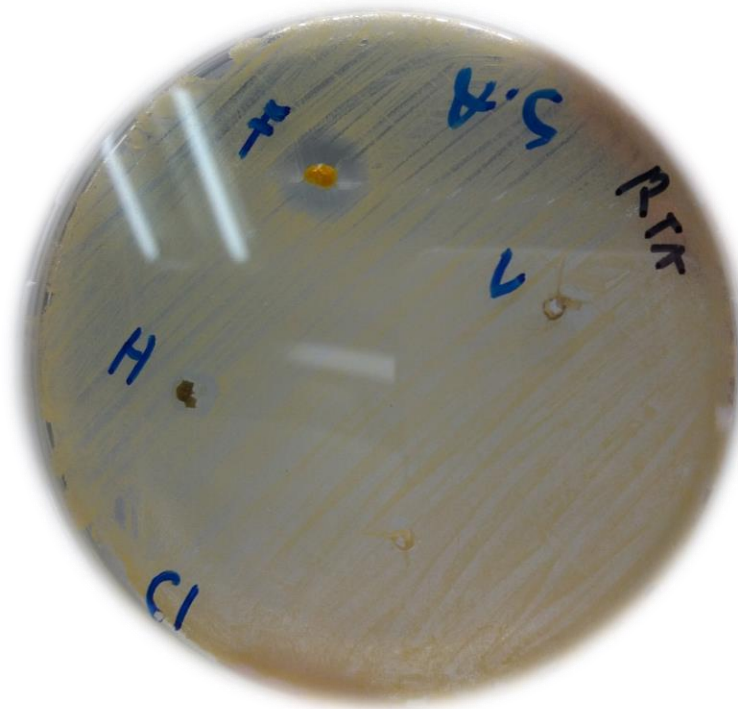
Tabla 15. Halos de Inhibición Obtenidos de los Extractos de *Caesalpinia pulcherrima*

Bacteria	Halos de inhibición extractos clorofórmicos			Halos de inhibición extractos metanólicos			Halos de inhibición extractos acuosos		
	Flores	Hojas	Vainas	Flores	Hojas	Vainas	Flores	Hojas	Vainas
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 mm	5 mm	0 mm	15 mm	13 mm	20 mm	10 mm	5 mm	13 mm
Blanco	0 mm			0 mm			0 mm		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 mm	0 mm	0 mm	0 mm	4 mm	10 mm	5 mm	0 mm	6 mm
Blanco	0 mm			0 mm			0 mm		

Nota: Elaboración propia.

Como se observa en la tabla anterior, el extracto clorofórmico con mayor actividad sobre *Staphylococcus aureus* fue las flores con 10 mm de halo de inhibición, seguido de las hojas con 5 mm y las vainas no mostraron efecto inhibitorio. Según Bermúdez, Granados y Molina (2019), el óxido de cariofileno posee una actividad inhibitoria leve sobre bacterias grampositivas y gramnegativas; aunado a esto, Rodríguez, Zarate y Sánchez mencionan que los terpenoides son capaces de desestabilizar la membrana interna y afectar la permeabilidad ocasionando la lisis bacteriana; por esta razón se explica el efecto antibacteriano del óxido de cariofileno presente en las flores.

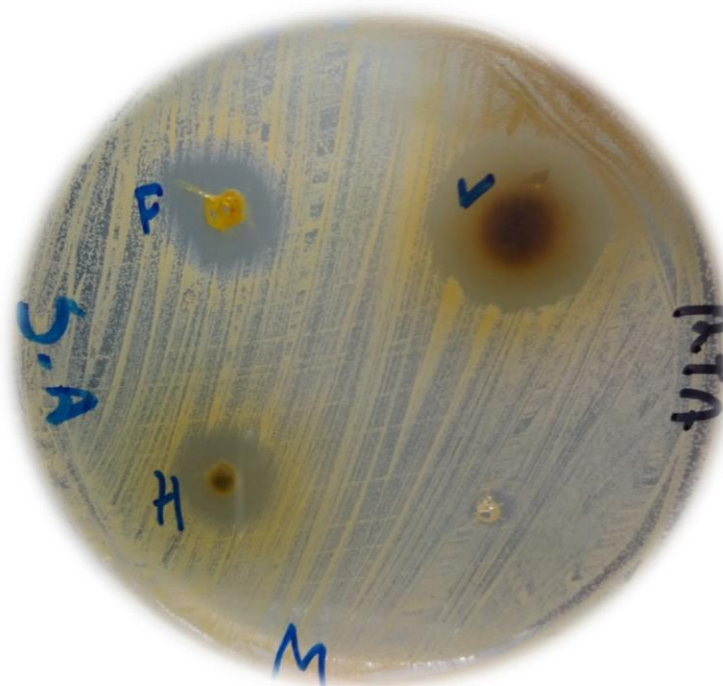
Figura 62. Efecto Inhibitorio de los Extractos Clorofórmicos sobre *Staphylococcus aureus*



Nota: Elaboración propia.

Por otro lado, con respecto a las hojas, García y Palou (2008) describen que los componentes hidrofóbicos, como los ácidos grasos de los extractos vegetales, son capaces de interferir en el acomodo de los lípidos de la membrana celular, provocando un desorden estructural, lo cual afecta la permeabilidad de la membrana, favoreciendo el ingreso de iones y, con esto, un rompimiento de la estructura bacteriana.

Figura 63. Efecto Inhibitorio de los Extractos Metanólicos sobre *Staphylococcus aureus*

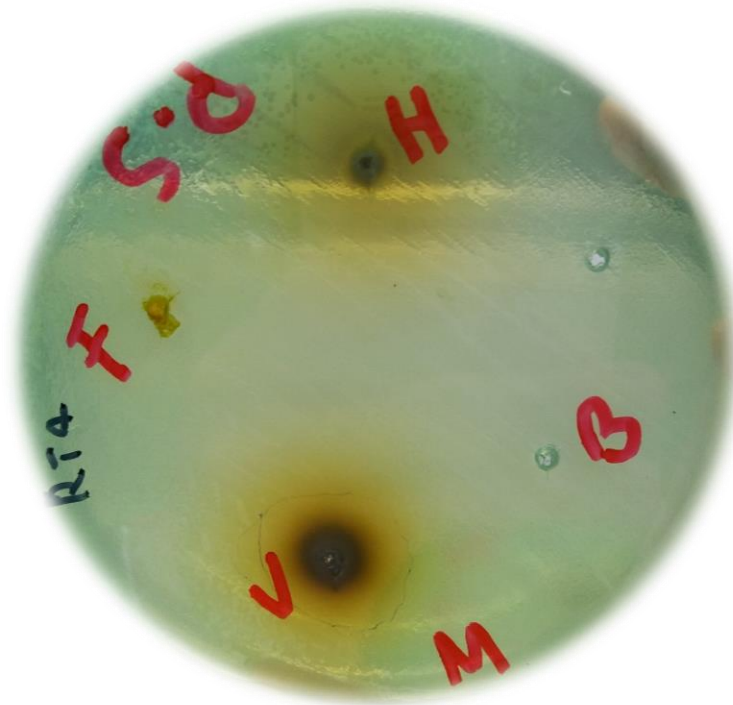


Nota: Elaboración propia.

