

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE FARMACIA**

**“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD  
MICROBIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y  
METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *BIXA ORELLANA* Y  
SU EVALUACIÓN *IN VITRO* FRENTE A CEPAS DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *STREPTOCOCCUS  
PYOGENES*”**

**MARÍA TERESA BRENES MATA**

**SAN JOSÉ, COSTA RICA**

**MAYO 2018**

## AGRADECIMIENTOS

“La gratitud es cuando el recuerdo se guarda en el corazón y no en la mente”

Louise Hay

A Osquitar, por buscar durante dos años temas conmigo, finalmente encontrar el indicado, ayudarme a recolectar las hojas y con el laboratorio. Por ese corazón tan noble.

A mis jefes, por permitirme desarrollarme en un espacio al tanto quiero, por ayudarme a crecer como profesional y persona, y al mismo tiempo estudiar lo que tanto amo.

A mis amigas del alma, por ser seres mágicos llenos de luz, que me acompañaron, sufrieron conmigo, me dieron un hombro, y siempre creyeron en mí, soy muy afortunada de tenerlas en mi vida.

Un especial agradecimiento a Doña Polly a Maía, por brindarme seguridad, y una familia más, porque su apoyo durante la primera etapa de mi carrera fue fundamental.

A Ricardo Vásquez, gracias por la compañía, el aprendizaje y el cariño durante el último trayecto de mi carrera, por esas muchas ocasiones que fuiste mi soporte, y por enseñarme a vivir con pasión.

Agradezco a toda mi familia, tíos y primos, que han estado pendientes de mí. Especialmente a mi tía Carmen, a mi tío Sammy, a mis tías, Ele e Ileana, por ser siempre incondicionales, haber estado presentes en todos mis éxitos, y darme fortaleza en los momentos más difíciles, gracias tías por motivarme siempre a perseguir mis sueños y crearme capaz.

A mis primos. Por todo su amor. A Adrián, por escucharme, por los consejos y por haber sido un ejemplo para mí. A Esteban, por consentirme, por hablarme siempre con la verdad y respeto, gracias además por todo el empeño para ayudarme a terminar este trabajo.

A mis hermanitos, los que hace mucho me dicen doctora. Al machito, por tantas veces que por su esfuerzo no tuve que abandonar mis sueños, por preocuparse siempre por mí y por mami, por su gran corazón. A tito, por cuidarme tantos años, y chinearne aún ahora. Gracias a los dos por su amor y su admiración.

A Matías, al mejor sobrino del mundo, la luz de mis ojos, por inspirarme y motivarme a ser una mejor persona y ejemplo.

A mi tío Oswaldo, porque partió confiando en mí, y hoy le agradezco gran parte de mi carrera.

A Dios, por darme la sabiduría, fuerza, y constancia, pero sobre todo, por poner a mi lado a las personas correctas en todo momento.

## **DEDICATORIA**

**Dedico este triunfo a mis padres.**

**A mi mamá,**

Por su infinito amor y apoyo, por enseñarme a ser una mujer fuerte, a luchar por mis metas y que lo que se quiere se puede. Por haberme dado la confianza de que es posible llegar tan lejos como uno se lo proponga.

**A mi papá,**

Al gran amor de mi vida. A la mejor persona que conocí y a quién tanto admiro, por haberme demostrado con su ejemplo que nunca es tarde, y que el que persevera alcanza. Porque su imagen está siempre conmigo para levantarme, y este esfuerzo ha sido mi gran promesa para él. Mi regalo al cielo.

## CONTENIDO

CONTENIDO DE FIGURAS.....	7
CONTENIDO DE TABLAS.....	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
Planteamiento del Problema.....	12
Hipótesis.....	15
Objetivo General.....	15
Objetivos específicos.....	15
Justificación.....	16
Antecedentes.....	19
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	22
Medicina natural.....	22
Farmacognosia.....	22
Planta medicinal.....	24
Fitoterapia.....	24
Fitofármacos.....	25
Fitoquímico.....	26
Metabolismo.....	26
Metabolitos.....	26
Metabolitos primarios y secundarios.....	26
Alcaloides.....	27
Flavonoides.....	28
Nafto y Antraquinonas.....	28
Esteroides y triterpenoides libres.....	28
Taninos.....	28
Saponinas.....	29
Terpenos.....	29
Método de Extracción.....	32
Soluciones extraídas.....	32
Maceración.....	33
Destilación.....	33
Destilación simple.....	34
Liofilización.....	36
Tipos de liofilizadores.....	36
Generalidades de la Bixa orellana.....	37
Clasificación Taxonómica.....	37
Descripción y partes de la planta.....	38
Componentes fitoquímicos las hojas.....	41
Usos Tradicionales.....	42
Técnicas instrumentales de análisis.....	43
La espectrometría de masas.....	44
Espectrometría de infrarrojo.....	44
Cromatografía de Gases.....	45

La Piel .....	45
Flora bacteriana de la piel .....	46
Infecciones en piel.....	46
Manifestaciones de las infecciones cutáneas.....	47
Cocos .....	47
Diplococos.....	48
Estreptococos.....	49
Tétradas.....	49
Estafilococos.....	50
Sarcinas.....	51
Staphylococcus.....	52
Staphylococcus aureus.....	53
Estreptococoos.....	53
Streptococcus pyogenes.....	53
Infecciones por Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes.....	53
<input type="checkbox"/> Impétigo.....	53
<input type="checkbox"/> Ectima.....	55
<input type="checkbox"/> Erisipela.....	55
<input type="checkbox"/> Celulitis.....	56
Antibióticos.....	57
Resistencia Bacteriana a los antibióticos.....	57
Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	57
1. Inactivación enzimática.....	57
2. Modificación en el sitio blanco.....	58
3. Alteración de la permeabilidad.....	58
Resistencia de Sthaphylococos aureus.....	58
Pruebas de sensibilidad a antibióticos.....	59
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	60
Enfoque.....	60
Método.....	60
Recolección de la Muestra de Bixa orellana.....	61
Extracciones de las hojas de Bixa orellana.....	62
Destilación del extracto metanólico de Bixa orellana.....	66
Extracción acuosa por maceración de las hojas de Bixa orellana.....	67
Destilación del extracto acuoso de Bixa orellana.....	69
Pruebas de Caracterización Fitoquímicas.....	70
Prueba de Insaturaciones (Dobles o triples enlaces de Carbono) con reactivo de Baeyer (KMnO <sub>4</sub> ).....	71
Identificación de Flavonoides con reactivo de Shinoda.....	71
Identificación de Alcaloides con reactivo de Dragendorff.....	71
Identificación de Compuestos fenólicos por FeCl <sub>3</sub> .....	72
Identificación de Esteroides -triterpenos por Liberman-Buchnard.....	72
Análisis Instrumental de los Extractos de las Hojas de Bixa orellana.....	72
Identificación de grupos funcionales por medio de espectroscopía infrarroja.....	72
Identificación de por cromatografía de gases, acoplado a detector de masas (CG-MS).....	72
Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos de las Hojas de Bixa orellana Frente al Staphylococcus Aureus.....	73
Materiales y equipos para el desarrollo del ensayo microbiológico.....	73

Ensayo microbiológico 1 .....	74
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>81</b>
<b>Pruebas Líquidas de Caracterización de Los Extractos</b> .....	<b>83</b>
Identificación de flavonoides .....	83
Identificación de Insaturaciones (Doble o Triple enlace de Carbonos).....	84
Identificación de Alcaloides.....	85
Identificación de Compuestos Fenólicos- FeCl <sub>3</sub> .....	86
<b>Análisis Instrumental de los Extractos de las Hojas de Bixa orellana</b> .....	<b>88</b>
Análisis de los Extractos de las Hojas de Bixa orellana mediante Espectrometría de infrarrojo.....	89
Análisis de los Extractos de las Hojas de Bixa orellana mediante Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas .....	94
Determinación de la Posible Actividad Antibacteriana de las Extracciones Metanólicas y Acuosas de Bixa orellana frente a cepas de Staphylococcus aureus .....	101
Resultados del ensayo microbiológico etapa 1 .....	101
Resultados del ensayo microbiológico etapa 2.....	104
Determinación de la Posible Actividad Antibacteriana de las Extracciones Metanólicas y Acuosas de Bixa orellana frente al Streptococcus pyogenes .....	109
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>111</b>
Recomendaciones .....	112
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>114</b>

## CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Farmacognosia .....	23
Figura 2. Elementos Básicos del Metabolismo Primario y Su Relación con el Metabolismo Secundario de las Plantas .....	30
Figura 3. Origen de Algunos Metabolitos Secundarios (Alcaloides, Fenilpropanoides y Terpenos) en el Metabolismo Primario.....	31
Figura 4. Ilustración de un Proceso de Maceración .....	33
Figura 5. Equipo de Destilación Simple Conformado por dos Balones, Termómetro, Condensador, Salidas y Entradas de Agua, Prensas y una Fuente de Energía .....	34
Figura 6. Ejemplo Equipo de Rotavapor .....	35
Figura 7. A) Registro de Temperatura de una Sustancia Pura, B) Registro de Temperatura de Dos Componentes con Puntos de Ebullición Similares, C) Registro de Temperatura de Dos Componentes Cuyos Puntos de Ebullición son Distintos.....	36
Figura 8. Fotografía de Árbol <i>Bixa orellana</i> .....	38
Figura 9. Fotografía de Hojas de <i>Bixa orellana</i> .....	39
Frutos: cápsula ovoide a ovoide globosa, pardo-rojiza, de 3 a 5 cm de largo por 3 a 4.5 cm de diámetro, erizado de pequeños agujones delgados y blandos hasta de 6 mm; contiene aproximadamente 50 semillas. Figura 10. Fotografía de flor y fruto de <i>Bixa Oorellana</i> .....	39
Figura 11. Fotografía de Corteza de <i>Bixa orellana</i> .....	40
Figura 12. Fotografía de Corteza de <i>Bixa orellana</i> . .....	41
Figura 13. Cocos Dispuestos en forma Individual.....	48
Figura 14. Diplococos de <i>Neisseria-Gonorrhoeae</i> .....	48
Figura 15. Agrupaciones Microscópicas de <i>Streptococcus Pyogenes</i> .....	49
Figura 16. Unidades Celulares Agrupadas en Cuartetos de <i>Micrococcus Tetrigenus</i> .....	50
Figura 17. Agrupación en Racimos de <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	51
Figura 18. Ordenamiento en Cubos de <i>Sarcina Ventriculis</i> .....	52
Figura 19. Lesiones Causadas por Impétigo.....	54
Figura 20. Impétigo Estafilocócico: Forma de Piel Escaldada.....	54
Figura 21. Marcas y Heridas a Causa de Erisipela .....	55
Figura 22. Celulitis, Infección Bacteriana Común.....	56

Figura 23. Árbol de <i>Bixa orellana</i> Utilizado para la Recolección de Hojas para la Extracción de Componentes .....	62
Figura 24. Material fresco de hojas de <i>Bixa orellana</i> para la Extracción con.....	63
Figura 25. Material Fresco de hojas de <i>Bixa orellana</i> para la Extracción con Agua.....	64
Figura 26. Filtración al Vacío de Extracto Metanólico de <i>Bixa orellana</i> .....	65
Figura 27. Viales con Extracto Metanólico A - Destilado .....	66
Figura 28. Extracto Metanólico A - Destilado.....	67
Figura 29. Proceso de Maceración, del Extracto Acuoso de las Hojas de <i>Bixa Orellana</i> .....	68
Figura 30. Muestras Sólidas del Extracto Acuoso Liofilizado de las Hojas de <i>Bixa orellana</i> .....	70
Figura 31. Placas de Petri con Cepas de <i>Stalpylococcus Aureus</i> , Identificadas con Marcador y Volteadas sobre Bandeja en Cámara De Flujo Laminar .....	76
Figura 32. Inyección de Extractos en Placas con Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	77
Figura 33. Incubadora para el Cultivo de Bacterias.....	80
Figura 34. Prueba de Flavonoides con Reactivo de Shinoda sobre Extractos de <i>Bixa orellana</i> ...	83
Figura 35. Ejemplo de la Reacción que ocurre con Reactivo de Baeyer ( $\text{KMnO}_4$ ) .....	85
Figura 36. Prueba de Instauraciones de Carbono con Reactivo De Bayer ( $\text{KMnO}_4$ ) sobre Extractos de <i>Bixa orellana</i> .....	85
Figura 37. Aplicación de prueba de alcaloides con reactivo de Dragendorff.....	86
Figura 38. Identificación de Compuestos Fenólicos con $\text{FeCl}_3$ .....	87
Figura 39. Identificación de esteroides - Reactivo Liberman-Buchnard.....	87
Figura 40. Espectro Infrarrojo de la Extracción Metanólica A ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) - 2 Destilados.....	90
Figura 41. Estructura del Fitol .....	90
Figura 42. Espectro infrarrojo de la Extracción Metanólica B de <i>Bixa orellana</i> – 1 Destilado ....	91
Figura 43. Espectro infrarrojo de la Extracción Acuosa A de la <i>Bixa orellana</i> – Destilado y Liofilizado .....	92
Figura 44. Espectros Infrarrojos del Extracto acuoso B de <i>Bixa orellana</i> - Liofilizado.....	93
Figura 45. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Metanólico A ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )- 2 Destilados .....	94
Figura 46. Estructura de la Metil Fenil Oxima .....	96
Figura 47 Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS) del Extracto metanólico B ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) – 1 Destilado.....	97

Figura 48. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Acuoso A – Destilado y liofilizado.....	98
Figura 49. Datos obtenidos mediante el análisis por Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS) del Extracto acuoso A (CH <sub>3</sub> OH).....	100
Figura 50 Estructura del Ácido Dodecanóico.....	100
Figura 51. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>Staphylococcus Aureus</i> Frente a Extracciones Metanólicas de <i>Bixa Orellana</i> Bajo la Presencia del Solvente Placa 1 (Vista Frontal).....	102
Figura 52. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a las Extracciones Acuosas de <i>Bixa orellana</i> Bajo la Presencia del Solvente Placa 2 (Vista Frontal).....	103
Figura 53. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>Staphylococcus aureus</i> Frente a Extracciones Metanólicas Concentradas de Hojas de <i>Bixa orellana</i> Placa 1 (Vista Frontal).....	105
Figura 54. Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a Extracciones Metanólicas de <i>Bixa orellana</i> Placa 2 (Vista Frontal) .....	107
Figura 55. Comparación de un Cultivo Inactivo <i>Streptococcus pyogenes</i> (izquierda) Versus Cultivo Activo de <i>Staphylococcus aureus</i> (derecha).....	110

## CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la <i>Bixa orellana</i> .....	37
Tabla 2. Extracciones de <i>B. Orellana</i> con Solvente Empleadas para Evaluar la Actividad Antimicrobiana sobre una Cepa de <i>S. aureus</i> .....	75
Tabla 3. Extractos de <i>Bixa orellana</i> Provenientes del Medio Metanólico Utilizados para el Análisis Microbiológico Frente a Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en placa 1, Después del Proceso de Eliminación del Solvente .....	78
Tabla 4. Extractos de <i>Bixa orellana</i> Provenientes del Medio Acuoso Utilizados para el Análisis microbiológico Frente a Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> en Placa 2.....	79
Tabla 5. Caracterización Físicas de los Extractos Después del Proceso de .....	82
Tabla 6. Caracterización de las extracciones, posterior al proceso completo de eliminación de solventes .....	82
Tabla 7. Resultados Obtenidos durante la Caracterización o Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de <i>Bixa orellana</i> .....	88
Tabla 8. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Metanólico A (CH <sub>3</sub> OH)- 2 Destilados .....	95
Tabla 9. Datos Obtenidos por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto metanólico B (CH <sub>3</sub> OH) – 1 Destilado .....	97
Tabla 10. Datos Obtenidos por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Acuoso A – Destilado y liofilizado .....	99
Tabla 11. Resultados de la Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>Staphylococcus aureus</i> con las Extracciones Metanólicas de <i>Bixa orellana</i> Bajo la Presencia del Solvente Placa 1 .....	101
Tabla 12. Resultados de la Prueba de Sensibilidad Microbiana de Extracciones Metanólicas Concentradas de <i>Bixa orellana</i> Frente a <i>Staphylococcus Aureus</i> Placa 1 .....	104
Tabla 13. Resultados de la Prueba de Sensibilidad Microbiana de <i>Staphylococcus aureus</i> con las Extracciones Metanólicas de <i>Bixa orellana</i> Bajo la Presencia del Solvente Placa 2.....	106

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del Problema

Curtis, 2005, explica que los estafilococos son bacterias que pueden vivir en varios lugares del cuerpo sin causar daño, como en la piel, sin embargo cuando hay heridas éstas pueden penetrar, así mismo pueden haber complicaciones graves si estos microorganismos llegan al torrente sanguíneo. Entre las infecciones que pueden causar está la neumonía, osteomielitis bacteriemia, enterocolitis, intoxicaciones alimentarias, y las más comunes, infecciones de la piel” (p.3). El *Staphylococcus aureus* es un coco tipo gram positivo coagulasa positivo, caracterizado por ser un importante patógeno humano, que produce infecciones tanto nivel hospitalario como fuera de él. (Pérez, y Mota, 2006, p.257)

El *Staphylococcus aureus*, es un microorganismo que colonizan la piel sobre todo en sitios de inserción de cabello y mucosas del humano, y se le considera reservorio natural en el 20% a 50% , y se le asocia también a la producción de abscesos tempranos y a la producción de exoproteínas y toxinas. (Silvia, 2006, pp.106-107). Además, está comúnmente presente en la nariz, antes de las fosas nasales, y también en la flora bacteriana normal humana. Por lo tanto, se encuentra tanto en la piel, como órganos, partes del cuerpo expuestas al exterior, o sitios de alta segregación de sudor, como axilas. El riesgo de sufrir alguna de las infecciones causadas por el *S. aureus* es más alta en diabéticos que utilizan insulina, personas inmunodeprimidos, individuos que utilizan drogas inyectables, pacientes que están bajo hemodiálisis o los que tengan heridas en la piel. (Silva, 2007)

Así mismo, se encuentra el *Streptococcus pyogenes*, (Streptococcus del grupo A), es caracterizado como un patógeno gram positivo, compuesto por cocos no móviles. Al cuál se le ha identificado que contiene 1.752 genes codificadores de proteínas. Aproximadamente un tercio de estos genes no tienen una función identificable, y el resto cae en categorías previamente caracterizadas de función microbiana conocida. (Ferrati et al, 2001, p1). Es una de las especies más importantes del género y de las patologías humanas. Es la causa bacteriana más frecuente de faringitis y también de distintas infecciones cutáneas (Pérez y Mota, 2006, p.274).