En cuanto al nulo efecto de las vainas, no se encontraron datos que respalden que [1,2:3,4] dicitopenteno-decahidro-3a-metil-6-metileno-1-(metiletil)-ciclobutano posea efecto antibacteriano; sin embargo, es un compuesto identificado en esta parte de la planta, que podría ser estudiado con alguna otra finalidad distinta al efecto antibacteriano, debido a que se demostró que no ejerce algún efecto significativo sobre las bacterias de este estudio.

Un dato relevante fue el poco efecto obtenido con los extractos clorofórmicos sobre la *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual se les puede atribuir a los diversos mecanismos de resistencia presentes en esta bacteria; además, estructuralmente posee una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos que evitan la difusión de compuestos hidrofóbicos, que en este caso es el del óxido de cariofileno, el cual, a pesar de este impedimento, mostró un efecto mínimo sobre el crecimiento de la bacteria (Rincón, Castaño y Ríos, 2012).

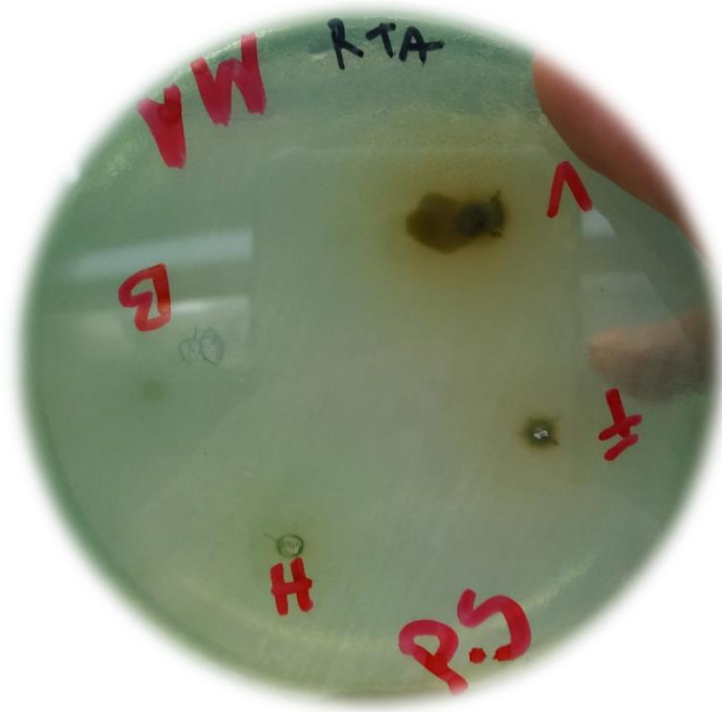
Figura 64. Efecto Inhibitorio de los Extractos Metanólicos sobre *Pseudomonas aeruginosa*



Nota: Elaboración propia.

Los extractos metanólicos mostraron los mejores resultados sobre el *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; en primer lugar, las vainas mostraron un halo de inhibición de 20 mm sobre *S. aureus* y 10 mm en *P. aeruginosa*; en esta parte de la planta se logró determinar, mediante GC-MS, que contenía el 1,2,3-benzenotriol, el cual es un compuesto polifenólico capaz de formar interacciones proteicas intracelulares y complejas a nivel de las paredes celulares de las bacterias, por lo que este conjunto de mecanismos se puede asociar el efecto tan significativo sobre la inhibición del crecimiento bacteriano. (Rodríguez, Zárate y Sánchez, 2017).

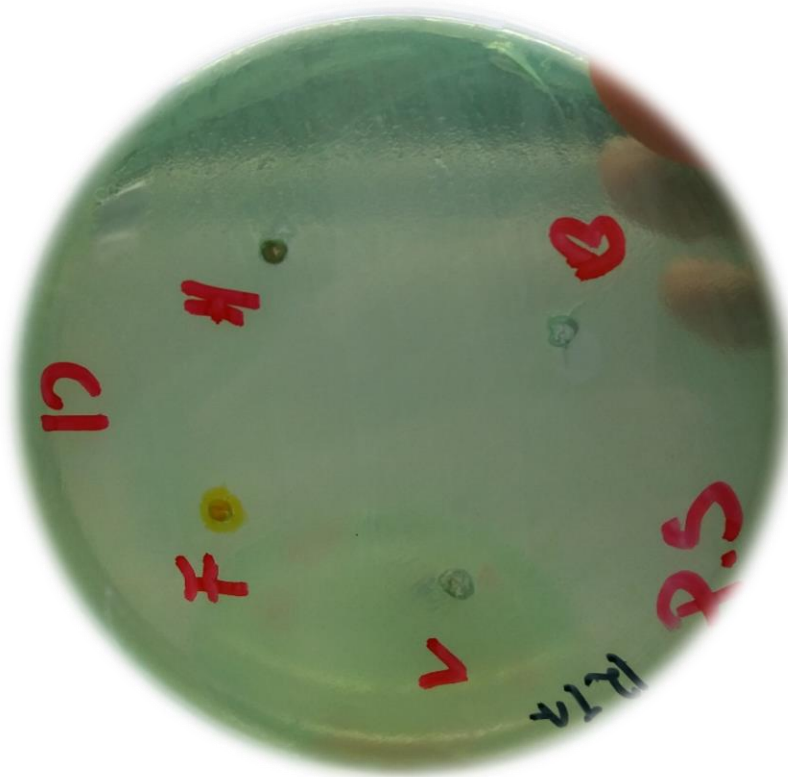
Aunado a esto, el tamizaje fitoquímico ratificó la presencia de fenoles en el extracto; además, flavonoides y triterpenos también estuvieron presentes en los extractos de las flores y hojas; es por esta misma razón que se obtuvo un efecto inhibitorio importante en el *Staphylococcus aureus*.

Figura 65. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuósos sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Nota: Elaboración propia.

Los extractos metanólicos de las flores no presentaron ningún efecto antibacteriano sobre la *Pseudomonas aeruginosa*, a diferencia de las hojas que, a pesar de ser un halo de 4 mm, sí tuvo efecto. Un dato relevante es que las flores no presentaron la presencia de saponinas, las cuales sí estuvieron presentes en los extractos con metanólicos de las hojas y vainas. Estos compuestos son anfipáticos, por lo cual surge la hipótesis de que podrían penetrar la membrana de lipopolisacáridos que posee la *P. aeruginosa*, ocasionando un desequilibrio iónico y, con ello, la ruptura de la misma; es aquí donde radica una diferencia de las flores con respecto a las otras partes de la planta.

Figura 66. Efecto Inhibitorio de los Extractos Clorofórmicos sobre *Pseudomonas aeruginosa*

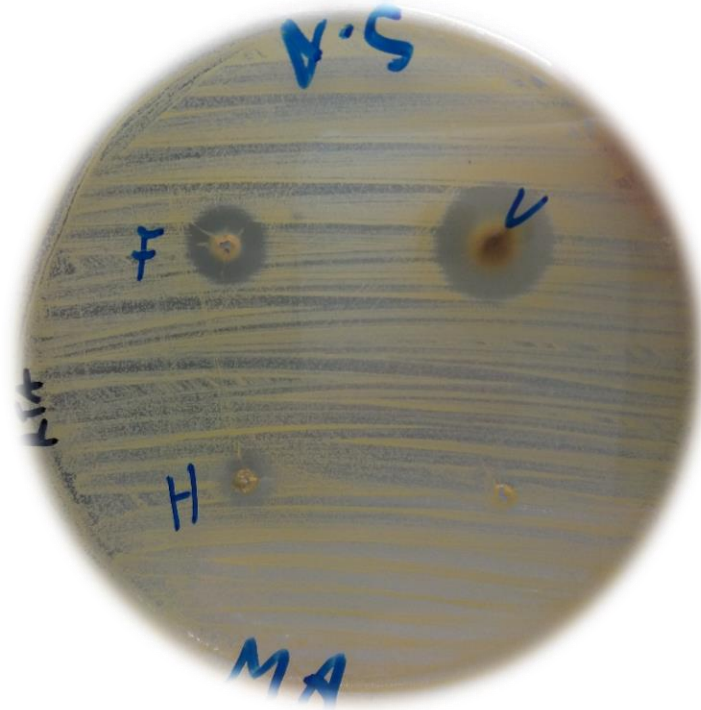


Nota: Elaboración propia.

Por otra parte, todos los extractos acuosos presentaron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, teniendo un mayor halo de inhibición las vainas con 13 mm, seguido de las flores 10 mm y hojas con 5 mm; en ambas partes de planta dieron positivas las pruebas de flavonoides y fenoles, por lo que podría ser una causa atribuible a su efecto antibacteriano por mecanismos citados anteriormente; además, las vainas presentaron la presencia de alcaloides, los cuales están relacionados, según Sandoval y Zuñiga (2016), con una interferencia del ADN bacteriano que induce a la muerte de la bacteria. Es por ello que las vainas tuvieron un aumento de inhibición bacteriana con respecto a las flores.

Cabe destacar que ninguno de los blancos mostró una interferencia al momento de realizar los cultivos antibacterianos.

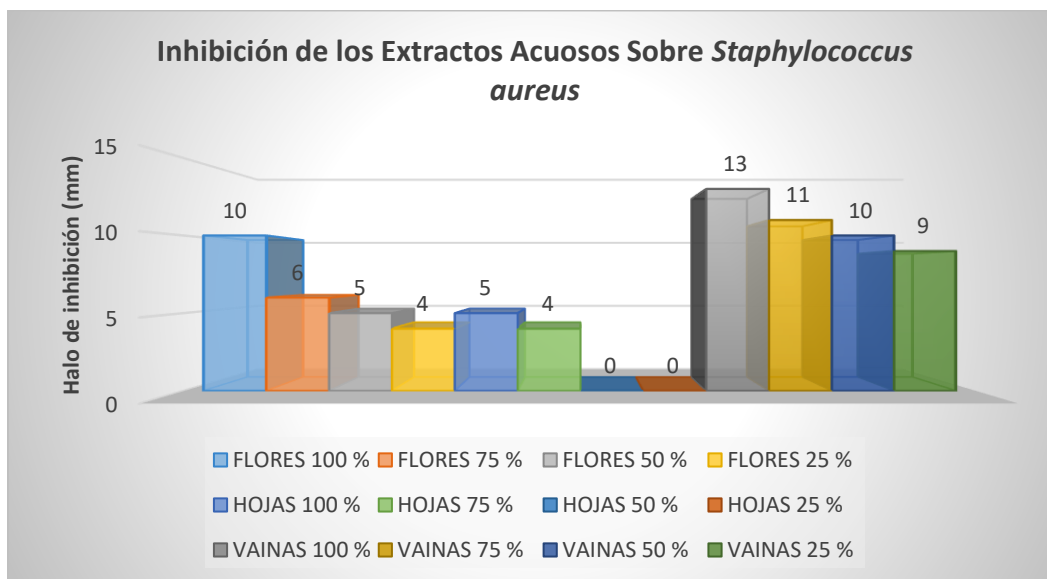
Figura 67. Efecto Inhibitorio de los Extractos Acuósos sobre *Staphylococcus aureus*



Nota: Elaboración propia.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Extractos que Presentaron Actividad Antibacteriana