Estos microorganismos como se mencionó son altamente patógenos en seres humanos, y en los últimos años se ha dado un alta tasa de resistencia de ambos a los antibióticos. Por ejemplo, en Chile, se han aislados cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes a macrólidos desde 1994, con un 7% de resistencia promedio en los últimos seis años en el área Metropolitana. Los problemas de resistencia de *S. pyogenes* son relativos a la adquisición de resistencia a macrólidos lo cual ocurre mediante al mecanismos modificación del sitio de acción en el ribosoma y el resistencia tipo MLSB (Camponovo, 2002).

Aproximadamente en 1940, empezaron a descubrirse las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina, ya que estas cepas eran capaces de producir penicilinas, (enzima que inactiva la acción de la penicilina). Esto se dio poco tiempo después de que se empezó a utilizar la penicilina de manera masiva para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias. Más tarde, a finales de los años cincuenta, la mayoría de las cepas eran penicilina resistentes. Debido a esto cómo ruta alterna, se empezaron a desarrollar la meticilina y la oxacilina, que son penicilinas semisintéticas, no obstante, en 1961 se encontraron cepas resistentes a la meticilina.

Estas cepas conocidas como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM), empezaron a propagarse en los hospitales de todo el mundo, lo cuál en sí era esto era un problema sin embargo se contenía dentro de este ambiente, pero años después se empezaron a encontrar pacientes fuera del ámbito hospitalario. La resistencia de estas cepas es cada vez mayor, en el 2011 aproximadamente la resistencia aumentó desde un 2% hasta un 64%, convirtiéndose en una gran amenaza para la salud pública actual. La alarma se suscitó al encontrar un mayor número de infecciones graves de la piel y de los tejidos blandos entre niños y adultos jóvenes sin factores de riesgo (Miranda, 2011).

En los últimos tiempos se ha comunicado en diferentes países como Argentina, Colombia, México, entre otros, un aumento en la prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios (Soloaga, Corso, Gagetti, Faccone, y Galas, 2004).

Esta modificación en el patrón de resistencia dificulta el uso de betalactámicos como opción preferencial de tratamiento para las infecciones de piel y partes blandas. El *Staphylococcus aureus* (SA) y *Streptococcus pyogenes* son los gérmenes que con mayor frecuencia determinan estas infecciones. Las modificaciones en los patrones de susceptibilidad resistencia de los gérmenes causantes de infecciones en estas zonas (piel y partes blandas) han generado la necesidad de modificar las pautas empíricas de tratamiento, adecuándolas a las nuevas situaciones epidemiológicas para evitar fracasos terapéuticos (Bermejo, 2012).

Ante estas alteraciones a la respuesta a antibióticos se encuentra una necesidad de cambio, donde es necesario tomar en consideración otras alternativas, entre ellas se encuentran las plantas medicinales, la cuál se puede identificar como una de las formas más antiguas de terapia médica y nunca han dejado de brindar beneficios a la salud ser humano, como a la industria farmacéutica.

Actualmente, la fitoterapia (ciencia basada en el estudio de las plantas ) ha desarrollado una gran importancia en el área científica como se ha expuesto. Para evaluar las distintas propiedades que una planta o árbol posee, se pueden utilizar las ramas, semillas y hojas. No obstante, hoy en día, es un gran desafío demostrar que algunas especies si cuentan con efectos medicinales. Por ello, esta disciplina científica se ha vuelto más conocida y estudiada, donde muchas de estas investigaciones en plantas ha generado grandes controversias, al mostrar alternativas de tratamiento para diferentes enfermedades del ser humano (Medina, 2015, p.1.

Existe respaldo científico de la gran cantidad de plantas, aceites o extractos que tienen efecto terapéutico. Así mismo, existe la evidencia de algunas culturas y países que han utilizado estos métodos de medicina tradicional durante siglos. Entre estas plantas, se encuentra el agente vegetal, *Bixa orellana*, que en Cuba por ejemplo, es muy utilizada para combatir el asma bronquial o como cicatrizante de heridas y quemaduras. Además, entre las propiedades medicinales de esta especie se reporta su acción antitumoral, antibacteriana, antifúngica, leishmanicida, antipirética y antimalárica (Fernández, 2011, pp. 181-184) .

Existe literatura que indica que la *Bixa orellana* es una planta con alta variedad de propiedades terapéuticas, en la Amazonía le dan gran cantidad de usos dependiendo de la parte de la planta que se utiliza. Las hojas por ejemplo, se aplican para aliviar cefaleas, irritación y malestar de garganta, en quemaduras y heridas, así como para evitar las cicatrices después de la viruela, entre otras. Por otro lado en el ámbito farmacológico es uno de los pocos productos de acción local, como cicatrizante, antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana siendo la *Bixa orellana* una posible alternativa adecuada para lesiones que requieran una terapia completa (Guamán, B. (2018), p.2).

De allí surge la interrogante de esta investigación: ¿Los extractos metanólico y acuoso de *Bixa orellana* ejercen acción antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*?

### **Hipótesis**

Los extractos metanólico y acuoso de *Bixa orellana* ejercen acción antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

### **Objetivo General**

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto metanólico y acuoso de la *Bixa orellana* en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

### **Objetivos específicos**

Realizar las extracciones acuosa y metanólica de la *Bixa orellana*.

Caracterizar los componentes principales del extracto de *Bixa orellana*, por medios químicos e instrumentales.

Comparar la actividad microbiológica de los extractos frente cepas de *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus pyogenes*.

## **Justificación**

Desde tiempos ancestrales las diferentes culturas han utilizado las plantas como medicina natural, y gracias a esas prácticas en la actualidad muchas se han podido utilizar para fines terapéuticos, e incluso para la creación de nuevos productos. Sin embargo, aún existen vacíos en la información para poder demostrar la efectividad de algunas de éstas.

Por este motivo en los últimos años, las investigaciones sobre plantas medicinales, han tenido por objetivo demostrar las propiedades que se les atribuye, en donde en culturas como la nuestra, por falta de un lenguaje gráfico (escritura), ha perdido o alterado esta información ancestral con el transcurrir de los años (Huamán, Sandoval, Béjar, Huamán, y Tarazona, 2013).

Las grandes entidades en medicina son concientes de las propiedades de las plantas y lo reconocen, por ejemplo el doctor Lee Jong-wook, director general de la Organización Mundial de la Salud (del año 2003 al año 2006) indica que esta organización apoya el uso de las medicinas tradicionales (como las plantas medicinales) y alternativas cuando éstas demuestran su utilidad para el paciente y representan un riesgo mínimo para este (OMS, 2004).

Así mismo el biólogo Doménico Carotenuto de la Organización Panamericana de la Salud reconoció que las plantas medicinales contribuyen al fortalecimiento de los programas de salud, y también a la economía del país, en la medida de que hay diferentes formas en que se aprovechan: tanto en medicamentos como materia prima, extractos alcohólicos o acuosos, entre otras (OPS, 2006, p.22).

Actualmente, la fitoterapia (ciencia basada en el estudio de las plantas ) ha desarrollado una gran importancia en el área científica como se ha expuesto. Para evaluar las distintas propiedades que cada una posee, se pueden utilizar las ramas, semillas y hojas. Nos obstante hoy en día, es un

gran desafío demostrar que algunas especies, verdaderamente, gozan de efectos medicinales. Por ello, esta disciplina científica se ha vuelto más conocida y estudiada, donde muchas de estas investigaciones en plantas ha generado grandes controversias, al mostrar alternativas de tratamiento para diferentes enfermedades del ser humano (Medina, 2015, p.1).

Para fines de esta investigación, se parte de que existe evidencia etnomédica que apoya las potencialidades terapéuticas de la *Bixa orellana*, y se han realizado múltiples estudios, como en Cuba, Perú y Ecuador, para determinar su actividad biológica. Por esta razón se ha escogido esta planta, utilizada a lo largo de la historia, con la finalidad de demostrar su acción, frente a patógenos comunes que afectan tanto a animales como a seres humanos (De la C y Martínez, 2010, p.235).

Sobre los extractos de las hojas de *Bixa orellana*, han examinado sus propiedades antimicrobianas in vitro, demostrando que este extracto exhibe un amplio rango de actividad antibacteriana y antifúngica. Se han estudiado también sus elementos químicos, que pueden ser responsables de los efectos farmacológicos de las extracciones de hojas, y la variedad de componentes con potencial farmacológico ha sido detectada (Stohs, 2013, p.2).

Para desarrollar este proyecto se utiliza, el extracto de la hoja de *Bixa orellana*, ya que como se expone en el párrafo anterior, y en un reporte publicado por la Revista para el Estudio de Plantas Medicinales, en el 2012; los extractos etanólicos de las hojas y semillas de B. Orellana muestran actividad contra todas las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y la levadura como hongo *C. Albicans*, además indica que la actividad parece ser más pronunciada en el extracto de la hoja (Fleisher, Ameade, Mensah y Sawyer, 2003).

El árbol de *Bixa orellana* se utiliza y comercializa mayormente por su aporte en la industria alimenticia y química, sobre todo para el uso de colorantes. Donde el mayor uso que se le da a las semillas y al fruto, sin embargo esta tiene antecedentes de poseer gran cantidad de propiedades que pueden ser aprovechadas en la industria farmacéutica, como su poder antioxidante, cicatrizante, y antimicrobiano, sobre todo de las hojas, las cuáles se pueden aprovechar por su fácil crecimiento aún más que los frutos.

Por lo tanto, aprovechando los datos de la medicina tradicional y el apoyo científico brindado por los resultados del estudio realizado por Fleisher, Ameade, Mensah y Sawyer (2003), sobre el uso de *B. Orellana*; para el objetivo de esta investigación se utilizarán dos extractos de las hojas de esta planta para probar su efecto en microorganismos comunes en piel, a pesar de que en la medicina antigua se han utilizado particularmente como un gargarismo para el dolor de garganta y la higiene oral. Además de proporcionar una nueva alternativa terapéutica para sustituir los antibióticos tópicos y sintéticos que existen en la actualidad.

Por otro lado la importancia social que tiene esta investigación se da debido a que como establece la OMS, la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Además recalcan que todos los días están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (OMS, 2004).

La resistencia bacteriana es tanto una preocupación como un desafío ya que no sólo afecta a los individuos de manera personal, si no que es un grave problema de salud pública, ya que se distribuye alrededor del mundo desmesuradamente, sin barreras, y de manera muy sencilla, ya sea por el contacto con otras personas u objetos que se movilizan y transportan hacia fuera y dentro de los países (Gervas, 2000, p.589).

Esta preocupante multirresistencia se debe a que se han utilizado los antibióticos más comunes de manera indiscriminada para tratar enfermedades infecciosas, por lo cuál los científicos han investigado nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales (Zampini, Cudmani e Isla, 2010,p. 385).

Razón por la cuál surge la inquietud de proponer y estudiar alternativas a las infecciones bacterianas, dado que los antibióticos existentes cada vez reciben menor respuesta terapéutica debido a estas resistencias bacterianas. Como respaldo a esta certeza, la OMS publicó una lista de patógenos resistentes, entre los que se encuentra el *Staphylococcus aureus*, microorganismo que se estudiará en este proyecto, y es caracterizado de prioridad elevada, por su conocida resistencia a la meticilina, con sensibilidad intermedia y así mismo resistencia a la vancomicina (OMS, 2017).

## Antecedentes

La *Bixa orellana* se conoce como una planta arbustiva de la familia Bixaceae. Esta se cultiva de manera perenne, y mide entre 3 y 10 metros de altura. Con hojas simples y grandes de forma acorazonada, alternas y de bordes lisos (Pérez y Becerra, 2003, p.8). Esta es originaria de América tropical, y se indica que posiblemente del suroeste de la Amazonia. Se extiende desde México hasta Brasil y Argentina y en el Caribe. Actualmente se distribuye en los países tropicales del nuevo y viejo mundo (Linnae, 1753).

Con respecto a su historia, la primera referencia que se tiene acerca de esta planta y del uso de sus semillas como pigmento, es de Cristóbal Colón (1492). (Leal y Michaelangeli, (2010), pp. 78-86). Además, su nombre se le da en honor al conquistador español Francisco de Orellana (1511-1546), siendo este quien bautizó el río Amazonas aduciendo que la tripulación había sido atacada por un grupo de mujeres guerreras, similares a las Amazonas de la mitología griega (UICN, 2015).

La *Bixa orellana* por sus orígenes era de uso común en las civilizaciones indígenas de América Latina, entre estas se encuentran los indígenas Kunas, quienes lo empleaban para la fabricación de cosméticos, también le daban uso medicinal, y lo utilizaban para teñirse el cuerpo y en sus ceremonias religiosas (Chizmar, Chizmar, Lu y Correa, 2009, p.48).

Por otro lado, Yong (2013), menciona que esta planta, es bien conocida por su agente colorante, y adicionalmente por su valor medicinal, siendo esta última, la razón por la cuál se escogió para este proyecto. Las semillas se pueden utilizar como tratamiento para enfermedades como la gonorrea o el asma, y se han utilizado tradicionalmente como gárgaras para el dolor de garganta, mientras que la corteza y la raíz se pueden usar para tratar la fiebre. Las hojas, se utilizaban como cura para mordeduras de serpientes, ictericia, diabetes e hipertensión, especialmente en Trinidad y Tobago, mientras que también se usa como medicina posparto en Malasia. Así mismo se ha estudiado que las hojas de *Bixa orellana* tienen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antileishmanianas, anticonvulsivantes, analgésicas y antiinflamatorias.

A nivel internacional, se realizó una investigación en bases de datos académicas: OPAC, EBSCO, SCIELO, MEDLINE, PUBMED, PUBCHEM, GOOGLESCHOLAR, La biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social, encontrándose estudios y artículos científicos que apoyan y sustentan la realización de este proyecto ya sea por su metodología o resultados obtenidos. A continuación, se exponen:

En Brazil (2009), se publicó un estudio donde se evaluó la actividad antimicobacteriana de un extracto de *Bixa orellana*, donde los extractos hidroalcohólicos de tallo, raíz y hoja de *Bixa orellana* L. mostraron actividad bacteriostática contra *Salmonella typhimurium*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se determinó la actividad antimicobacteriana en extractos hidroalcohólicos de hojas, raíces y tallos de *Bixa orellana* L. contra *Mycobacterium tuberculosis*.

En Perú, Barro y Domínguez (2013) realizaron una identificación de los fitoconstituyentes y cuantificación de los flavonoides totales en las hojas de achiote (*Bixa orellana*), debido a todas las propiedades antioxidantes y medicinales que caracterizan a estos metabolitos. De estos identificaron: alcaloides, antocianidinas, flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides, por lo que recomendaron realizar estudios que demuestren la acción farmacológica de los fitoconstituyentes de las hojas de esta planta.

Así mismo Huamán y otros (2013), utilizan un extracto tanto acuoso como hidroalcohólico de hojas de *Bixa orellana*, con la finalidad de demostrar científicamente las propiedades hepatoprotectoras en indicadores no enzimáticos en ratas. Este estudio se realizó de manera analítica y experimental. Obteniendo como principal resultado que los dos extractos, después de días de tratamiento, lograron reducir la bilirrubina, presentaron niveles reducidos de (TBARS) especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en hígado y suero, entre otros. Evidenciando, además, que estos extractos pueden intervenir en el daño hepático originado por radicales libres.

En esa misma línea Melvar y Molina (2013), realizaron una investigación acerca del efectoprotector de un extracto acuoso de hojas de *Bixa orellana* vs misoprostol en un modelo de úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones, y al tabular los resultados estadísticos

encontraron diferencias significativas en cuanto inflamación y hemorragia, por lo que afirman que el tejido tratado con achiote fue similar al tejido del grupo sano.

En 2015, Medina realizó un estudio in vitro para evaluar el efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de *Bixa orellana* sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*, que son patógenos bucales. En este se compararon los extractos de semillas y hoja del achiote, obteniendo como resultado principal un mayor efecto antibacteriano con el extracto metanólico de las hojas, y además se determinó que el extracto tanto de las hojas como las semillas no es citotóxico.

Por otro lado, Ramírez (2018), en su trabajo de titulación, utiliza un extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana*, similar al propuesto en esta investigación, para la comprobación de su efecto antifúngico en un estudio in vitro frente a *Candida albicans*. Realizado así debido a que este microorganismo es uno de los más comunes en infecciones bucales. En su trabajo determinó que el extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana* a las concentraciones del 75% y 100%, en contacto con láminas de acrílico contaminadas de *Candida albicans* ATCC 10231 si posee una eficacia antifúngica.

Según la búsqueda realizada para el desarrollo de este proyecto no se encontraron antecedentes nacionales que pudieran sustentarlo. Se hizo una revisión en la base de datos de la Universidad de Costa Rica, la Universidad Nacional, la Universidad Iberoamericana, y la Universidad Internacional de las Américas. Al ser este un tema con una nueva propuesta para el uso de esta planta, actualmente en Costa Rica no se ha evaluado su uso de esta manera.

## **CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO**

En el siguiente apartado se presentan los conceptos y definiciones más relevantes que se clasificaron para fundamentar teóricamente el desarrollo de este trabajo así como la comprensión e interpretación adecuada del mismo.

### **Medicina natural**

Este término hace alusión a la medicina que se basa en métodos más naturales para curar, es decir no químicos sintetizados en laboratorios, como los son las plantas, el agua, la alimentación, etc. (Rodríguez, 1999, p.8).

La medicina natural comprende diferentes disciplinas, algunas de ellas muy diferentes entre otras, incluso son atendidas por diferentes especialistas, de las prácticas o terapias más comunes son: la acupuntura, quiropraxia, terapias manuales, flores, reflexología, y las plantas medicinales (Zagrheca, (2007), p.21).