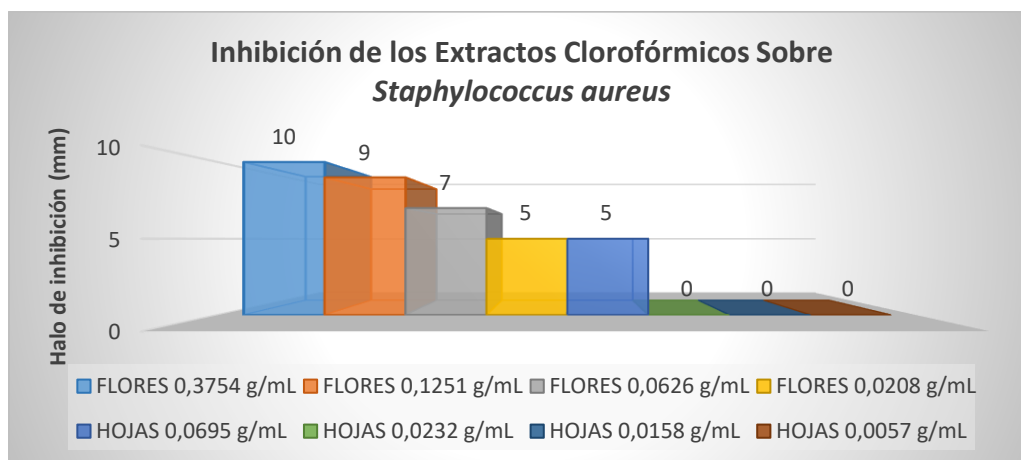
De acuerdo con los datos obtenidos del efecto antibacteriano de los extractos que previamente se analizaron, se procedió a determinar la CMI de los que presentaron efecto inhibitorio sobre las bacterias, utilizando la misma dinámica metodológica.

Figura 68. Gráfico de la CMI de los Extractos Acuosos sobre *Staphylococcus aureus*

Nota: Elaboración propia.

En los extractos acuosos, como se observa en la figura anterior, se pudo determinar que la CMI para las hojas fue del 75%; en el caso de las flores y las vainas no fue posible determinar dicho parámetro, dado que en las flores y vainas presentaron un halo al cual la bacteria aún es sensible, por lo que se deberían realizar más diluciones de este extracto. Sin embargo, halos menores a 6 mm, según la escala de Bauer y Kirby, reflejan resistencia por parte de la bacteria, por lo que podría decirse que las flores al 75% poseen un efecto inhibitorio aceptable.

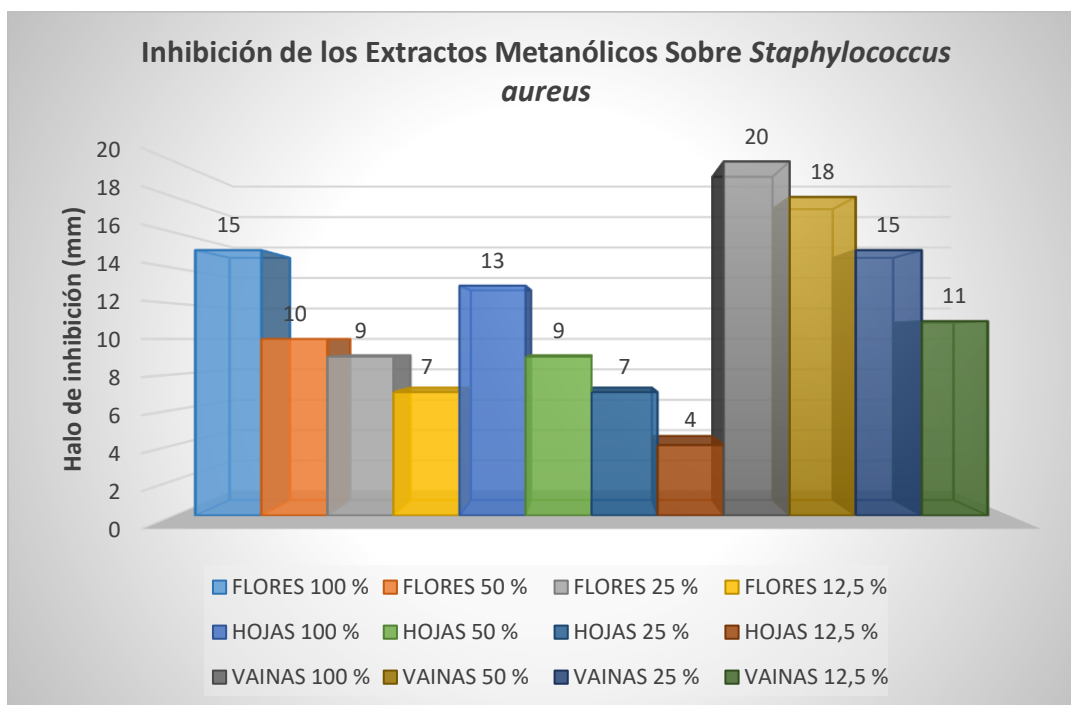
Figura 69. Gráfico de la CMI de los Extractos Clorofórmicos sobre *Staphylococcus aureus*



Nota: Elaboración propia.

Como se aprecia en el gráfico anterior, una concentración de 0,0626 g/mL del extracto de flores con cloroformo es la ideal para tener un efecto inhibitorio a bajas concentraciones, debido a que, según la escala de Bauer y Kirby, halos menores a 6 mm significan resistencia por parte de la bacteria al antibacteriano, por lo que una concentración menor a esa no sería eficaz. No obstante, a una concentración de 0,0208 g/mL aún existe inhibición, por lo que sería adecuado continuar diluyendo para obtener una CMI más acertada. En cuanto a las concentraciones de las hojas, se observó que su concentración mínima inhibitoria fue de 0,0695 g/mL.

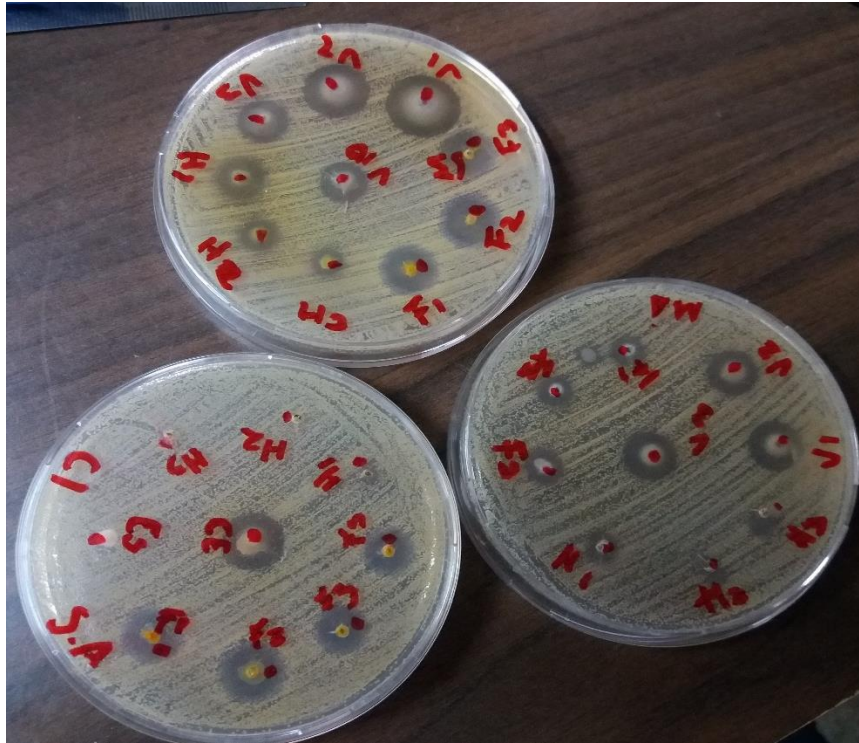
Figura 70. Gráfico de la CMI de los Extractos Metanólicos sobre *Staphylococcus aureus*



Nota: Elaboración propia.

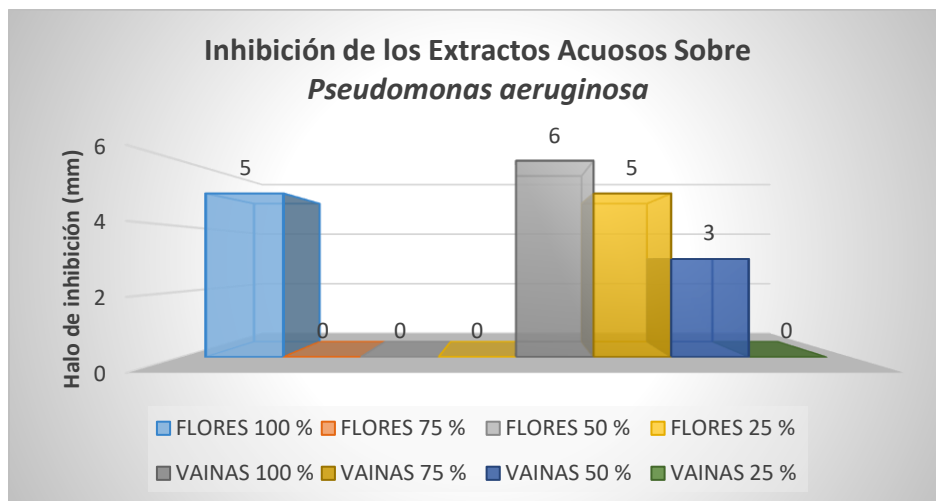
En cuanto a los extractos metanólicos, no fue posible determinar una concentración mínima inhibitoria, dado que aún con las diluciones respectivas no fue posible lograr determinar dicho parámetro. Cabe destacar que, a pesar de las diluciones, fue posible obtener halos de inhibición intermedios (7-9 mm) o hasta sensibles (>9 mm).

Figura 71. Placas de *Staphylococcus aureus* con los Extractos que Presentaron Actividad Antibacteriana para la Determinación de CMI



Nota: Elaboración propia.

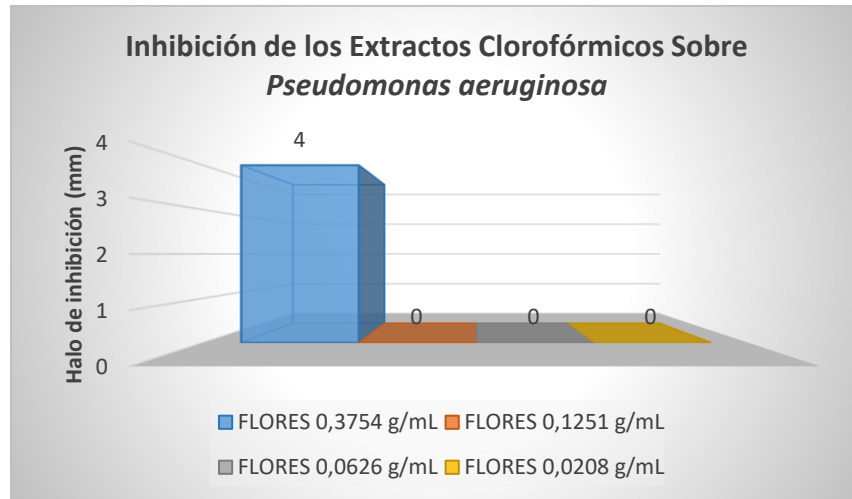
Figura 72. Gráfico de la CMI de los Extractos Acuosos sobre *Pseudomonas aeruginosa*



Nota: Elaboración propia.

Por otro lado, se demostró que la CMI correspondiente al extracto acuoso es de vainas al 100% y de flores al 50% frente a *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, el halo mostrado por las flores podría catalogarse como resistente, al igual que el de las vainas, por ser menores o iguales a 6mm.

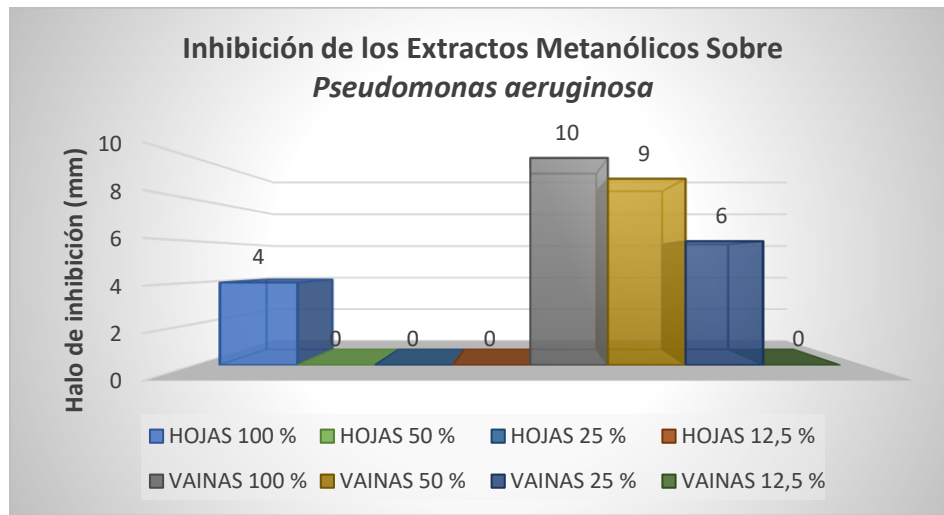
Figura 73. Gráfico de la CMI de los Extractos Clorofórmicos sobre *Pseudomonas aeruginosa*



Nota: Elaboración propia.