Las plantas medicinales es una de las prácticas más comunes y reconocidas de la medicina natural que se utilizan alrededor del mundo. Inicialmente, las poblaciones indígenas fueron quienes más hicieron uso de estas, ya que por muchos años los recursos vegetales del entorno fueron los únicos medios que tenían para atender sus necesidades terapéuticas y paliativas. Así mismo por siglos se ha logrado demostrar con gran cantidad de investigaciones las propiedades de las plantas.

Con el fin de poder apoyar la información que se tenía de siglos de uso tradicional y el interés de científicos, e industrias de hacer uso del poderoso impacto que tienen las plantas y otros organismos en el ámbito de la medicina natural, surge la ciencia farmacológica conocida como farmacognosia (Busmann y Sharon, (2015), pp.10-50).

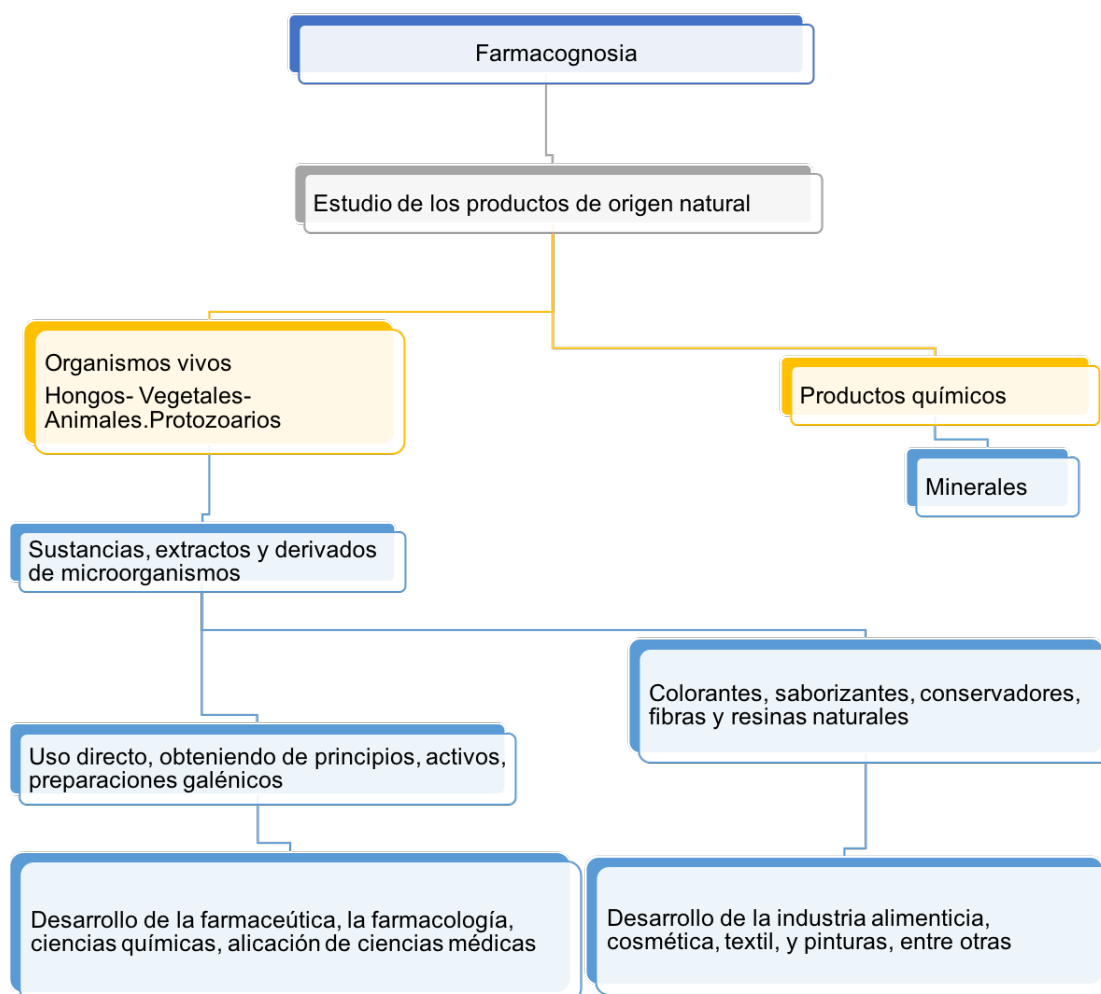
### **Farmacognosia**

Esta se encarga del estudio de materias primas de origen biológico (drogas) obtenidas de vegetales, animales o microorganismos, que pueden utilizarse para la elaboración de

medicamentos. Estas materias primas proporcionan tanto principios activos con acción terapéutica directa o productos naturales modificables por métodos químicos o microbiológicos para convertirse en otros más eficaces (Giner, Zafra, Cortés, Terencio y Blásquez, 2010, p.18).

De manera más extensa la farmacognosia envuelve el estudio integral del uso de los compuestos de origen natural, empezando por la historia, la evaluación e identificación, el cultivo, crecimiento, preservación, industrialización, distribución, farmacología y modos de uso tradicional, en búsqueda de una mejor salud, y bienestar del ser humano (Gallardo, et al (2004) p.123).

**Figura 1. Farmacognosia**



Nota: Gallardo, et al (2004) p.125.

## **Planta medicinal**

Por consiguiente lo que hoy en día se conoce como plantas medicinales que han sido abordadas a través de la farmacognosia quien se ha dedicado a investigarlas, Chateaufeuf y Benavides (2016), las definen como: "cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas terapéuticamente o que son precursores para la hemisíntesis químico – farmacéutica"(p.6) mientras que la Organización Panamericana de la Salud (OPS) se refiere a estas como aquellas especies vegetales cuya calidad y cantidad de principios activos tienen propiedades terapéuticas comprobadas empírica o científicamente en beneficio de la salud humana" (OPS, 2006, p.21)

Otra definición que puede tomarse como como referencia para esta investigación coincide en que son organismos vegetales que contienen, componentes con la capacidad de ejercer acción farmacológica sobre los seres vivos, de forma positiva o no, lo que indica que contienen principios activos responsables de esas acciones (Brutti, 2004, mencionado por Madaleno , 2007, p. 65).

## **Fitoterapia**

Una vez reconocidas la plantas como medicinales para el correcto uso de estas nace la fitoterapia, ciencia que: " estudia el uso de plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas (fitofármacos), cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos" (Cea de Amaya, 2013, p.2).

Por otro lado la OPS, 2013 explica la fitoterapia como la utilización de las plantas con acciones medicinales, ya sea partes de esta o la planta entera, así mismo pueden manipularse en diferentes condiciones, como frescas, secas, también pueden utilizarse extractos y formulaciones siempre y cuando no se le agreguen otras sustancias activas por medios sintéticos o industriales, para lograr su acción farmacológica(p.1).

La palabra fitoterapia se ha utilizado desde inicios del siglo 20, para designar la utilización de plantas con fines terapéuticos, no obstante, en los últimos años se ha empezado a popularizar nuevamente dado el reciente interés delos científico sobre las plantas medicinales, desde la comprensión de su riqueza hasta su variabilidad química, dando un valor nuevamente al empleo de estas en varias partes del mundo, y comprendiendo que pueden utilizarse como una forma complementaria de curación, donde se ha empezado a desplazar los conocimientos empíricos sobre estas, por evidencia científica (Avello, A. y Cisternas, I., (2010), p.2.).

### **Fitofármacos**

Estos se pueden producir cuando se desarrollan las condiciones óptimas para obtener metabolitos secundarios. Este término se refiere a medicamentos donde el extracto específico de una planta es quién contiene el principio activo, mientras que los fármacos desarrollados en la industria farmacológica provienen de moléculas sintetizadas químicamente.(Hernández, 2013, p.6).

Bajo esa línea la OMS, 2010,los define como materiales que a través de procesos idóneos de manera tecnológica se pueden elaborar utilizando únicamente materia vegetal, con el propósito de utilizarse para diagnosticar enfermedades, así como de forma preventiva, terapéutica o paliativa.

La preparación de fitofármacos a partir de partes vegetales puede ser:

Partes vegetales cortadas o pulverizadas.

Jugos de partes de plantas.

Tinturas, maceraciones en aceites, destilados

Extractos de partes de plantas, obtenidos mediante solventes dentro del marco del conjunto

de algunos de los procedimientos anteriores

## **Fitoquímico**

Los fitoquímicos son las sustancias por las cuáles se pueden desarrollar los fitofármacos, que son sintetizadas por individuos de origen vegetal que frente a condiciones patológicas tienen la capacidad de proteger (Bello, 2000, p.244).

## **Metabolismo**

Las células de los seres vivos producen reacciones químicas conjuntas que se conocen como metabolismo, de esta manera se sintetizan sustancias complejas a partir de otras más simples, o se degradan complejas en simples (Ávalos y Pérez, 2009, p.119).

## **Metabolitos**

Los metabolitos son productos de reacciones catalizadas por enzimas que ocurren dentro de las células. Durante el metabolismo intracelular se degradan moléculas para la obtención de energía y se sintetizan moléculas esenciales para la reproducción y la reparación. Las reacciones metabólicas transforman el sustrato inicial en metabolitos primarios y secundarios (Harris, E. s.f).

Para que un compuesto sea categorizado como metabolito, debe cumplir los siguientes requisitos:

- Son compuestos que se encuentran dentro de la célula.
- Son compuestos reconocidos por enzimas y actúan sobre ellas.
- El producto de un metabolito debe poder entrar en reacciones posteriores.
- Tienen una vida media finita por lo que no se acumulan dentro de las células.

## **Metabolitos primarios y secundarios**

Las plantas, tienen la característica de tener dos tipos de metabolitos, el primario, que se encuentra en todos los seres vivos, y el secundario, que les permite producir compuestos químicos diversos. Estos últimos, se distribuyen en grupos taxonómicos, con grandes propiedades biológicas

y ecológicas, las cuales permiten sus diferentes aplicaciones en varios campos, por ejemplo, el desarrollo de medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros.

Estos metabolitos secundarios no todos presentan función definida ni están presentes en todos los tipos de plantas. Ahora bien, algunos de los productos del metabolismo secundario cumplen funciones como pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, para atraer insectos polinizadores, o para alimentar animales mientras que otros cumplen función protectora contra depredadores, o como mecanismos de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. Estos, se sintetizan en poca cantidad, y se producen según el género, familia o especies de la planta que los produzca (Ávalos y Pérez, 2009, pp.119-120).

Los metabolitos secundarios son compuestos que se sintetizan por diferentes rutas metabólicas, dependiendo del orden genético de la planta, por lo que se pueden agrupar en las siguientes clases (Avelloy Cisternas, (2010), p.3).

- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardíacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

A continuación se detallan algunos de los metabolitos secundarios más comunes por tener acción farmacológica. Para detallar estos se utiliza como referencia principal la guía Fitoterapia Vademécum de Prescripción (2003)

### **Alcaloides**

Se les denomina a los compuestos orgánicos que hacen la tarea de neutralizar los ácidos para crear sales, como por ejemplo el amoníaco. Contienen nitrógeno y cumplen con las leyes generales de las dobles descomposiciones. También se les conoce como álcalis orgánicos o bases orgánicas. De acuerdo de donde provengan se les denomina, alcaloides naturales (formado en las

plantas); alcaloides artificiales (formado por reacciones sobre sustancias orgánicas) (De la Puerta, 1869, p.137).

### **Flavonoides**

Se encuentran principalmente en las hojas altas de las plantas como en sus flores y frutos, estas son protectores capilares y venosos que ayudan al procesamiento del colágeno. Estos compuestos están formados por un anillo de benceno (anillo A), una cadena lactónica ya sea abierta o cerrada y otro anillo de benceno (anillo B), los dos anillos pueden tener uno o varios grupos o sustituyentes, como grupos hidroxilos, metoxilos o cadenas alifáticas. De acuerdo a su estructura química estos se dividen en subgrupos como flavonas, flavonoles, flavanonas, chalconas e isoflavonoides. (Vanaclocha, y Cañigüeral, 2003, p.32). Entre las propiedades farmacológicas que se han descrito de los flavonoides están actividad protectora hepática, antiinflamatoria, antialérgica, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, cicatrizante, y hasta reducción de hiperpigmentación (Cartaya y Reynaldo, (2001), p.11).

### **Nafto y Antraquinonas**

De estructura quinónica. Son un derivado antracénico de los acetatos y sikimatos, y que tienen propiedades laxantes, en grandes dosis puede funcionar como purgante (Vanaclocha, s y Cañigüeral, 2003, p.33).

### **Esteroides y triterpenoides libres**

Comprende parte de un ácido mevalónico, que se caracteriza por tener propiedades tensioactivas y afrógenas y pueden ser muy peligrosos si se administran por vía intravenosa dado que resultan tóxicos (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003, p.38).

### **Taninos**

Pueden precipitar las proteínas y formar sales con los alcaloides y se utilizan por sus efectos al detener la diarrea, ayuda a cicatrizar y acciones hemostáticas. Algunos efectos no

deseados es que pueden irritar la mucosa gástrica y también producir estreñimiento (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003, p.33).

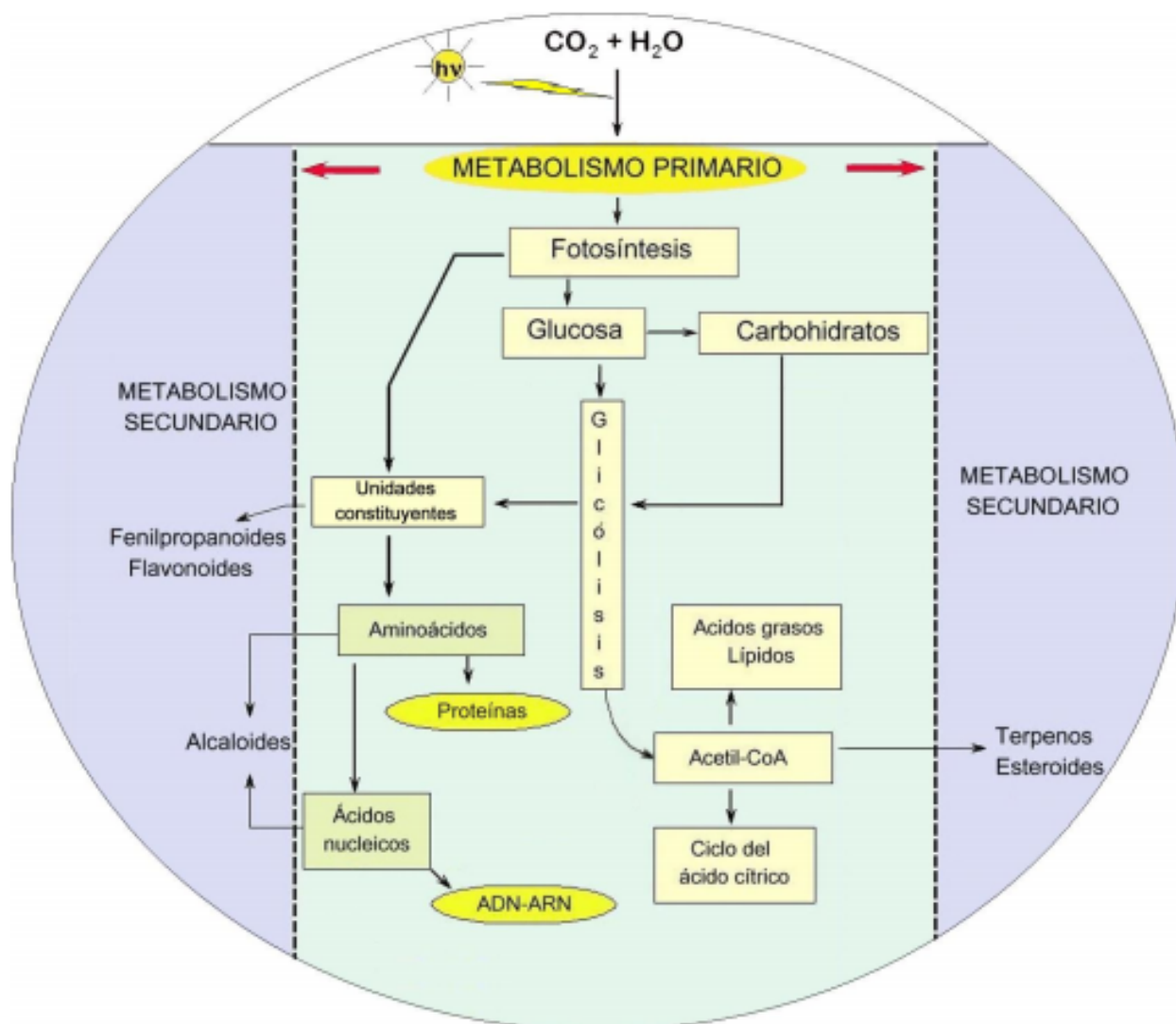
### **Saponinas**

Se caracterizan por tener propiedades tensioactivas y afrógenas. Si se administran por vía intravenosa pueden ser altamente peligrosos por tornarse tóxicos. Se clasifican, de acuerdo a donde provenga la genina que la compone, en: triterpénicas, pentacíclicas y tetracíclicas (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003, p.39).