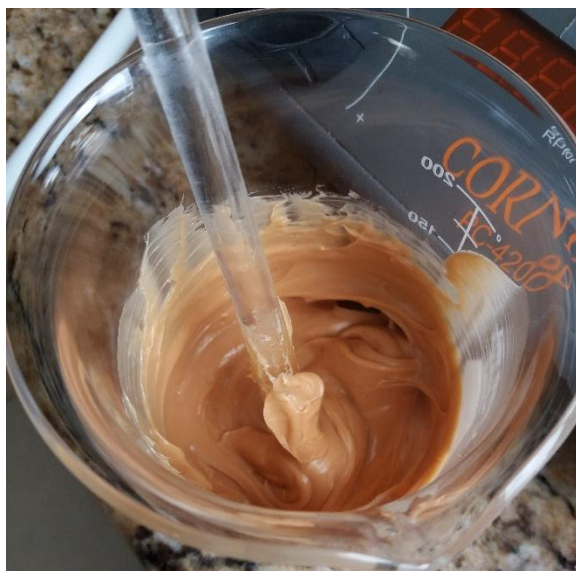
En cuanto a los extractos clorofórmicos, no se observó un halo de inhibición menor al obtenido con una concentración de 0,3754 g/mL, por lo que esta es la concentración mínima inhibitoria. No obstante, no es un halo de tamaño importante según la escala de Bauer y Kirby, dado que se cataloga como resistente a la bacteria.

Figura 74. Gráfico de la CMI de los Extractos Metanólicos sobre *Pseudomonas aeruginosa*



Nota: Elaboración propia.

El extracto metanólico presentó una concentración mínima inhibitoria por parte de las hojas al 100% y de vainas al 25%, debido a que a concentraciones menores no se observó inhibición de crecimiento bacteriano. Por otra parte, un halo de inhibición mayor a 9 mm es indicativo de sensibilidad bacteriana; es por ello que el extracto de vainas al 100 % e incluso al 50 % podrían catalogarse como sensibles ante esta bacteria.

Figura 76. Crema a Base del Extracto Metanólico de Vainas

Nota: Elaboración propia.

Tabla 16. Características de la Crema a Base del Extracto Metanólico de Vainas

Característica	Percepción
Olor	Inodora
Color	Caramelo
Consistencia	Suave y consistencia agradable

Nota: Elaboración propia.

La fabricación de la crema a base de las vainas se justifica, debido a que estas mostraron el mejor resultado de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*; además, aunque no se logró determinar una CMI para este extracto, se tomó como punto de referencia la dilución al 12,5% que presentó un halo de inhibición de 11 mm, por lo que se estimó que una concentración al 10% podría presentar un buen efecto antibacteriano, con un halo de inhibición mayor a 9 mm, para que pudiese catalogarse que *S. aureus* es sensible a la crema.

El resultado final de la crema fue de un aspecto cremoso y agradable para la piel; además, su aplicación es fácilmente extensible; su absorción es rápida y no es oclusiva. Su envase primario es ideal para evitar la contaminación del producto por parte del paciente, y su tamaño es muy cómodo para un fácil transporte, donde sea que vaya el paciente.

Figura 77. Efecto Antibacteriano de la Crema sobre *Staphylococcus aureus*



El punto superior hace referencia a la crema base y el punto inferior se refiere a la crema con el extracto.

Nota: Elaboración propia.

Como se puede observar en la figura 77, el efecto antibacteriano por parte de la crema fue positivo, mostrando un halo de inhibición de 12 mm, lo cual es un poco más si se contrasta con la concentración de las vainas al 10%, la cual mostró un halo de 10 mm; esto puede deberse a que la crema no podía ser medida con una pipeta de 5 μ L, por lo que se llenó el pocillo con una punta de pipeta, lo que pudo haber permitido una mayor cantidad de crema en el pocillo que provocara esta leve diferencia. Sin embargo, se puede afirmar que la crema sí posee efecto antibacteriano, dado que se podría referenciar con la solución al 10%, donde la cantidad depositada fue exacta.

Por otro lado, esta formulación podría ser utilizada para afecciones producidas por *Staphylococcus aureus*, dado que en la *Pseudomonas aeruginosa* no presentó efecto significativo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se plantean las conclusiones obtenidas con respecto a los resultados de la investigación, tomando en cuenta los objetivos de la misma. Además, se plantean recomendaciones observadas durante el desarrollo del proyecto y con base en deficiencias percibidas.

Conclusiones

- La técnica de extracción continua con metanol fue la que mejor rendimiento de extracción presentó, con valores de 8,3822% para las hojas, 9,8317% flores y 6,2406% vainas.
- La extracción con el equipo Soxhlet y cloroformo no fue la mejor, a pesar de tener muestras sólidas y puras.
- No fue posible calcular el rendimiento de extracción con la técnica de maceración, debido a que no se pudo evaporar por completo el agua presente en la muestra.
- En el extracto de vainas en metanol sí pudo ser cuantificado e identificado el metabolito presente, que fue 1,2,3-benzenotriol, con una probabilidad del 80.9%, a diferencia de los extractos de flores y hojas, que no presentaron lectura por parte del GC-MS.
- El 1,2,3-benzenotriol es un compuesto polifenólico, que presentó una alta probabilidad de coincidencia en los extractos por lo que se le puede atribuir una buena actividad antibacteriana, dado que mostro los mejores resultados de la investigación al inhibir el crecimiento de las bacterias en estudio.
- Los extractos clorofórmicos fueron los únicos donde se pudieron identificar los compuestos mayoritarios presentes, de los cuales se obtuvo el [1,2:3,4] dicitlopenteno-decahidro-3a-metil-6-metileno-1-(metiletil)-ciclobutano en las vainas, óxido de cariofileno en flores y ácido hexadecanoico etil-éster para las hojas, con porcentajes de coincidencia del 76.6%, 68.7% y 77.8% respectivamente.
- El tamizaje fitoquímico fue de mucho apoyo para identificar los compuestos presentes en los extractos y relacionarlos con su efecto antibacteriano.

- Las hojas, flores y vainas de los extractos metanólicos son los que más compuestos poseen según el tamizaje.
- Se obtuvo que las vainas en los extractos metanólicos y acuosos presentaban compuestos como flavonoides, triterpenos, saponinas, fenoles y alcaloides. Por otro lado, el extracto clorofórmico de las vainas resultó negativo para todas estas pruebas.
- Los extractos clorofórmicos solamente mostraron resultados positivos con hojas y flores para triterpenos y esteroides.
- Las flores del extracto metanólico y acuoso poseen flavonoides, triterpenos y fenoles.
- Se observó que los extractos metanólicos de las vainas presentaron mayor actividad antibacteriana que todos los demás, con halos de inhibición de 20 mm y 10 mm para cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente.
- El cloroformo presentó los resultados más bajos en cuanto a actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Los mejores resultados de inhibición antibacteriana se obtuvieron con los extractos metanólicos.
- La mayoría de los compuestos con actividad antibacteriana presentan un alto grado de polaridad, debido a que se extrajeron con metanol.
- La técnica de Bauer y Kirby permite un análisis sencillo y cualitativo sobre el efecto antibacteriano de los compuestos.
- La CMI del extracto acuoso de las vainas fue del 50% y del extracto metanólico del 25% sobre *Pseudomonas aeruginosa*.
- No fue posible la determinación de la CMI de los extractos metanólicos en cepas de *Staphylococcus aureus*; sin embargo, sí se determinó que las hojas del extracto acuoso poseen una CMI del 75% y las del extracto clorofórmico 0,0695 g/mL.
- La crema a base del extracto metanólico de las vainas sí presentó actividad antibacteriana, con un halo de 12 mm.
- La *Pseudomonas aeruginosa* fue la bacteria con mayor resistencia a los extractos obtenidos de la *Caesalpinia pulcherrima*.
- Para la determinación de la CMI, la técnica de Bauer y Kirby no es la más adecuada.

Recomendaciones

- Se recomienda buscar otras técnicas de extracción que permitan obtener mejores rendimientos y nuevos compuestos, así como el uso de otros solventes.
- Por otro lado, la implementación de técnicas de purificación, con la finalidad de obtener otros tipos de metabolitos secundarios.
- Además, se sugiere analizar otras variantes de la especie *Caesalpinia pulcherrima*, dado que se podrían encontrar nuevos compuestos con diversa actividad antibacteriana.
- También se recomienda realizar el análisis de GC-MS a los extractos acuosos, con el propósito de identificar compuestos de una forma más certera.
- Es importante buscar una técnica más precisa y rápida para la determinación de la CMI como las microdiluciones con pocillos.
- Además, realizar una mayor cantidad de diluciones de los extractos, para determinar una CMI con más certeza.
- Es indispensable que la universidad cuente con el equipo y condiciones necesarias para la elaboración de estos proyectos de investigación.
- Así mismo, como laboratorios de microbiología o convenios para la realización de estudios sobre microorganismos patógenos.
- Por otra parte, se recomienda realizar el análisis de los extractos obtenidos contra otras cepas de bacterias, con la finalidad de tener un espectro de acción de los extractos.
- Se invita, a los profesionales de la salud, a investigar y conocer más sobre las plantas y su alternativa en el tratamiento terapéutico.

Referencias

- A Sheela Devi., Johanna Rajkumar., Modilal, M. e Ilayaraja, R. (2012). Antimicrobial activities of *avicennia marina*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Melastoma malabathricum* against clinical Pathogens isolated from uti. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3 (3), 6-705. Recuperado de <https://ijpbs.net/vol-3/issue-3/bio/81.pdf>
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33 (10), 692-699, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Avello, M. y Cisternas, F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica Chile*, 138, 1288-1293. Recuperado de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>
- Bagnarello, V. (s.f). Procedimiento para la preparación de reactivos y sus respectivos usos para la identificación de metabolitos secundarios. UCIMED.
- Bermúdez, A., Oliveira, M. y Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30 (8), 453 – 459. Recuperado de www.redalyc.org/articulo.oa?id=33910703
- Bermúdez, M., Granados, F. y Molina, A. (2019). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. *Agronomía Mesoamericana*, 30 (1), 147-163. Doi:10.15517/am. v30i1.33758
- Boething Treeland Farms, Inc. (2018). *Caesalpinia pulcherrima* Red Bird of Paradise Bush. Boething Treeland Farms, Inc. Recuperado de <http://www.boethingtreeland.com/grown-as/bush/caesalpinia-pulcherrima.html>
- Calvo, M. (2004). Resumen de fitoquímica: reacciones y cromatografía. Universidad Nacional. Costa Rica.

- Carroll, C. et al. (2016). Estafilococos. Microbiología Médica, 27e. McGraw-Hill.
- Carroll, C. et al. (2016). Pseudomonas y Acinetobacter. Microbiología Médica, 27e. McGraw-Hill.
- 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.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Revista Panamericana de Salud Pública, 30 (6), 519 – 528. Recuperado de <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/9428/a04v30n6.pdf?sequence=1>
- Castro, R., Castro, V. y Ceroni, A. (2015). Fenología de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. En un jardín botánico urbano de Lima, Perú. Ecología aplicada, 14 (2), 201-209. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v14n2/a12v14n2.pdf>
- Cea de Amaya, R. (2013). Fitofármacos. Célula Inventa Química y Farmacia. Recuperado de <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>
- Chew et al. (2011). Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine, 11 (12), 1-10, doi:10.1186/1472-6882-11-12
- Coy, C., Parra, J. y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). Revista Elementos, 4, 31- 39. DOI: 10.15765/e. v4i4.513
- Estrada, M. y Asunción C. (2013). Determination of the Antioxidant, Phytochemical and Antibacterial Profiles of Flowers from Selected Ornamental Plants in Nueva Vizcaya, Philippines. Journal of Agricultural Science and Technology, B (3), 833-841. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Melfei_Bungihan/publication/321315291_Determination_of_the_Antioxidant_Phytochemical_and_Antibacterial_Profiles_of_Flowers_from_Selected_Ornamental_Plants_in_Nueva_Vi

zcaya_Philippines/links/5a1c22c80f7e9be37f9c3d83/Determination-of-the-Antioxidant-Phytochemical-and-Antibacterial-Profiles-of-Flowers-from-Selected-Ornamental-Plants-in-Nueva-Vizcaya-Philippines.pdf