### **Terpenos**

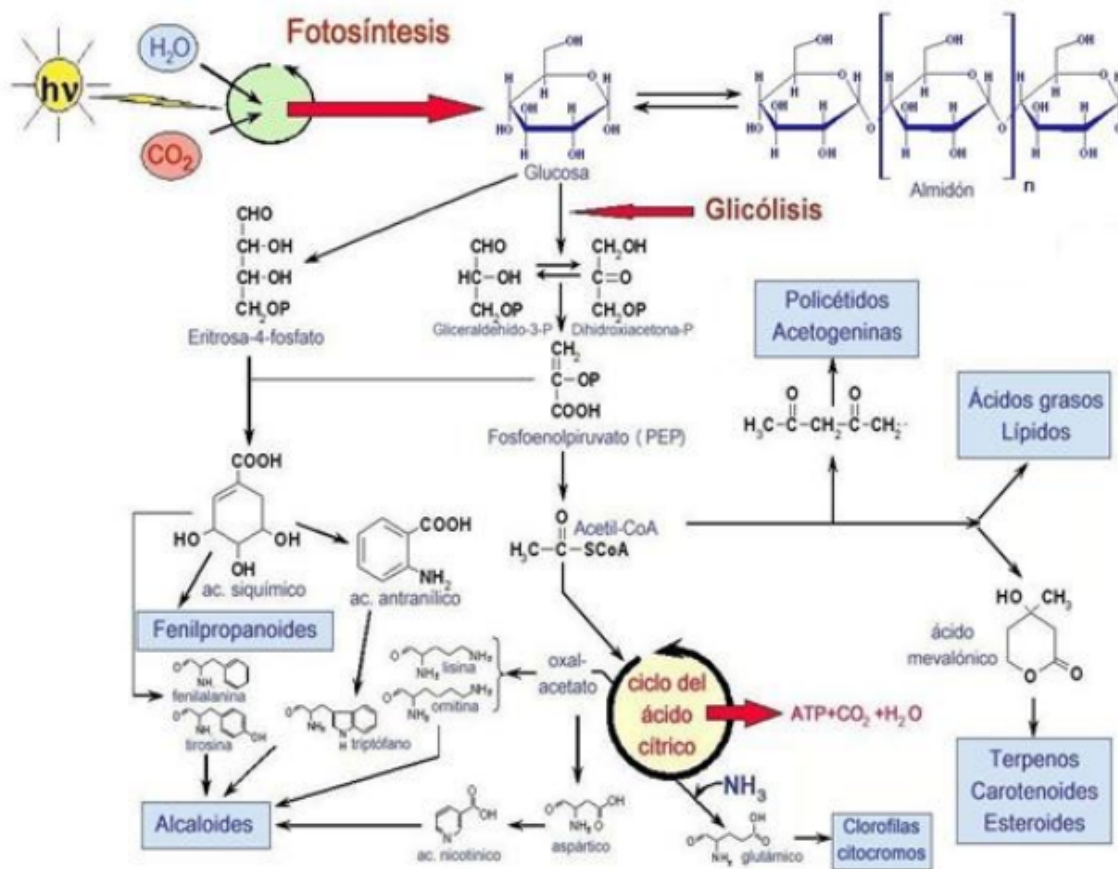
Los terpenos son un amplio grupo de compuestos que se caracterizan por estar formados por la unión de unidades penta carbonadas, llamadas isopreno. Según formen parte de su esqueleto hidrocarbonado, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 8 unidades pentacarbonadas (C<sub>5</sub>), los terpenos se clasifican en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos, respectivamente (Wagner y Elmadfa, 2003). Estos compuestos derivan biogénicamente del ácido mevalónico, el cual, mediante una serie de reacciones orgánicas clásicas catalizadas por enzimas, va a dar lugar a los precursores de los principales tipos de terpenos (Wagner y Elmadfa, 2003, pp. 95-106).

**Figura 2. Elementos Básicos del Metabolismo Primario y Su Relación con el Metabolismo Secundario de las Plantas**



Nota: Ávalos y Pérez. (2009).

**Figura 3. Origen de Algunos Metabolitos Secundarios (Alcaloides, Fenilpropanoides y Terpenos) en el Metabolismo Primario.**



Nota: Ávalos y Pérez. (2009)

## **Método de Extracción**

La extracción de metabolitos se da mediante el tratamiento de la material vegetal con un disolvente adecuado, que solubilice, mayoritariamente los principios activos deseados. Es importante tener presente la naturaleza química de los metabolitos presentes en el material vegetal y así aplicar el método extracción más adecuado. De este modo se puede obtener los beneficios de algunas plantas medicinales separando los componentes con acción terapéutica de los que no.

Martínez (2016) describe la extracción como un proceso de separación de una mezcla de sustancias, por disolución de cada componente. Donde se pone en contacto directo el material orgánico con una fase líquida, de uno o varios disolventes (la elección de esta fase debe ser compatible con los productos que se desean obtener), 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 (p. 8).

Para la obtención de los materiales o sustancias con propiedades farmacológicas de algunas plantas medicinales es necesario poder separar sus componentes con acción terapéutica de los que no, y normalmente esto se da utilizando algún método de extracción, dando lugar a las soluciones deseadas.

## **Soluciones extraídas**

Son formas farmacéuticas líquidas constituidas por los principios activos solubles contenidos en una porción medicinal de tejidos vegetales o animales y separados del residuo de la extracción (Martínez, 2016, p.9).

Existen distintos procesos de extracción y la elección del mismo depende de la naturaleza de los principios activos que se desean extraer, y del producto final al que se desea llegar.

Los procesos de extracción varían en función de la escala de producción, de la naturaleza y calidad de la materia prima y naturaleza del solvente. Estos procesos se suelen separar en dos. Procesos que dan como resultado en equilibrio entre la concentración entre y soluto y el residuo y procesos que agotan la droga completamente (Sharapin, 2000, p.41).

## Maceración

La maceración es descrita por Fonnegra y Jiménez (1999) como una operación por la cuál se extraen los principios activos de una planta a temperatura ambiente, utilizando agua, alcohol, vino o aceite como disolvente. La planta debe limpiarse bien, y triturar, machacar, o pulverizar antes de ponerla en remojo. Se debe sumergir el material vegetal con suficiente cantidad de solvente para que lo cubra por completo, se tapa y se deja reposando por períodos que van de 24 horas a 2 semanas, se revuelve de vez en cuando para favorecer la extracción. Una vez finalizado se filtra el residuo y se tapa (p.7).

**Figura 4. Ilustración de un Proceso de Maceración**



Nota: Fonnegra R. y Jiménez S. (1999), p.10.

## Destilación

Lamarque y otros (2008) lo describen como "el proceso que consiste en calentar un líquido hasta condensar los vapores formados y recolectarlos como líquido destilado". En este proceso el vapor que se retira del líquido, pasa por un medio refrigerante donde se condensa y se puede recolectar el líquido.

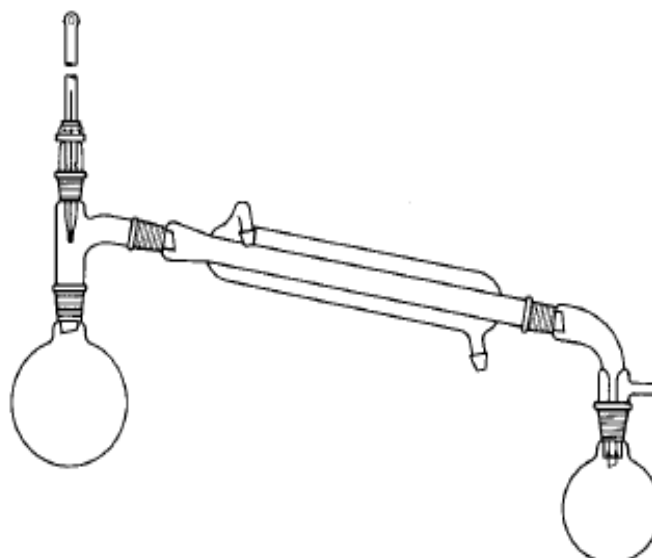
Para fines de esta investigación se utilizan las siguientes formas de destilación:

### **Destilación simple**

Este método es utilizado para separar sustancias cuyos puntos de ebullición son distintos. Los vapores generados son dirigidos hacia un condensador donde se enfrían (condensan) y separan. En el método tradicional de destilación, se coloca la sustancia a separar en el balón de destilación al cual se le aplica una fuente de calor que evapora primero las sustancias con puntos de ebullición menores y cuya temperatura es registrada por el termómetro acoplado en la cabeza del balón de destilación.

El vapor pasa por el condensador para transformarse en líquido el cual se recibe en el recipiente recolector. Durante la destilación de una sustancia pura, la temperatura de ebullición permanece constante, no así es el caso en una sustancia compuesta (Pavia, Kriz, Lampman, Engel, 1998, p.101).

**Figura 5. Equipo de Destilación Simple Conformado por dos Balones, Termómetro, Condensador, Salidas y Entradas de Agua, Prensas y una Fuente de Energía**



Nota: Pavia, Kriz, Lampman y Engel. 1998, p.102.

## Destilación por Rotavapor

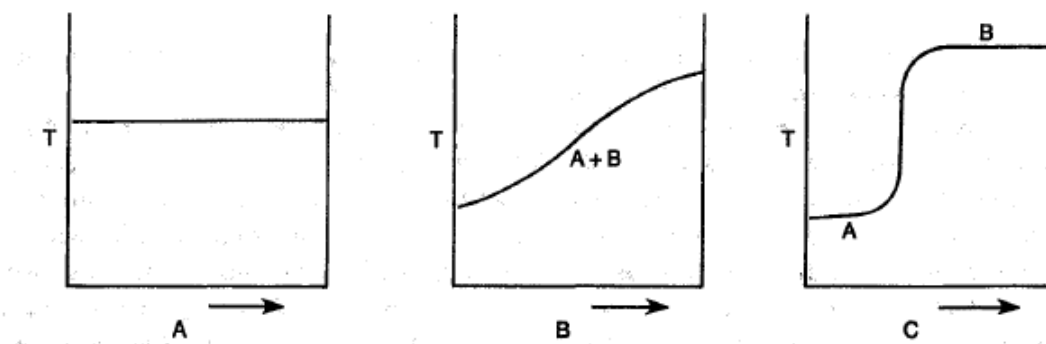
Para separar mezclas homogéneas con líquidos cuyos puntos de ebullición son diferentes pero cercanos, se utiliza la destilación fraccionada. La destilación por rotavapor permite hacer una destilación fraccionada al utilizar un aparato de rotación destilatorio que se encuentra en baño maría. Otra diferencia de la destilación simple, es la aplicación de la bomba de vacío al sistema que reduce la presión y permite una separación más efectiva y rápida.

**Figura 6. Ejemplo Equipo de Rotavapor**



Nota: Fisher scientific (2018).

**Figura 7. A) Registro de Temperatura de una Sustancia Pura, B) Registro de Temperatura de Dos Componentes con Puntos de Ebullición Similares, C) Registro de Temperatura de Dos Componentes Cuyos Puntos de Ebullición son Distintos.**



Nota: Pavia, Kriz, Lampman y Engel. (1998).

## Liofilización

La liofilización consiste en un medio mediante el cuál el agua es retirada de un producto congelado por sublimación. En este proceso no se pasa por el estado líquido, por el contrario pasa el agua congelada anteriormente directo a vapor (Costa, Cervera, Cunill, Esplugas, Mans y Mata., 1991, pp. 69-70).

La sublimación se realiza al vacío con el objetivo de liberar el agua libre, y esto se da bajo un un aporte de calor mediante una temperatura ajustada que permita mantener mantener el equilibrio, ya que si no se puede licuar o fundir. El agua residual se separa mediante una desecacion secundario al vacío y a altas temperaturas (Muñoz y Grau, 2013, p.40).

## Tipos de liofilizadores

Acorde a Nonhebel y Moss, (2002) los liofilizadores se clasifican según el uso que se les da, de la siguiente manera (p.333).

- Liofilizadores de recipientes rotatorios: utilizados únicamente para el secado de líquidos.

- Múltiples liofilizadores: Estos permiten secar varios recipientes pequeños a la vez.
- Liofilizadores de armarios: Son lo más usados, y sirven para una gran cantidad de sustancias.

Ríos y Muñoz (2013) indican que este proceso es ideal para obtener productos secos de gran calidad sin que pierdan sus propiedades organolépticas, biológicas, sin alteración de vitaminas, ni otros componentes. Por esta razón este se ha extendido en la industria farmacéutica y alimenticia.

### Generalidades de la *Bixa orellana*

Es un árbol de las zonas tropicales de América, que debe su nombre común axiote u achiote al dialecto azteca: Náhuatl (Irobi, Moo-Young y Anderson, 2008, p.87).

Según la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), estos árboles son caracterizados por tener alturas entre 3,5 y 8,0 m, cuentan con raíces largas, tallo liso y ramas de color gris cenizo; también ramas y ramitas de color marrón cenizo. Su madera es blanca y suave; y sus hojas son alternas enteras, con un haz membranosa, de color verde oscuro, con dimensiones aproximadas de 10 a 25 cm de largo y de ancho 10 a 20 cm, con bases redondeadas; y ápices acuminados; con pecíolos de unos 6-12cm (*Bixa orellana* L. (1753),(s.f.), pp.58-61).

### Clasificación Taxonómica

**Tabla 1. Taxonimia de la *Bixa orellana***

Orden:	Violales
Familia:	Bixaceae
Género:	Bixa
Especie:	<i>Bixa orellana</i> L.

Nota: Leal y Michaelangeli, (2010), p.80.

### **Descripción y partes de la planta**

A continuación, se describen las principales partes de la planta, según lo indicado en un artículo realizado por el Sistema Nacional de Información Forestal de México(Bixa orellana, (s.f., pp.1-2).

**Tronco:** Tronco cilíndrico.

**Ramas:** Jóvenes, color café claro, delgadas; con puntas verdes.

**Copa :** Copa redondeada y densa.

**Figura 8. Fotografía de Árbol *Bixa orellana***



Nota: Catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá por UEIA(2014)

**Raíz:** Sistema radical pivotante y muy largo.

**Hojas:** Hojas simples, alternas, grandes y lustrosas, ovadas, de punta larga en el ápice, en pecíolos delgados y largos, acorazonadas en la base, puntos notables de color marrón.

**Figura 9.**Fotografía de Hojas de *Bixa orellana*



Nota: Catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá por UEIA (2014).

**Frutos:** cápsula ovoide a ovoide globosa, pardo-rojiza, de 3 a 5 cm de largo por 3 a 4.5 cm de diámetro, erizado de pequeños agujones delgados y blandos hasta de 6 mm; contiene aproximadamente 50 semillas. Figura 10.Fotografía de flor y fruto de Bixa Oorellana

**Semillas:** Semillas rojas casi triangulares algo comprimidas y pequeñas, de 5 a 5.5 mm de por 4 a 5 mm de ancho, con una testa pulposa de color rojo y un albumen carnoso.

**Figura 10. Frutos (Izquierda) y Semillas (Derecha)**



Nota: Catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá por UEIA (2014).

**Corteza:** Externa café, fisurada, se desprende fácilmente. Interna amarillo-anaranjada, con savia anaranjada, pegajosa, ligeramente amarga.

**Figura 11. Fotografía de Corteza de *Bixa orellana***



Nota: Catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá por UEIA (2014).

**Flores:** grandes, vistosas, dispuestas en corimbos terminales, llevando los pedúnculos de 2 a 4 flores de color rosado, rojizo o blanco, de 4 a 5.5 cm de diámetro; cáliz de 5 sépalos, verde castaño que pronto se caen; corola de 5 pétalos, anchos y redondeados.

**Figura 12. Fotografía de Corteza de Bixa orellana.**



Nota: Catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá por UEIA (2014)

### **Componentes fitoquímicos las hojas**

En una publicación realizada por Instituto Nacional de Salud de Perú se denota que en las hojas la Bixa orellana contiene los siguiente:

Bixaganeno, ishwarano (aceite esencial) entre otros terpenos, monoterpeneo, diterpenos (fitol) sesquiterpenos; flavonoides: 7-bisulfato de apigenina, 7-bisulfato de luteolina, 8-bisulfato de hipolaetina, glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, hipoaetina, cosmosiina, entre otros como: flavonas, antocianidinas y sesquiterpenlactonas (Ramírez T., 2001); carotenoides: bixina, norbixina, orellina,  $\beta$ -caroteno, criptoxantina,

metilbixina, zeaxantina, luteína; ácido tomentósico; vitaminas (A, B, y C); proteínas; azúcares; celulosa; grasas; calcio, fierro y fósforo; diterpenos: farnesilacetona, geraniol, geranil formato, alcaloides (vestigios), ácido gálico (benzenoide) y ácido alfitólico(Achiote vandemecum. (S.f.). p.1).

### **Nombres comunes**

En seguida se enlista algunos de los nombres comunes utilizados para esta planta, por país o lugar según Guamán, 2018.

- Atolé, achiote y bija: Perú y Cuba.
- Axiote: México.
- Achiote, achote, anatto, bija y santo-domingo: Puerto Rico.
- Analto :Honduras.onotto y onotillo: Venezuela.
- Achiote y urucu :Bolivia.
- Bixa: Guyana.
- Urucu: Argentina.
- Roucou:Trinidad.
- Auajachote: El Salvador.
- Roucou y koessewee: Suriname.
- Annatto: Estados Unidos.
- Onoto, Onotillo:Venezuela.
- Orenetto y Orlean: Europa.
- Pirrimapa: Amazona,Caquetá,Guainía y Vaupés.

### **Usos Tradicionales**

Seguidamente se mencionan algunos usos tradicionales en los que se emplea la Bixa orellana, tomando como referencia un artículo publicado por la Comisión Nacional Forestal de México (CONAFOR). (Bixa orellana. (S.f.) p.2):

- **Condimento alimenticio:** se ha empleado por muchos años para colorear alimentos como el arroz, algunos lácteos, margarinas, sopas, aceites y otros.
- **Como colorante:** El aceite extraído de las semillas es la principal fuente de los pigmentos Bixina y Norbixina, que se clasifican como carotenoides. Y son utilizados comúnmente en la industria, especialmente en los lugares que se han prohibido o delimitado el uso de colorantes artificiales.
- **Materia prima industrial:** Se utiliza en la producción de barnices, cosméticos, repelentes, tatuajes, y decoración de cerámicas, textiles, entre otros.
- **Usos medicinales:** Popularmente el té a base de pequeños vástagos y hojas es usado como antidisentérico, afrodisíaco, astringente, también se han utilizado las hojas como antiinflamatorio, cicatrizante, para el acné, la alopecia, asma, condiloma, gonorrea, sarampión y para tratar infecciones de la piel, fiebres y hepatitis, hemorroides, trastornos hepáticos, hipertensión arterial, malaria, nefrosis, en el tratamiento de mordidas de serpientes, dolor de estómago, estomatitis, tonsilitis y en la curación de heridas y quemaduras. Por otro lado los extractos en alcohol etílico de los frutos y hojas han mostrado tener in vitro actividad frente a algunos microorganismos.
- **Como adhesivo:** De las ramas se obtiene una goma que es similar a la goma arábiga.

### **Técnicas instrumentales de análisis**

Para el aislamiento e identificación de los principios activos, la farmacognosia utiliza técnicas instrumentales que son cada vez más sensibles, como lo son la cromatografías y las técnicas espectroscópicas.

Una técnica de análisis se conoce como un proceso científico que ha demostrado utilidad para proporcionar información acerca de la composición de las sustancias; entre ellas tenemos la espectrometría de infrarrojo, la espectrometría de masas y la cromatografía de gases. (García, Gavilanes, Martínez, Montero, Oñaderra y Vivanco, (1999). p.310)

### **Técnicas de identificación y cuantificación de fitoquímicos**

Existen diferentes métodos cualitativos y cuantitativos para la detección de metabolitos provenientes de plantas (Colina, A. 2016).

Para que desarrollo de este proyecto se utilizarán las siguientes técnicas para analizar los extractos obtenidos por tanto el método metanólico como acuoso.

#### **La espectrometría de masas**

Es una técnica de análisis cualitativo, que se utiliza mucho para determinar estructuras orgánicas. Esta se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos los iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado. Obteniéndose información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos (Guía de Química, 2010, pp. 3-4).

#### **Espectrometría de infrarrojo**

Ostrooumov (2007), acerca de esta técnica explica lo siguiente:

La espectrometría infrarroja se sustenta en la absorción de la radiación infrarroja. Donde cada molécula presenta un espectro infrarrojo, que es específico según la composición estructural de esta, que determina la identidad de las moléculas dado que brinda información de las características, según las propiedades cristalinas y químicas de los minerales u otras partículas.

Este espectro infrarrojo es tanto de absorción, como reflexión o de emisión de compuestos químicos inorgánicos u orgánicos.

Cuando se suministra la energía infrarroja las moléculas vibran según la naturaleza de la misma, y de acuerdo a la longitud de onda que cada una absorbe se emita una señal que indica los grupos atómicos de la estructura cristalina obteniendo así el detalle de que tipo de moléculas componen la sustancia estudiada (p. 6).

### **Cromatografía de Gases**

Esta otra técnica se caracteriza por ser una de las que tienen mayor utilización, dado que ninguna otra técnica analítica ofrece su capacidad de separación o su sensibilidad a la hora de analizar compuestos volátiles. Esta se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmóvil sobre la superficie de un sólido inerte. Esta particularidad de que las mezclas sean separadas en fase gaseosa, establece los límites de su utilización, que estarán marcados delimitados por la estabilidad térmica de los compuestos a separar (Universidad Autónoma de México, 2004, pp.1-2).

### **La Piel**

De acuerdo a Laurente y Holland (1828), la piel humana, es el órgano que cubre toda la superficie externa del cuerpo. Conformada por dos capas la externa conocida la epidérmica de células muertas (queratina) y la interna que es la dermis. Esta última compuesta por colágeno y elásticos la cuál hace a la piel un órgano flexible ( pp.134-135).

La piel además de cubrir el cuerpo tiene diferentes funciones muy importantes: Es el escudo de defensa del cuerpo que protege, frente a las fuerzas mecánicas y a la penetración de diversos agentes químicos, y frente a los microorganismos, siempre que no se altere por lesiones químicas o mecánicas. Además, controla la pérdida de agua del organismo y lo protege de la luz natural y artificial, así como del frío y el calor (Enciclopedia de la OIT, 2012).

## **Flora bacteriana de la piel**

En varios lugares del cuerpo humano, entre ellos la piel, se encuentra la microbiota o flora bacteriana normal, la cuál se refiere a diferentes microorganismos que habitan en zonas tanto externos como internos del ser humano sano. (Caballero, 2009, pp.8-9).

Esta se define como microorganismos comensales, que pueden tener funciones fisiológicas importantes. Sin embargo; cuando hay alguna alteración de esta puede haber un crecimiento anormal de los patógenos que forman parte de esta o favorecer la invasión de otros patógenos externos (Garmaño, Barrios y Cardenas, 2009, pp.34-35).

Para comprender más a fondo la naturaleza de los patógenos que pueden afectar la piel, que son estudiados en esta investigación se utilizan como fuentes principales los libros: Infectología clínica, 2012, y nociones de infectología 2010.

## **Infecciones en piel**

Acorde con Ramos (2012), "la superficie cutánea puede afectarse por infecciones de bacterias, hongos y virus. La piel, mediante sus mecanismos de defensa, previene estas alteraciones; sin embargo, factores locales, genéticos, metabólicos, así como abrasiones, quemaduras y heridas, facilitan el desarrollo de infecciones por bacterias que colonizan la piel y otras que la infectan de manera ocasional"(p.130).

Según Litterio, et al (2005) es común que bacterias anaerobias que son parte de la microbiota residente humana estén involucrada en procesos infecciosos, por lo general polimicrobianos. Entre los microorganismos anaerobios más comunes que afectan tejidos blandos y piel se encuentran el *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Entre estas enfermedades se pueden mencionar las infecciones como impétigo y erisipela.

## **Manifestaciones de las infecciones cutáneas**

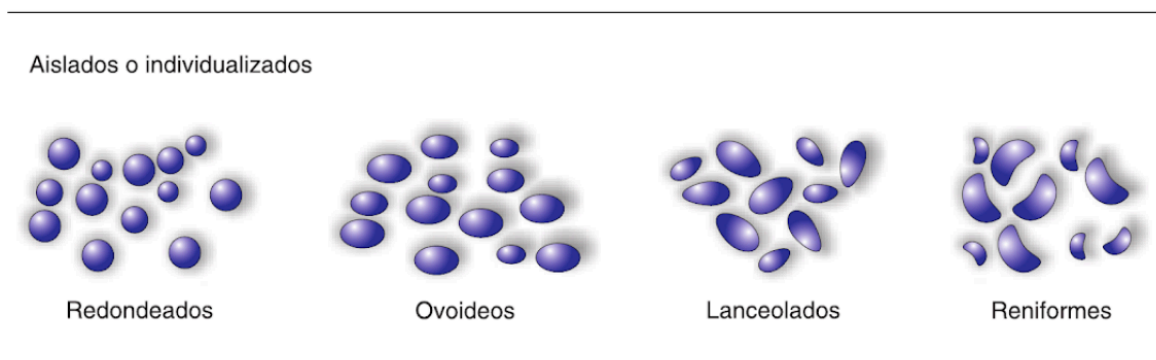
Hay diferentes formas en las que se puede expresar una infección en piel, entre ellas se comprenden las máculas, supurantes o no, o bien elementos filtrados de la sangre, puede haber cambios en la estructura regular de la piel, puede ser por infiltración de serosidad por formación de vesículas o pústulas (Pous, 2010, p.3).

## **Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares; de los cuales hay millones de tipos y además pueden vivir en diferentes medios, ya que tienen la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, según características particulares de cada una. Por lo tanto, se pueden encontrar tanto en el agua como en el suelo y tierra, en medios hostiles como desechos, incluso se ha demostrado que pueden resistir vivir en residuos radioactivos. Así mismo, pueden verse en la piel de animales o humanos y dentro del cuerpo de ambos, esto lo pueden hacer como saprófitas, sin afectar al hospedero como microbiota o de manera patógena. Estas se dividen en cocos, bacilos y helocoidales. Para efectos de este proyecto se estudiarán dos bacterias tipo Cocos, por tanto se hará énfasis en estos (Prats, 2007, p.17).

## **Cocos**

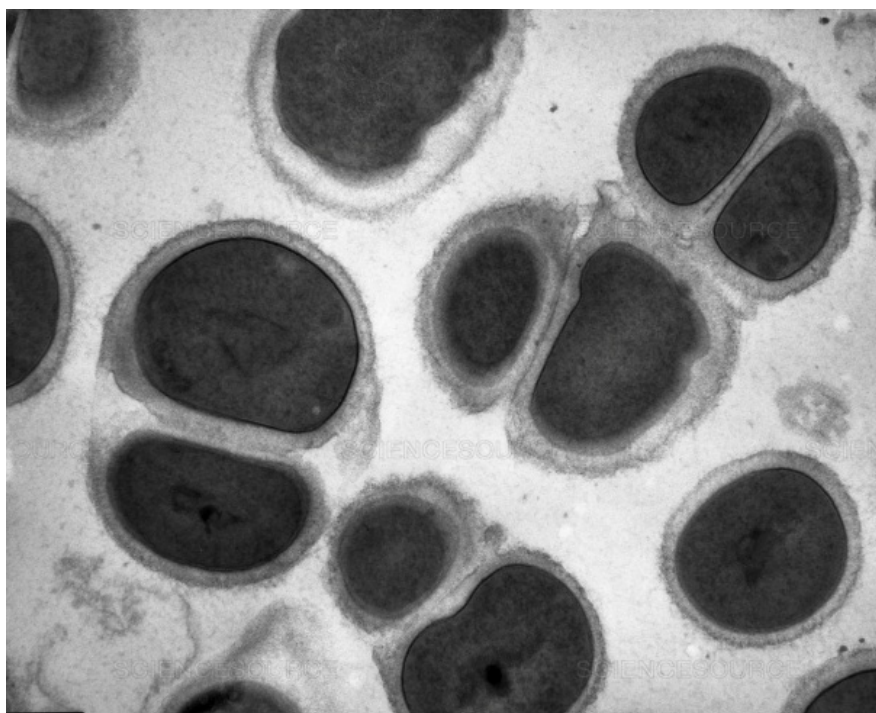
Según Montoya (2008) las bacterias se pueden identificar según las características de forma específicas. Se encuentran, los Cocos, que son bacterias esféricas u ovaladas, los Bacilos, que son células cilíndricas, rectas, alargadas, y las Espirales. Adicionalmente, la clasificación de las bacterias se da también según el ordenamiento que tomen.

**Figura 13. Cocos Dispuestos en forma Individual**

Nota: Montoya, 2018, p.28.

Según estos ordenamientos los Cocos en particular, que serán objeto de este estudio se clasifican de la siguiente manera:

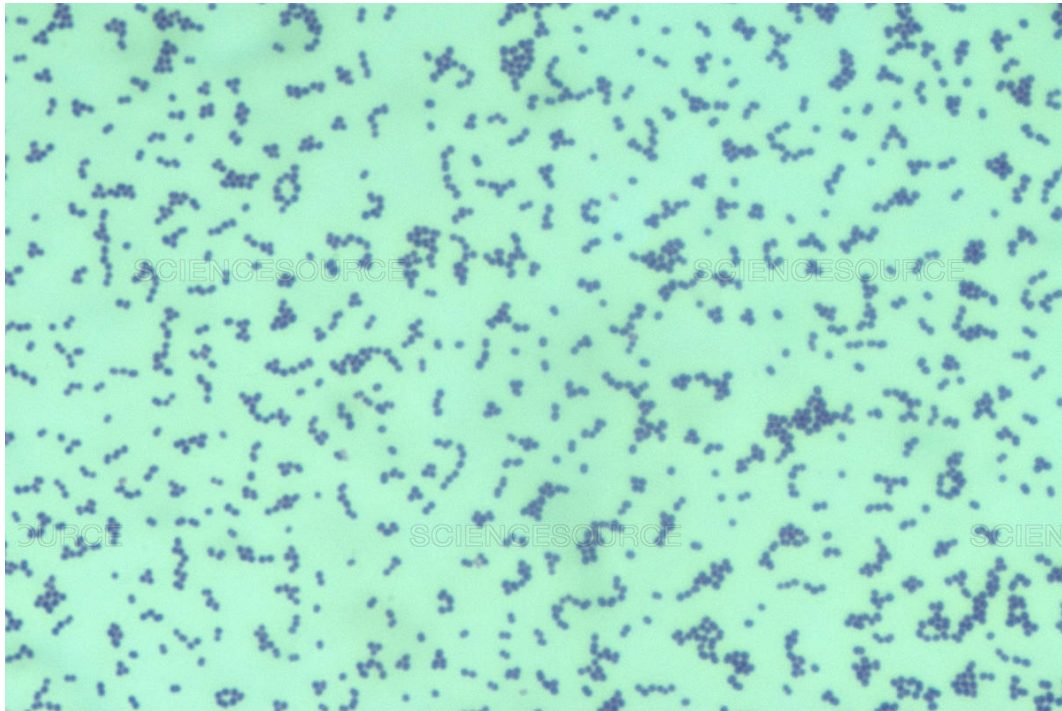
**Diplococos:** Cocos que aparecen en pares en un plano de división. Ejemplo: *Neisseria gonorrhoeae*,

**Figura 14. Diplococos de *Neisseria-Gonorrhoeae***

Nota: Phillips, (S.f.).

**Estreptococos:** Agrupación que al ser observada microscópicamente de forma en filas, una detrás de otra, y tienen un solo plano de división. Ejemplo: *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans*.

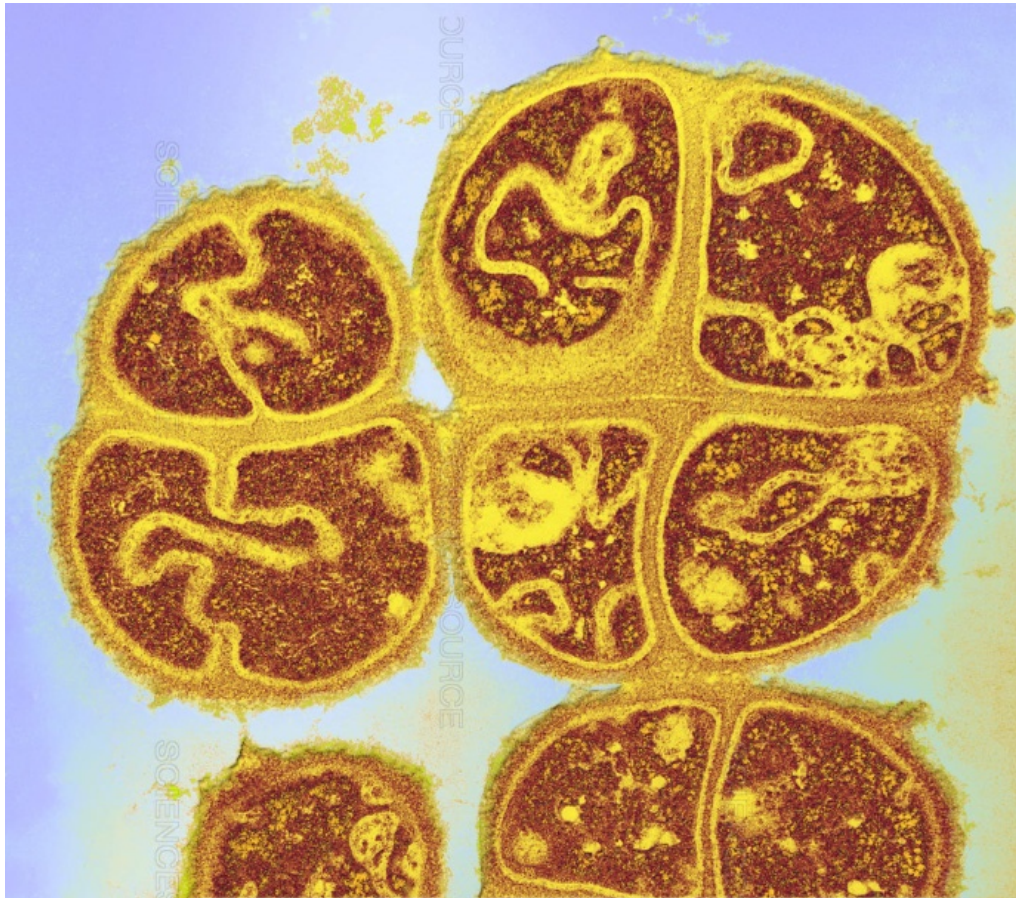
**Figura 15. Agrupaciones Microscópicas de *Streptococcus Pyogenes***



Nota: Mulvehill, (S.f).

**Tétradas:** Este se ordena por grupos, asociados en 4 unidades y presentan dos planos de división celular. Ejemplo: *Micrococcus tetrágenos*.