- Fragozo, L. y Villalobos, A. (2016). *Pseudomona aeruginosa*: Estado del arte. (Monografía para optar por el título de especialidad de medicina interna). Universidad libre. Barranquilla.
- Franco, L., Matiz, G., Pájaro, I. y Gómez, H. (2013). Actividad Antibacteriana in vitro de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12 (3), 230-237. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85626383009>
- García, R. y Palou, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana del timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 2 (2), 41-51. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
- González, M. (2013). Resistencia antimicrobiana, una amenaza mundial. *Revista Cubana de Pediatría*, 85 (4), 414-417. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v85n4/ped01413.pdf>
- Gutiérrez, A. y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103 (2), 409-419. Recuperado de <http://www.rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>
- Guzmán, A. (2016). Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* en el equipo de anestesia inhalatoria en 20 clínicas y hospitales veterinarios de la ciudad de Quito mediante estudios microbiológicos. (Trabajo de graduación para optar por el título de médico veterinario y zootecnista). Universidad de las Américas. Ecuador.
- Hernández, C. et al. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*, 34 (1), 91-100, DOI: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>

- Herrera, M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños, 34 (1). Recuperado de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2016). Pseudomonas aeruginosa. DataBio. Recuperado de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudomonas%20aeruginosa%202017.pdf>
- Maskin, M. et al. (2010). Estudio prospectivo, descriptivo y multicéntrico acerca de la infección de piel y partes blandas por Staphylococcus aureus meticilino-resistente adquirido en la comunidad (SAMRAC). Dermatología Argentina, 16 (2), 110-116. Recuperado de <http://dermatolarg.org.ar/index.php/dermatolarg/article/viewArticle/562>
- Merck Sharp & Dohme Corp (MSD). (2017). Infecciones bacterianas de la piel: Impétigo y ectima. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/trastornos-cut%C3%A1neos/infecciones-bacterianas-de-la-piel/imp%C3%A9tigo-y-ectima>
- Merck Sharp & Dohme Corp (MSD). (2017). Infecciones bacterianas de la piel: Síndrome estafilocócico de la piel escaldada. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/trastornos-cut%C3%A1neos/infecciones-bacterianas-de-la-piel/s%C3%ADndrome-estafiloc%C3%B3cico-de-la-piel-escaldada>
- Merck Sharp & Dohme Corp (MSD). (2017). Infecciones por estafilococos. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/enfermedades-infecciosas/cocos-grampositivos/infecciones-por-estafilococos>
- Merck Sharp & Dohme Corp (MSD). (2017). Infecciones por Pseudomonas y patógenos relacionados. Recuperado de <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>

- Moncayo, A. (2014). La resistencia a los antibióticos y la falta de interés de la industria farmacéutica. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*, 18 (2), 35-36. Recuperado de www.elsevier.es/infectio
- Montero, G. (2017). Eficacia del extracto de eucalipto como agente antimicrobiano contra *Streptococcus pyogenes* mediante la formulación de una crema de uso tópico. (Tesis de graduación para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Mora, D. y Vargas, S. (2018). Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Cinnamomum verum* (canela), *Origanum vulgare* (orégano) y *Ocimum basilicum* (albahaca), para su estudio sinérgico y comprobar su efecto en *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. (Tesis de graduación para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Morales, H. (2012). Análisis in-vitro del efecto antibacteriano del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre una de las principales cepas bacterianas causales de faringoamigdalitis (*Streptococcus pyogenes*), realizado durante los meses de mayo y agosto del 2012. (Tesis de graduación para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Nidhi, Asati y Yadava, R.N. (2017) Antibacterial activity of a triterpenoid saponin from the stems of *Caesalpinia pulcherrima* Linn, *Natural Product Research*, 32 (5), 499-507, DOI: 10.1080/14786419.2017.1317772
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Quispillo, M. (2013). “Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del escobillón rojo (*Callistemon speciosus*)”. (Tesis doctoral). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador, p. 15.

- Ramesh, M., Sivakumar, T., Govinda, P. y Kalantri, M. (2013). Membrane Stabilizing Potential and Antimicrobial Activity of the Pods of *Caesalpinia pulcherrima* (Caesalpinaceae) against Selected Microbes. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3 (4), 4053-4062. Recuperado de <http://www.iajpr.com/index.php/en/>
- Ribeiro, J. y Lobo, M. (2016). Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Caesalpinia pulcherrima*. *Electronic Journal Collection Health*, 8 (2), 853-860. Recuperado de https://www.acervosaude.com.br/doc/10_2016.pdf
- Rincón, C., Castaño, J. y Ríos, E. (2012). Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17 (2), 160-171. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v17n2/pla05212.pdf>
- Rivas, C., Oranday, M. y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience*, 3-84. DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>
- Rodríguez, C., Zárate, A. y Sánchez, L. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*, 15 (27), 119-129. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>
- Rojas, F. y Torres, G. (2009). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción. Kurú: *Revista Forestal*, 6 (17), 1-3. Recuperado de <http://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/392/325>
- Rojas, R. (2017). Estudio de las propiedades antisépticas y antibacteriales in vitro del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (zacate limón) en *Staphylococcus aureus*. (Tesis de graduación para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Sandoval, E. y Zuñiga, E. (2016). Efecto antibacteriano in vitro de los alcaloides totales extraídos de hojas de *Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth “algarrobo” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Tesis de graduación para optar por el grado académico de bachiller en Farmacia y Bioquímica). Universidad Nacional de Trujillo. Perú.

- Sowjanya, Pulipati, Pallavi, G., Sujan, B. et al. (2012). Evaluation of antibacterial activity of fresh and dry flower extracts of *Caesalpinia pulcherrima* L. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*, 3 (3), 360-365. Recuperado de www.ijbpr.com
- Sumitra, Chanda y Yogesh, Baravalia. (2011). Brine shrimp cytotoxicity of *Caesalpinia pulcherrima* aerial parts, antimicrobial activity and characterisation of isolated active fractions. *Natural Product Research*, 25 (20), 1955-1964, <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2010.530600>
- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 2 ed., 663-671. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9 ed. Editorial Panamericana.
- Troisi, J. et al. (2014). Saponinas. Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013, p. 318. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/266969103_Saponinas/download
- United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service. (2018). *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw. pride-of-Barbados. United States Department of Agriculture. Recuperado de <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CAPU13>
- United States Pharmacopeial (USP). (2015). Capítulos generales. Versión 38, volumen 1.
- Valverde, J. (2018). Determinación de la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) variedad caturra y catuaí mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana in vitro y su aplicación en la industria farmacéutica. (Tesis de graduación para optar por el grado de licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Vivek, M.N. et al. (2013). Antimicrobial and Antioxidant activity of leaf and flower extract of *Caesalpinia pulcherrima*, *Delonix regia* and *Peltaphorum ferrugineum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (08), 64 -71, DOI: 10.7324/JAPS.2013.3811

Zendejas, G., Avalos, H. y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25 (3), 129-143. Recuperado de <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>