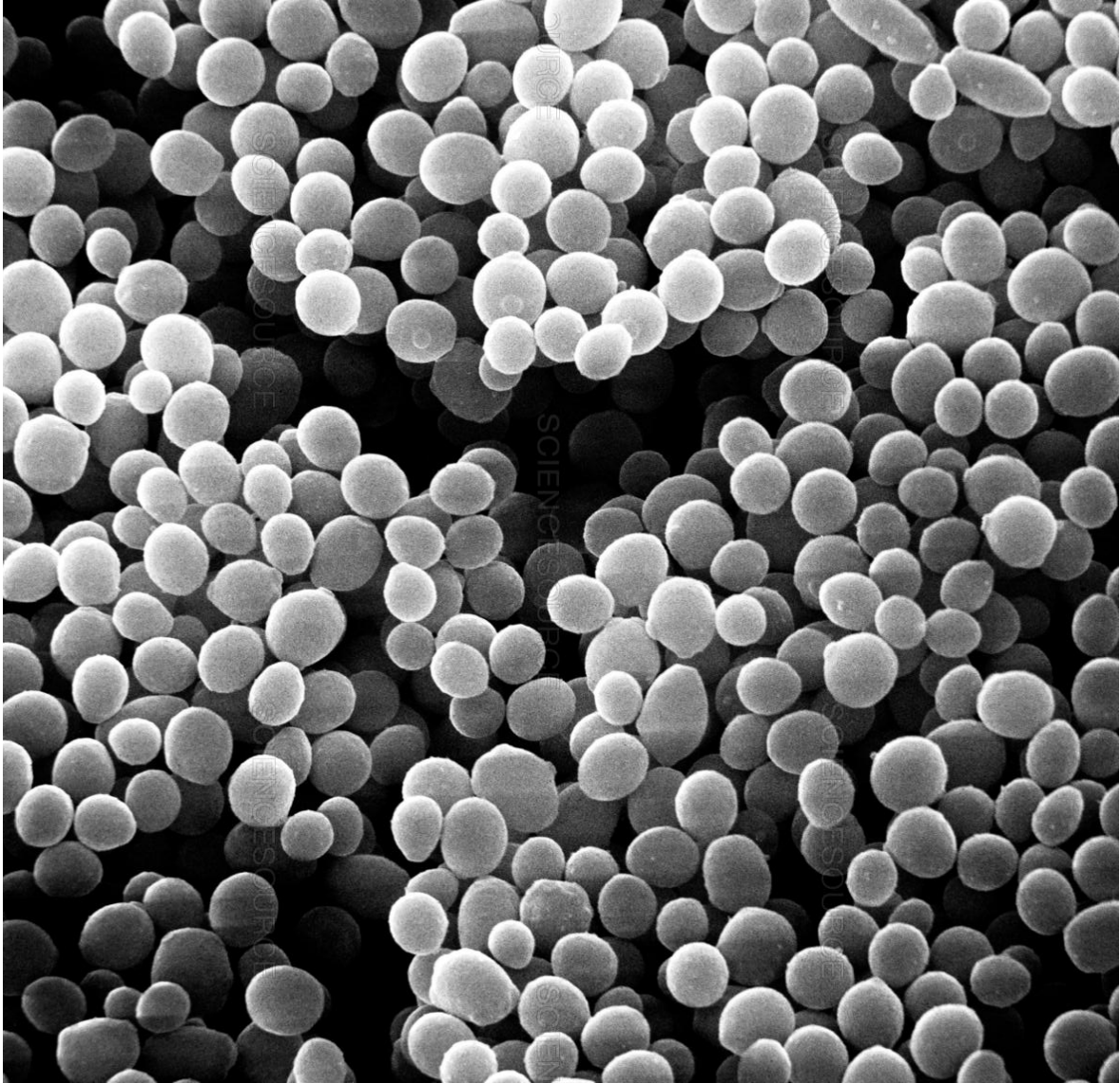
**Figura 16. Unidades Celulares Agrupadas en Cuartetos de *Micrococcus Tetragenus***



Nota: Kwangshin Kim (S.f.).

**Estafilococos:** Estas bacterias se presentan como racimos, en agrupamientos de masas irregulares, que se dividen en 3 planos. Ejemplo: *Staphylococcus aureus*.

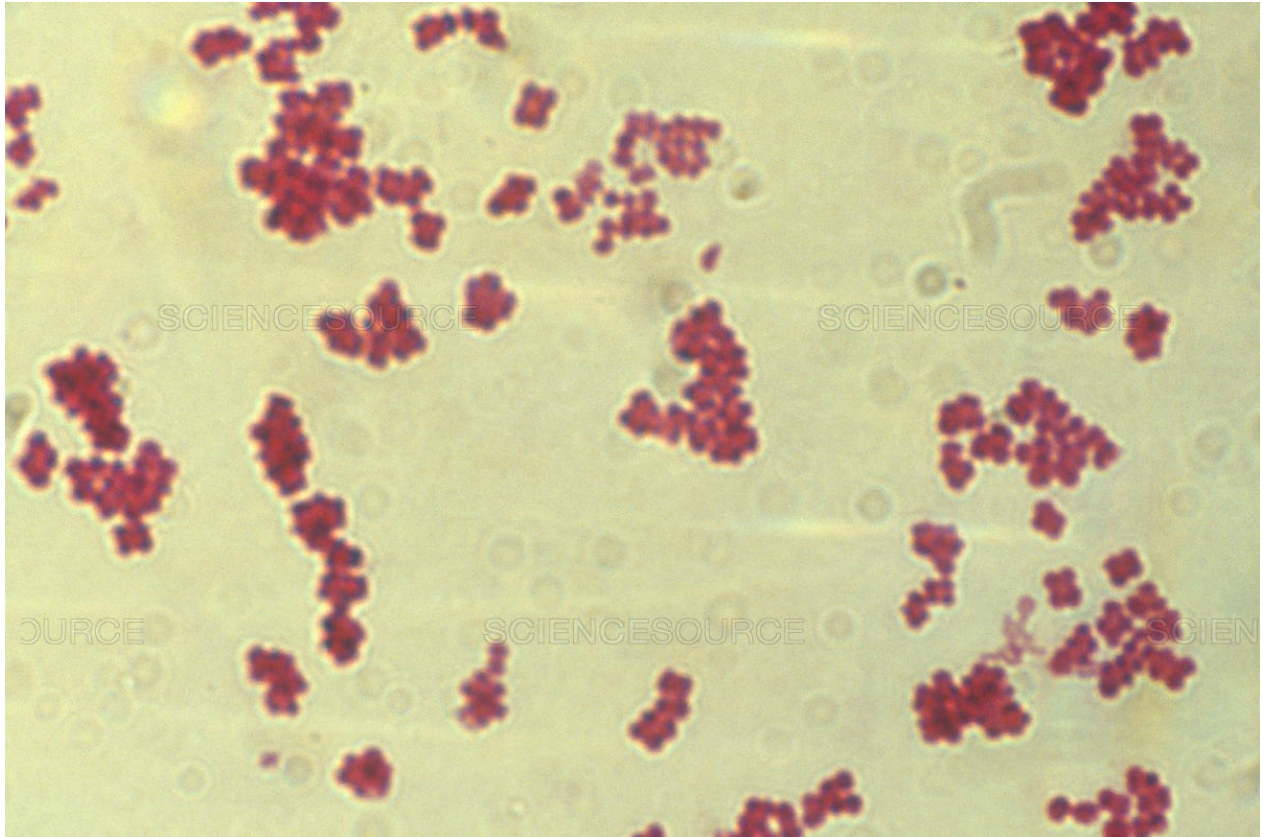
**Figura 17. Agrupación en Racimos de *Staphylococcus Aureus***



Nota: Phillips, D. (S.f.).

**Sarcinas:** Estas se ordenan en forma de cubos, por uniones de ocho o hasta más células. Su plano de división es en 3 planos. Ejemplo: *Sarcina ventriculi*.

**Figura 18. Ordenamiento en Cubos de *Sarcina Ventriculis***



Nota: Grave, E. (S.f.).

Pous (2010) explica que las infecciones especialmente en la piel se dan gracias a los gérmenes comunes cocos, entre ellos, se encuentran el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus pyogenes*, razón por la cuál estas bacterias son centro de estudio de esta investigación y se explican a continuación.

### **Staphylococcus**

De acuerdo a Ramos, (2012) estos son microorganismos responsables de gran cantidad de enfermedades que se identifican como Gram positivos, anaerobios facultativos que por lo general residen en la piel, glándulas cutáneas y mucosas.

### ***Staphylococcus aureus***

Esta especie de estafilococos ha sido reconocida por ser el patógeno de mayor relevancia en los seres humanos responsable de abscesos, infecciones en heridas, síndrome de shock tóxico, neumonía, intoxicaciones, entre otros. Este se caracteriza por ser una bacteria Gram-positiva que con forma de cocos que se dispone en grupos que se describen como "racimos" (Ramos, 2012).

### **Estreptococos**

“Los estreptococos son numerosos microorganismos, gram positivos, esféricos u ovals que crecen en cadenas mas o menos larga” (Pous, 2010, p.11). Estos grupos incluyen una o más especies. Las agrupaciones de estreptococos más importantes son A, B, y D (Smith y Babcock, 2010, p.23).

### ***Streptococcus pyogenes***

Infección con *Streptococcus pyogenes*, una bacteria beta-hemolítica que pertenece al serogrupo A de Lancefield, *S. pyogenes* (también conocido como GAS) es el agente causal en las infecciones estreptocócicas del Grupo A. Son parte de la flora normal de la piel y desde una infección leve y autolimitada de la garganta o la piel hasta infecciones letales sobre todo en tejidos blancos (Khan, 2017, párr. 1).

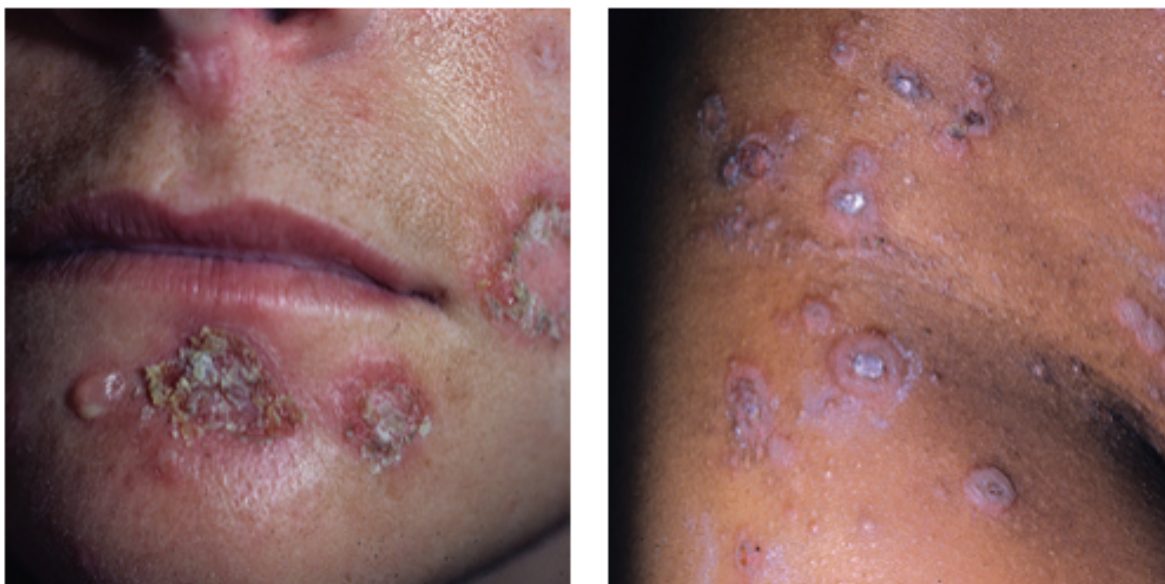
### **Infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes***

A continuación se menciona una lista de infecciones comunes producidas en piel por ambos microorganismos descrita por Ramos (2012):

- **Impétigo:** Enfermedad bacteriana contagiosa, lesiona las capas superficiales de la piel; predomina en niños menores de cinco años y se presenta de modo principal en la cara y los miembros superiores. Puede adoptar las formas seca y bullosa. El seco es la forma más frecuente, inicia con una mácula eritemato escamosa que se extiende con rapidez y puede

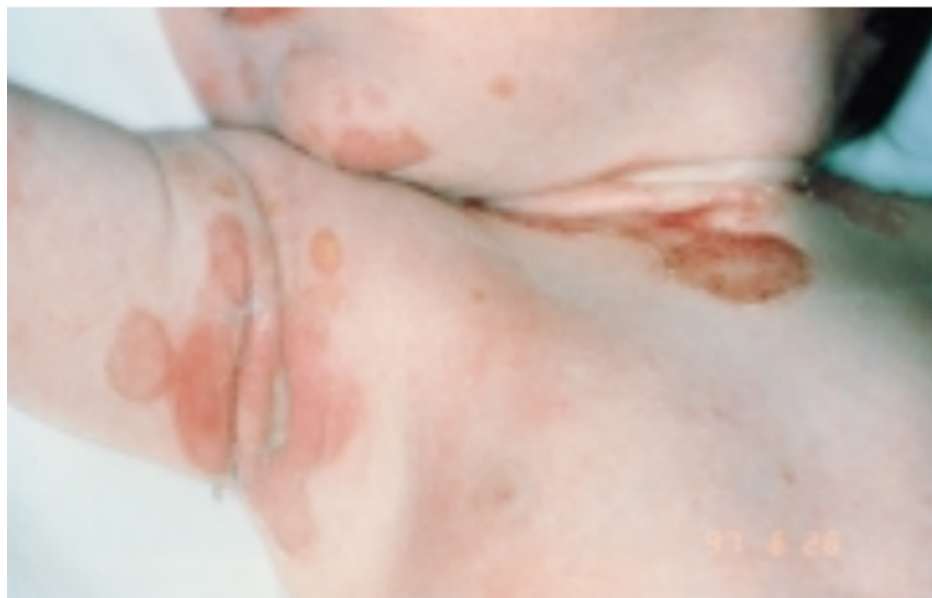
causar pústulas cubiertas de costras amarillentas. La forma bullosa casi siempre es efecto de *S. aureus*; la vesícula desaparece en poco tiempo y deja una superficie eritematosa.

**Figura 19. Lesiones Causadas por Impétigo**



Nota: Cole y Gazewood, (2007).

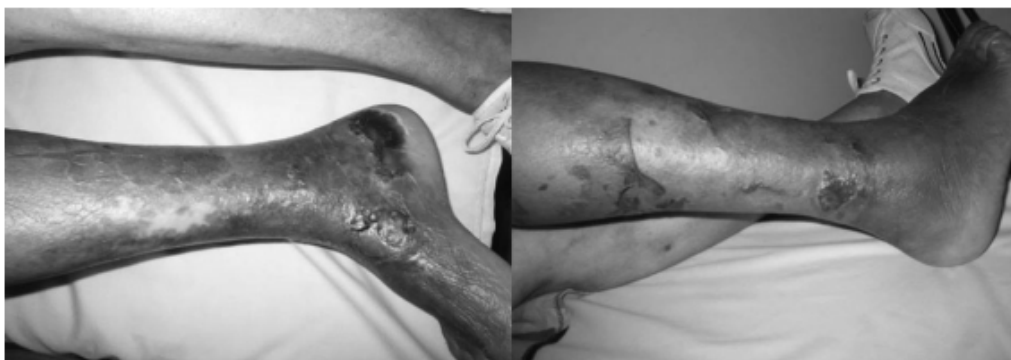
**Figura 20. Impétigo Estafilocócico: Forma de Piel Escaldada**



Nota: Sellares y Moraga, (S.f.).

- **Ectima:** infección bacteriana de la piel que se extiende a la dermis y provoca una ulceración superficial del área afectada; frecuente en niños, sobre todo en extremidades, y en pacientes inmunosuprimidos, o con pobres hábitos higiénicos.. Inicia como una pápula, vesícula o pústula que se ulcera y se extiende hasta alcanzar 1 a 3 cm de diámetro; en su superficie se observan costras hematomelicéricas que al removerlas revelan una base necrótica y purulenta.
- **Erisipela:** infección que afecta a la dermis, usualmente consecutiva a *Streptococcus pyogenes*. Lesiona con mayor frecuencia a personas inmunosuprimidas, ancianos, niños pequeños e individuos con úlceras crónicas y linfodema.

**Figura 21. Marcas y Heridas a Causa de Erisipela**



**ERISPELA AMPOLLAR CIRCUNFERENCIAL**



**ERISPELA AMPOLLAR**



**ERISPELA BILATERAL SIMULTÁNEA**

Nota: Nitto, Idiazabal, Rodriguez y Rossi, (2007).

- **Celulitis:** infección de la dermis profunda y el tejido celular subcutáneo originada en especial por *S. aureus* y *S. pyogenes* y, con menor frecuencia, *H. influenzae*. La enfermedad puede vincularse con otros padecimientos, entre ellos úlceras crónicas, úlceras por insuficiencia venosa, desnutrición y alcoholismo.

**Figura 22. Celulitis, Infección Bacteriana Común.**



Nota: Clinical Photography, Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust, (S.f).

Estas y otras infecciones bacterianas se distribuyen rápidamente dentro del cuerpo y pueden provocar enfermedades. Muchas bacterias liberan sustancias químicas llamadas toxinas, que pueden dañar los tejidos y así causan enfermedades. Entre ellas están el estreptococo, el estafilococo. El tratamiento habitual es con antibióticos, de los cuales se hablará a continuación (Medline Plus, 2018).

## **Antibióticos**

A los compuestos químicos que son utilizados para eliminar o inhibir el crecimiento antimicrobiano ya sea en animales o en humanos se les denomina antibióticos, palabra que proviene del griego (anti: "contra", bios; "vida"). Estos pueden ser sustancias derivadas de otros organismos vivos, generalmente microorganismos, modificaciones químicas de estos, o también sintéticos o semisintéticos. Causando inhibición de la reproducción del microorganismo, o su crecimiento o destrucción de microorganismos o células anormales (Cruz, 2001, p.15).

## **Resistencia Bacteriana a los antibióticos**

Esta resistencia es casi inevitable y predecible al usar antimicrobianos, al existir un uso adecuado de los antibióticos sin abusar de ellos indiscriminadamente se puede retrasar su aparición y extensión. Sin embargo son varias las causas que la provocan. Cuando los patógenos son resistentes tienen una tasa mayor de morbilidad y mortalidad, por tanto se recurre a antibióticos más tóxicos, y hasta más costosos, donde adicionalmente las cepas resistentes lo son a más de un antibiótico, y esto se conoce como multirresistencia (Velásquez et al., 2008, p. 792).

## **Mecanismos de resistencia antimicrobiana**

Existen dos tipos de resistencia antibiótica: natural o adquirida. La resistencia natural es propia de cada familia grupo bacteriano mientras que la resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana. La mutación o transferencia de material genético puede ser responsable de la resistencia antimicrobiana (Vignoli, R; Seija, V. s.f). Los mecanismos de resistencia están clasificados en tres:

- 1. Inactivación enzimática:** por ejemplo la hidrólisis como el principal mecanismo de inactivación de las betalactamasas.

2. **Modificación en el sitio blanco:** en este mecanismo se realizan modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico como “por ejemplo las alteraciones en las PBP de *Streptococcus pneumoniae* que confiere resistencia a penicilina”. Suele ocurrir modificación en el ribosoma.
3. **Alteración de la permeabilidad:** a su vez se divide en tres tipos:
  - Alteraciones de las membranas bacterianas: se observa en gramnegativos. La envoltura lipídica de la membrana externa es impermeable a sustancias polares por tanto las sustancias podrán atravesarla únicamente a través de proteínas transmembrana. Existen algunas moléculas como penicilina que por su tamaño son incapaces de pasar a través de proteínas transmembrana por tanto puede disminuir el flujo de llegada del antibiótico al espacio periplásmico.
  - Alteraciones en la entrada de antibióticos dependiente de energía
  - Aumento de la salida de antibióticos: dicha resistencia afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol.

### **Resistencia de *Staphylococcus aureus***

Más del 90% de las cepas producen una bectalactamasa que inactiva penicilina, ampicilina y amoxicilina. Y esta bectalactamasa no es activa frente a meticilina y a cloxacilina. Las cepas sencibles a meticilina también suelen serlo a macrólidos, clindamicina, y aminoglucósidos (menor o igual a 15% de resistencias) a cotrimazol (5% aproximadamente de resistencia) y sensibilidad uniforme a vancomicina.

La resistencia a meticilina, se ha dado por ejemplo en brotes de hospitales, sin embargo en estos casos las cepas tienden a ser resistentes a todos los betalactámicos, así mismo a macrólidos y aminoglucósidos, y en un futuro también a fluorquinolonas (Medina, 2000, pp. 61-62).

## **Pruebas de sensibilidad a antibióticos**

Existen métodos cuantitativos y cualitativos. Los métodos cuantitativos son aquellos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Taroco, Seija y Vignoli (s.f) mencionan:

*“Se define CIM como la mínima concentración de 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). Se define como CBM la mínima concentración 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”.*

Como métodos cualitativos se encuentran aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como resistente.

### CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el presente apartado se presenta la metodología realizada para la elaboración de esta investigación, así como los instrumentos y técnicas detalladas para la obtención de los extractos propuestos, las fuentes de información utilizadas, y el proceso de recolección de datos.

#### **Enfoque**

Esta investigación tiene un enfoque de tipo cuantitativo que Hernández, Fernández y Baptista, (2003) denotan como: "la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías" (p. 96).

Se clasifica de esta manera debido a que se pretende demostrar la hipótesis planteada por medio de la evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto metanólico y acuoso de la *Bixa orellana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

#### **Método**

Para el desarrollo de este proyecto se realizaron experimentos de laboratorio para obtener dos extracciones, una metanólica y otra acuosa de las hojas de *Bixa orellana* (achiote) y evaluar así su efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

Por lo tanto se identifica el método utilizado como experimental siendo éste "el estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador" (Hernández, et al, 2014, p. 130).

Esta investigación se llevó a cabo en los laboratorios de química de la Universidad Internacional de las Américas, de la Facultad de Farmacia, en el III cuatrimestre del año 2018.

### **Recolección de la Muestra de *Bixa orellana***

El material vegetal utilizado fue recolectado de manera manual de los árboles de *Bixa orellana*, plantados en el Parque Metropolitano La Sabana ubicado en el distrito de Mata Redonda, en el cantón central de San José, Costa Rica, durante el mes de setiembre del año 2018. Este proceso se realizó bajo el acompañamiento del Ingeniero Forestal Oscar Benavides Mora.

Por recomendación del Ingeniero, las hojas se tomaron en horas de la mañana, aproximadamente a las 9:00 am antes de la hora de mayor temperatura e intensidad lumínica (entre 11:00 am y 2:00 pm), ya que a mayor cantidad de luz y calor, aumenta el dinamismo fotosintético, donde hay mayor transpiración de las hojas, estas se deshidratan, y durante esos períodos utilizan más los nutrientes generados. Durante la noche tampoco es conveniente ya que hay menor cantidad de nutrientes en las hojas, por lo que los componentes de interés se pueden encontrar en menor concentración. Se sugiere también hacerlo en condiciones cálidas, evitando las condiciones de lluvia, exceso de humedad o sequedad.

La muestra consistió en material fresco, hojas jóvenes y desarrolladas, por lo que se separaron y desecharon las hojas secas, dañadas, con moho y decoloradas. Se seleccionaron entonces, las mejores hojas verdes, se empacaron y se trasladaron cubiertas en bolsas plásticas color negro y así protegerlas del sol, para su empleo posterior en el laboratorio.

El material se mantuvo en almacenamiento, en un ambiente fresco fuera del alcance de la luz y la humedad por 3 días hasta su utilización. Se llegaron a recolectar 500 gramos de hojas.

**Figura 23. Árbol de *Bixa orellana* Utilizado para la Recolección de Hojas para la Extracción de Componentes**



Nota: Elaboración Propia

### **Extracciones de las hojas de *Bixa orellana***

Se tomaron las hojas verdes y frescas de *Bixa orellana*, se limpiaron con un paño húmedo con agua, y se dejaron secar en una habitación a temperatura ambiente fuera del alcance del sol por 8 horas. Una vez secas, se empacaron nuevamente en una bolsa negra limpia, y se trasladaron a los laboratorios de Química de la Universidad Internacional de la Américas.

Posteriormente, se pesaron en dos beakers de 1000 mL limpios y secos, 100 gramos de hojas preseleccionadas, en una balanza granataria marca Ballar (+/- 0.1g) de 2000g de capacidad de pesado.

El primer beaker se utilizó para realizar el extracto en metanol, mientras que el segundo beaker fue el empleado para el extracto en agua.

**Figura 24. Material fresco de hojas de *Bixa orellana* para la Extracción con Metanol**



Nota: Elaboración Propia

**Figura 25. Material Fresco de hojas de *Bixa orellana* para la Extracción con Agua**



Nota: Elaboración propia.

### **Extracción metanólica por maceración de las hojas de *Bixa orellana***

En el beaker de vidrio de 1000 mL, se colocó 100 gramos de hojas trituradas de *Bixa orellana* y se le adicionó metanol, en una relación de 1: 2 p/v para el extracto de hojas - metanol. Utilizando la densidad del metanol (0,7918 g/mL), se calculó la cantidad de disolvente necesario para la extracción, siendo este 253 mL. La muestra vegetal se mezcló con metanol al 99% (marca J.T Baker).

La boca del beaker se tapó con papel de parafina, se cubrió por completo con papel aluminio, y se dejó macerar en un lugar oscuro, seco, a temperatura ambiente por 7 días. Una vez finalizado el proceso de maceración, se procedió a colar, con un colador las hojas y separarlas del extracto. Las hojas desechadas, mostraban un aspecto amarillento Posteriormente se filtró por medio de un sistema de filtración con bomba de vacío.

**Figura 26. Filtración al Vacío de Extracto Metanólico de *Bixa orellana***



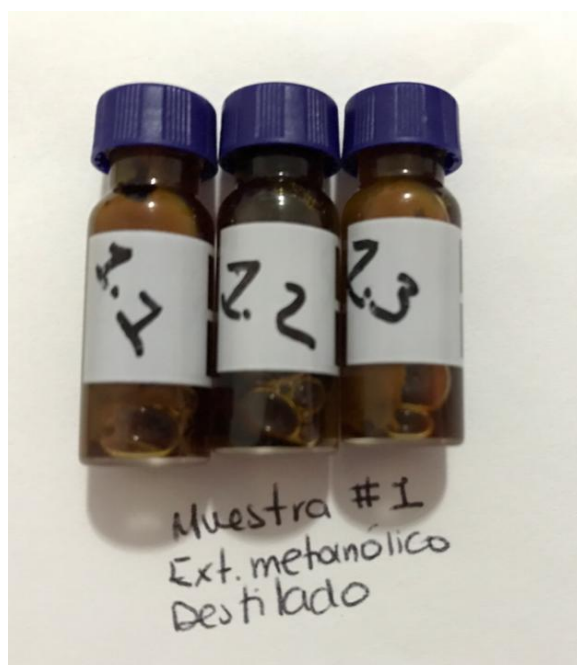
Nota: Elaboración propia.

El filtrado se recogió (aproximadamente 250 mL) y se separó en dos earlenmeyers de 250 mL, donde se vertieron aproximadamente 120 mL en cada uno estos, para tener en caso de eventualidades. Se rotularon los recipientes, uno como "Extracto metanólico A" y el otro como "Extracto metanólico B", de estos, solamente al Extracto metanólico A se le realizó destilación por rotavapor, el otro extracto se guardó y se utilizó después.

### Destilación del extracto metanólico de *Bixa orellana*

El extracto metanólico A, se adaptó a un sistema de destilación por rotavapor, con el fin de eliminar el metanol, este se mantuvo a 55°C durante 2 horas y luego se aumentó a 63 °C durante 3 horas. Al cabo de este período, al observar que del condensador ya no se destilaba más metanol de la muestra, se recogió el residuo del balón con un volumen aproximado de 30 mL. De este se tomaron 6 mL y se repartieron en 3 viales de 2mL cada uno y se utilizaron para realizarles pruebas microbiológicas.

**Figura 27. Viales con Extracto Metanólico A - Destilado**



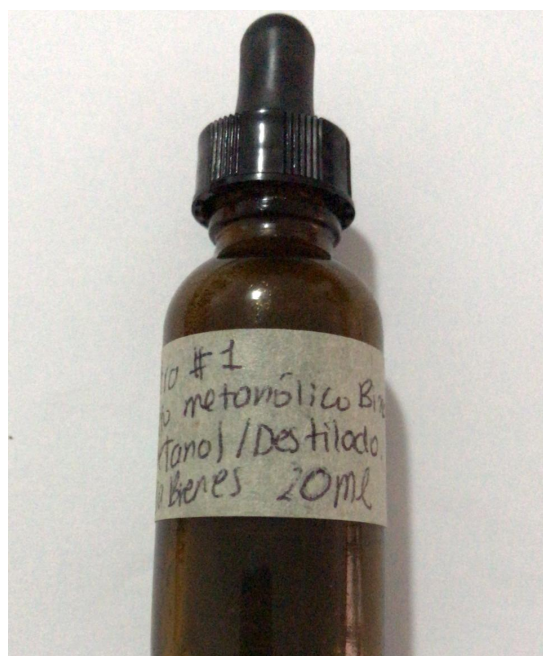
Nota: Elaboración propia.

El restante que sobró se trasvasó a un frasco color ámbar. Posteriormente el envase se cubrió con papel aluminio, en refrigeración, hasta el momento de su utilización. Este residuo se mostró como una mezcla heterogénea, de color café oscuro.

Del extracto metanólica B que no fue sometido a destilación, se tomaron también 6 mL de la extracto metanólico B y se repartieron en viales de 2mL cada uno para las pruebas microbiológicas.

Los extractos metanólicos A y B envasados en frascos, se pasaron por otro rotavapor de con mayor capacidad de vacío (Rotavapor Vacum Controller V-850) para poder garantizar la eliminación completa del disolvente. A estas muestras se les probó su acción antimicrobiana y se compararon con respecto a las que solo se pasaron por un rotavapor o la porción que contenía todo el disolvente.

**Figura 28. Extracto Metanólico A - Destilado**



Nota: Elaboración propia

### **Extracción acuosa por maceración de las hojas de *Bixa orellana***

Se colocó en un beaker de vidrio de 1000 mL, 100 gramos de hojas de *Bixa orellana* y se le adicionó agua destilada, en una relación 1:2 m/v hojas - agua. Se tomó como referencia la densidad del agua, 1g/mL, por lo que se usaron 200 mL de agua. Se dejaron reposar las hojas en el recipiente, se tapó con papel de parafina y quedó cubierto por papel aluminio, se guardó en un lugar oscuro, libre de humedad a temperatura ambiente por 96 horas.

**Figura 29. Proceso de Maceración, del Extracto Acuoso de las Hojas de *Bixa Orellana***



Nota: Elaboración propia.

Posterior al período de reposo se procedió a colar el líquido en un colador, para separar las hojas del extracto. Una vez obtenido el líquido, este se filtró al vacío con una bomba, para retirar los residuos finos de material vegetal del extracto.

El extracto obtenido se separó en dos erlenmeyer limpios y secos de 250 mL cada uno.

Uno de estos fue rotulado como Extracto acuoso A, el cuál se sometió a tratamientos de extracción de agua para eliminar el exceso de esta. Mientras que el otro se guardó en refrigeración a 4 grados centígrados aproximadamente, hasta el momento de su utilización, y sé rotuló como extracto acuoso B.

### **Destilación del extracto acuoso de *Bixa orellana***

Se tomó extracto acuoso A, y se adicionó a un balón de 500 mL . Se preparó y se encendió el rotavapor, con bomba de vacío, y el balón para eliminar el exceso de solvente. El extracto permaneció en el rotavapor durante 3 horas, a 100 grados centígrados. (No se reporta presión, ya que el varómetro del rotavapor no la estaba midiendo).

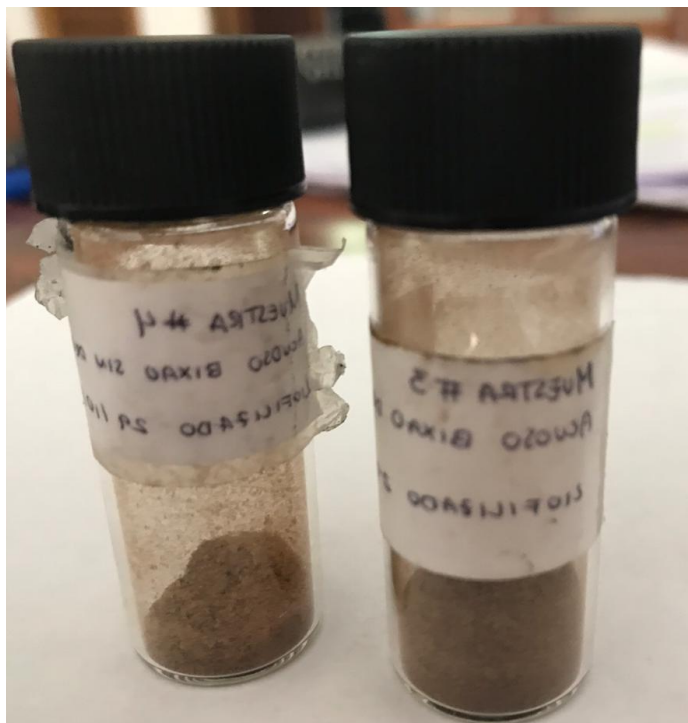
Se detuvo el equipo cuando no se destilaba más solvente por el condensador del rotavapor, ni caía más líquido en el balón recolector. Por la dificultad para extraer el disolvente del residuo del extracto acuoso A, se tomaron aproximadamente 30 mL de este, y se adicionaron en un balón, el cuál se adaptó a un sistema de destilación simple para extraer el agua restante. El balón se cubrió con papel aluminio para mantener el calor del sistema, sin permitir que la temperatura subiera por encima de los 100 grados centígrados. A las dos horas de destilación, se secó casi por completo el extracto, quedando depositado y esparcido en las paredes del balón como una resina, con color café y olor a caramelo que al enfriarse se endureció y no se pudo recuperar, por lo que se desechó.

Se tomó el restante del extracto, que no se había sometido a destilación simple y se trasvasó a un balón de vidrio. Se utilizó nuevamente el equipo de destilación simple, con el nuevo balón por una hora y treinta minutos, esta vez con el fondo del balón holgadamente cubierto con papel aluminio a una temperatura mantenida a 90 grados Celsius, evitando que el extracto llegara a sequedad. Finalmente, se recogió el extracto acuoso destilado, aún líquido, y se empacó en un recipiente ámbar limpio y seco, este se rotuló nuevamente como: Extracto Acuoso A. De este se tomaron 3 mL y se guardaron en 3 viales con 1 mL cada uno, rotulados como Extracto Acuoso A, para pruebas microbiológicas. El resto se mantuvo en el frasco y se envió a un laboratorio para ser liofilizado, ya que por el alto punto de ebullición del agua no se pudo secar por los métodos disponibles en los laboratorios de la Universidad.

De la extracto acuoso B, se extrajeron 3 mL y se depositaron en 3 viales con 1 mL cada uno. El residuo se traspasó a un frasco color ámbar y también se envió al laboratorio para ser liofilizado.

Los extractos acuosos A y B se sometieron a un proceso de liofilizado, que se realizó por 4 días, sublimando el agua congelada, obteniendo así dos muestras sólidas.

**Figura 30. Muestras Sólidas del Extracto Acuoso Liofilizado de las Hojas de *Bixa orellana***



Nota: Elaboración Propia

### **Pruebas de Caracterización Fitoquímicas**

Para la determinación de algunos de los componentes fitoquímicos relevantes reportados del extracto de *Bixa orellana*, se llevaron a cabo pruebas de identificación para enlaces dobles como alquenos o terpenos, flavonoides, y alcaloides.

Las pruebas de identificación que requerían la utilización de reactivos de alta toxicidad fueron manipulados dentro de la cámara de gases del laboratorio de química de la Universidad Internacional de las Américas.

Cabe aclarar que las muestras que se utilizaron para la pruebas de identificación fueron las tratadas de manera especial para la extracción completa de sus solventes. Importante notar que después de los procesos a los que se sometieron las muestras, algunas cambiaron de aspecto, el extracto metanólico A se mantuvo como un líquido viscoso, el extracto metanólico B, presentó una textura tipo emulsión, mientras que los extractos acuosos A y B por ser liofilizadas se tornaron sólidas.

### **Prueba de Insaturaciones (Dobles o triples enlaces de Carbono) con reactivo de Baeyer (KMnO<sub>4</sub>)**

Se tomaron 4 tubos de ensayo, donde a cada uno de estos se le adicionó 3mL de agua destilada, después se le agregaron 2 gotas de cada extracto (todos) a cada uno de los tubos, 2 gotas de permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) y se agitaron suavemente. Posteriormente se creó un blanco, realizando el mismo proceso en un nuevo tubo de ensayo sin adicionarle extracto, y se agitó suavemente. Se observó y se comparó si hubo cambios de coloración en los tubos. Todos los tubos de ensayo cambiaron de color, manifestando resultados positivos. Mientras el blanco permaneció púrpura, característico del permanganato de potasio.

### **Identificación de Flavonoides con reactivo de Shinoda**

Se utilizaron 4 tubos de ensayo, donde a cada uno de estos se le adicionó una pequeña cantidad de todos los extractos (uno por tubo), posteriormente a cada tubo se le agregó un trocito de viruta de magnesio amalgamado y cinco gotas de ácido clorhídrico concentrado. Esperando la aparición de colores que van del rojo a magenta. Adicionalmente se creó un blanco bajo las mismas condiciones de los otros tubos, pero sin extracto, y se agitó suavemente. Se observaron los tubos y sus cambios de coloración. De estos la extracción metanólica A y las extracciones acuosas A y B se tornaron color rojizo oscuro, positiva mientras que la extracción metanólica B cambió a un verde muy oscuro, el cuál no coincide con la prueba.

### **Identificación de Alcaloides con reactivo de Dragendorff**

Se realizó el proceso en cámara extractora de gases. Se agregó cada extracto en un tubo de ensayo diferente, y a cada uno de estos se le adicionó 1mL de HCl al 37% y dos gotas de reactivo de Dragendorff. Se le realizó la misma prueba a un blanco, sin extracto y se observó si ocurrían cambios en las muestras, de coloración, turbidez o precipitación. Los resultados de esta prueba no fueron concluyentes.

### **Identificación de Compuestos fenólicos por FeCl<sub>3</sub>**

En cada tubo de ensayo se agregó un extracto diferente, se disolvieron en 1mL de agua cada una y se les agregó varias gotas de FeCl<sub>3</sub>. Se realiza el mismo procedimiento con un blanco. En este se observó un cambio a color verde musgo de todos los tubos excepto en el del blanco. Las muestras se tornaron verde musgo oscuro.

### **Identificación de Esteroides -triterpenos por Liberman-Buchnard**

En cada tubo de ensayo se agrega uno de los extractos, se disolvieron en 1mL de agua cada una y se les agregó reactivo de Liberman-Buchnard. Se realiza el mismo procedimiento con un blanco. En ninguno de los tubos hubo reacción, por lo tanto la prueba es negativa.

### **Análisis Instrumental de los Extractos de las Hojas de *Bixa orellana***

En esta etapa del proyecto se realizaron dos procesos de análisis instrumental, y para ello se utilizó el destilador por Rotavapor Vacum Controller V-850 y el Liofilizador-VirTis Freeze Drying SP Scientific. Las pruebas se realizaron en octubre del presente año.

### **Identificación de grupos funcionales por medio de espectroscopía infrarroja**

Para el análisis por espectroscopía de infrarrojo se empleó el espectrofotómetro de infrarrojo Infrared Spectroscopy (FT-IR), marca Perkins Elmer Spectrum BX FT-IR System, para obtención de los espectros de infrarrojo de los extractos concentrados que se realizaron a partir del metanol y el agua.

### **Identificación de por cromatografía de gases, acoplado a detector de masas (CG-MS)**

Se realizó el análisis para determinar las áreas relativas de las sustancias que componen el extracto de las hojas de *Bixa orellana* y el análisis correspondiente de barrido de los compuestos orgánicos. Para ellos se utilizó el aparato Agilent Technologies 6850 Network GC System.

## **Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos de las Hojas de *Bixa orellana* Frente al *Staphylococcus Aureus***

En esta fase se investigó la posibilidad de que los extractos realizados tanto en metanol como en agua de las hojas de *Bixa orellana* mostraran actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Dichas cepas fueron obtenidas en Laboratorios Prelab, ubicados en Llorente de Tibás, y fueron brindadas por el Dr. Edgar Salgado. Los análisis microbiológicos se efectuaron en el Laboratorio Análisis Microbiológico Microlabs, bajo la supervisión y guía del Dr. Roldán Ajun Chaverri (microbiólogo), quien estuvo presente durante todo el proceso. La aplicación se realizó sobre placas de Petri recién hechas con medio de cultivo fresco. Todos los insumos y equipos utilizados fueron suministrados por el laboratorio microbiológico. Es importante establecer que las pruebas se realizaron en dos etapas: Primero a los extractos envasados en viales con trazas de solvente; y segundo a los extractos tratados en el laboratorio privado y que se dejaron sin disolvente.

### **Materiales y equipos para el desarrollo del ensayo microbiológico**

- Micropipetas
- Puntas estériles de micropipetas
- Lámpara de alcohol para esterilización
- Torunda estéril
- Placas de Petri con agar estándar
- Portaobjetos
- Regla con escala métrica
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora

### **Reactivos y otros**

- Cepa fresca de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Caldo tioglicolato
- Prodesin SF: es una sustancia con acción microbicida frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*.
- Fucicort (20 mg de ácido fusídico/1mg de Betametasona): es un activo que ejerce acción antibacteriana mediante un proceso de inhibición de la síntesis proteica bacteriana contra un gran número de bacterias grampositivas incluyendo *Staphylococcus aureus* productor de penicilinasa y estreptococos. (Fucicort, S.f.)
- Alcohol al 90%
- Extractos metanólicos de *Bixa orellana*
- Extractos acuosos de *Bixa orellana*.
- 1 mL de Metanol (tomado del laboratorio de Universidad Internacional de las Américas)
- 1 mL de Agua destilada (tomado del laboratorio de Universidad Internacional de las Américas)

### **Ensayo microbiológico 1**

A continuación se detallan las soluciones (muestras de extractos líquidos) utilizadas durante el primer ensayo. Para estas se utilizaron los primeros extractos obtenidos en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, algunos de los cuales aún contenían solvente o trazas de estos.

**Tabla 2. Extracciones de *B. Orellana* con Solvente Empleadas para Evaluar la Actividad Antimicrobiana sobre una Cepa de *S. aureus***

<b>Número de muestra</b>	<b>Tipo de extracto/ Proceso</b>	<b>Cantidad μL</b>
Extracto Metanólico B	Extracto metanólico A- destilado	5
Extracto Acuoso A	Extracto metanólico B- sin destilar	5
Extracto Acuoso B	Extracto acuoso A- destilado	5
Extracto Metanólico B	Extracto acuoso A- sin destilar	5

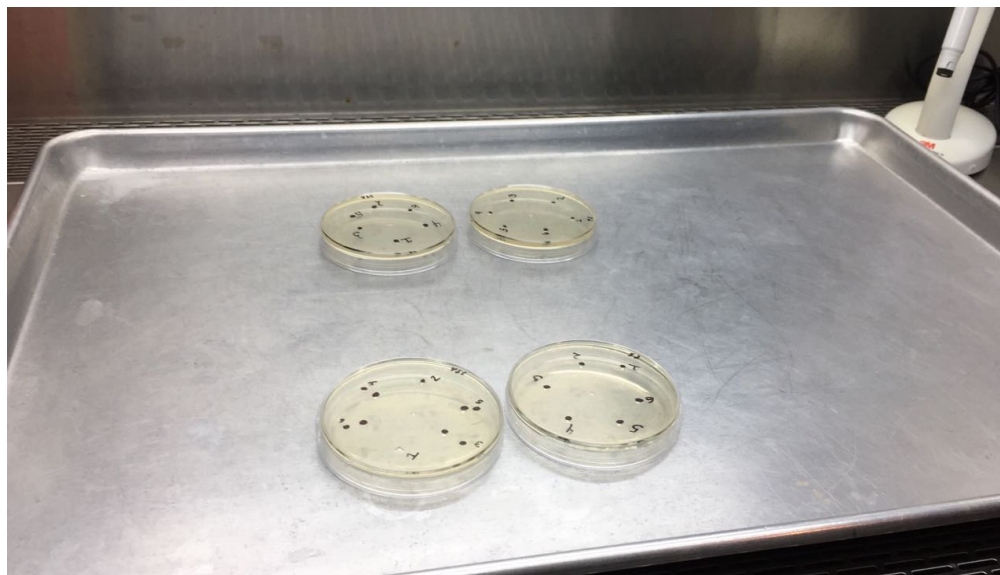
Nota: Elaboración Propia

Inicialmente, las cepas bacterianas, se cultivaron en un caldo de tioglicolato por 24 horas. Se elaboraron los medios de cultivos agar estándar en una cámara de flujo laminar, con la vitrina medio baja, y se dejaron solidificar durante 20 minutos. Después de transcurrido este tiempo, las placas de Petri se rotularon por fuera con un marcador negro, para saber dónde inocular los extractos en el agar por dentro.

Se procedió a realizar 4 rayados de una cepa de *S. aureus* con torundas estériles en 4 placas de Petri con agar estándar, tomando el caldo preparado del tubo de ensayo con la punta de la torunda. Con un movimiento en zigzag se hicieron estrías al agar de lado a lado, 4 veces, iniciando en bordes diferentes, logrando así cubrir toda la placa con el cultivo.

A cada una de las placas se les hicieron seis agujeros con puntas estériles de micropipetas, sobre las marcas en negro distribuidas alrededor del agar y con un espacio aproximado de un centímetro entre cada uno. La profundidad de los hoyos se hizo del grosor del agar. Se perforó por último el centro de la placa, el cual se llenó con 5 μL de control positivo de Prodesin SF.

**Figura 31. Placas de Petri con Cepas de *Staphylococcus Aureus*, Identificadas con Marcador y Volteadas sobre Bandeja en Cámara De Flujo Laminar**



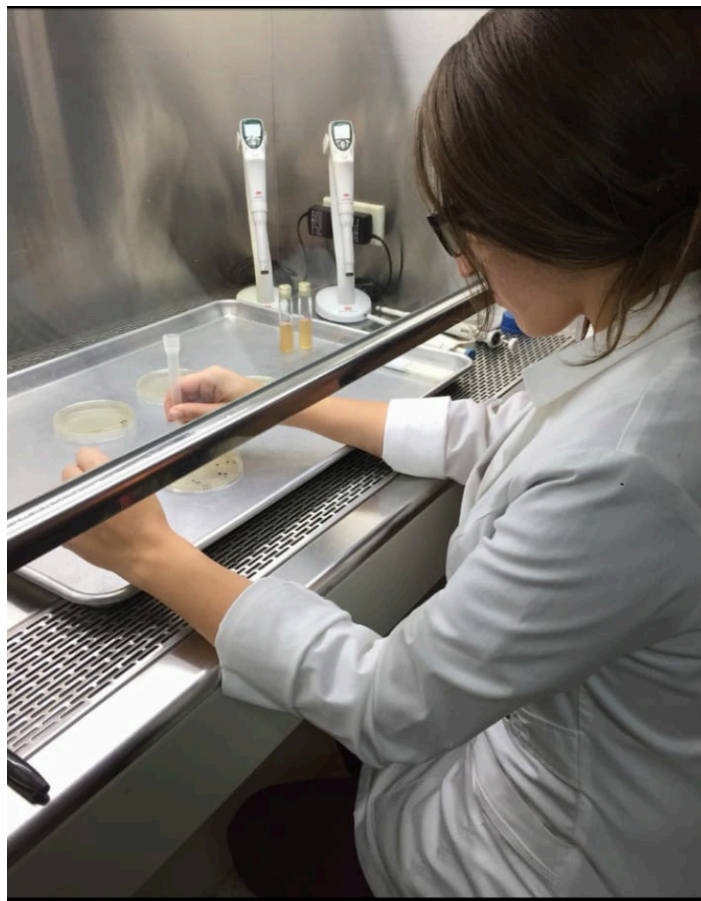
Nota: Elaboración Propia

Una vez que se tuvo las placas marcadas con sus respectivos agujeros, se procedió a llenar cada uno de estos con 5 microlitros ( $5\mu\text{L}$ ) de los extractos.

En esta primera etapa, se probaron los 4 extractos con trazas de solvente sobre las cepas, el primero con el extracto metanólico que pasó por el proceso de destilación (extracto metanólico A), el segundo con el extracto metanólico con metanol sin destilar (extracto metanólico B), el tercero un extracto acuoso destilado sin exceso de agua (muestra 2, fracción C), y el cuarto un extracto acuoso con el exceso de agua (extracto acuoso B).

A la primera placa con *Staphylococcus aureus*, con la micropipeta en los agujeros 2, 3 y 4, se le adicionó a cada uno  $5\mu\text{L}$  de la Extracto metanólico A, mientras que al 1, 5 y 6 se les agregó la muestra 1B.

**Figura 32. Inyección de Extractos en Placas con Cepas de *Staphylococcus aureus***



Nota: Ajún, R (2018).

A cada uno de los hoyos de la segunda placa con *Staphylococcus aureus*, se les adicionó la misma cantidad de volumen que a la placa anterior. Sin embargo en este caso a los huecos numerados 1, 2 y 3 se les agregaron los extractos acuosos de la muestra 2 fracción C , mientras que a los restantes (4, 5 y 6) la muestra 2 fracción D.

A las dos placas restantes se les agregaron solo los disolventes utilizados como blanco. Una con 5 $\mu$ L de metanol en cada agujero, excepto en el centro que se agregó Prodesin SF, y la otra con agua destilada, en el centro también con Prodesin SF.

Una vez realizado este proceso se taparon las cepas, se voltearon y se guardaron en una incubadora a 33 grados centígrados, para su evaluación 24 horas después. Al cabo del tiempo de

incubación se observó el crecimiento de las bacterias en las placas y se evaluó si los extractos tuvieron o no efecto antimicrobiano.

### Ensayo microbiológico 2

Una vez que se obtuvieron del laboratorio las muestras tratadas para eliminar por completo los solventes, se procedió a realizar nuevamente las pruebas microbiológicas con estas y así estudiar la acción microbiológica de los extractos concentrados. A continuación se detallan las extracciones utilizadas durante el segundo ensayo, y su distribución en las placas. Una de las placas se utilizó sólo para probar los extractos metanólicos (Placa 1) mientras que en la otra placa se evaluaron los realizados con agua (Placa 2).

**Tabla 3. Extractos de *Bixa orellana* Provenientes del Medio Metanólico Utilizados para el Análisis Microbiológico Frente a Cepas de *Staphylococcus aureus* en placa 1, Después del Proceso de Eliminación del Solvente**

Número de muestra	Número de marca en placa	Tipo de extracto/ Proceso	Cantidad (µL)
Extracción metanólica A	1	Extracto en medio metanólico, destilado a presión, por destilación simple y por rotavapor de alta presión	5
Extracción metanólica A	2	Extracto en medio metanólico destilado por rotavapor de alta presión	10
Extracción metanólica B	3	Extracto metanólico destilado por rotavapor	5
Extracción metanólica B	4	Extracto metanólico destilado por un medio	10

Nota: Elaboración propia

**Tabla 4. Extractos de *Bixa orellana* Provenientes del Medio Acuoso Utilizados para el Análisis microbiológico Frente a Cepas de *Staphylococcus aureus* en Placa 2**

<b>Extracción</b>	<b>Número de marca en placa</b>	<b>Tipo de extracto/ Proceso</b>	<b>Cantidad</b>
Extracción Acuosa A	1	Extracto acuoso destilado y liofilizado	0.05 mg
Extracción Acuosa A	2	Extracto acuoso destilado y liofilizado	0.1 mg
Extracción Acuosa A	3	Extracto acuoso liofilizado	0.05 mg
Extracción Acuosa A	4	Extracto acuoso liofilizado	0.1 mg

Nota: Elaboración propia

Inicialmente, las cepas bacterianas se cultivaron en un caldo de tioglicolato por 24 horas previas al ensayo. Luego se elaboraron 2 medios de cultivos agar estándar en una cámara de flujo laminar, con la vitrina medio baja, y se dejaron solidificar durante 20 minutos. Se rotularon las placas de Petri por fuera y en la parte de abajo con un marcador negro, como guía para realizar los agujeros para introducir los extractos. Se realizaron nuevamente 6 huecos alrededor de las placas y una en el centro y se procedió a realizar 4 rayados de una cepa de *S. aureus* con torundas estériles en las 2 placas de Petri con agar estándar. Tomando caldo preparado del tubo de ensayo con la punta de la torunda, y con un movimiento en zigzag se hicieron estrías al agar de lado a lado, 4 veces, iniciando en bordes diferentes, logrando así cubrir toda la placa con el cultivo.

En la placa 1 se agregaron las muestras provenientes de la maceración con metanol, en las marcas de la 1 a la 4, en la marca 5 se adicionó 5  $\mu$ L de metanol puro, mientras que en la marca 6 se adicionaron 10  $\mu$ L, ambos como blanco. En el centro se agregó un control positivo de Fusicort crema de 5  $\mu$ L. Por otro lado, en la placa 2 se agregaron los extractos derivados del medio acuoso

en las marcas de la 1 a la 4, en la marca 5 se adicionó 10  $\mu$ L de metanol y 10  $\mu$ L en la marca 6. En el centro, se adicionó una microespátula de Fusicort.

Al finalizar se taparon las cepas, se voltearon y se guardaron en una incubadora a 33 grados centígrados, para su evaluación 24 horas después. Transcurrido este período se observó el crecimiento de las bacterias en las placas y se evaluó si los extractos tuvieron o no efecto antimicrobiano.

**Figura 33. Incubadora para el Cultivo de Bacterias**



Nota: Elaboración propia

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados e información proporcionada en este capítulo son los obtenidos en el proceso de investigación basados en los objetivos planteados.

Con el objetivo de determinar el mejor medio de extracción de las hojas de *Bixa orellana* se evaluaron dos procedimientos de maceración con dos solventes diferentes: metanol y agua. En ambos casos se emplearon cantidades iguales del material vegetal inicial.

Como indica el estudio realizado por Acevedo (2015), las características generales de los compuestos de las hojas de *Bixa orellana* presentan solubilidad en agua y metanol, dado su carácter fenólico. Adicionalmente, su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro se debe a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. De ahí que se elija el extracto acuoso y metanólico para la realización de este proyecto y la comparación de la actividad antimicrobiana de cada tipo de extracto.

Una vez aplicados los métodos de extracción se obtuvieron líquidos de poca viscosidad y de coloración café en ambos casos. Entre ellos se notaron algunas variaciones, el extracto metanólico presentó un tono más oscuro que el acuoso y un olor más intensos, ambos antes de ser filtrados al vacío contenían pequeñas partículas del material vegetal. En la tabla 5, se resumen los resultados.

**Tabla 5. Caracterización Físicas de los Extractos Después del Proceso de Maceración**

Disolvente de extracción	Características organolépticas		
	Color	Apariencia	Aroma
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Café muy oscuro	Líquido traslúcido	Olor a hojas trituradas
Agua (H <sub>2</sub> O)	Café oscuro	Líquido traslúcido	Olor a hojas trituradas

Nota: Elaboración propia

Al realizar el proceso de eliminación de los solventes, la apariencia de algunas de las muestras cambió con respecto a los extractos disueltos. En la tabla 6 se compilan los resultados obtenidos.

**Tabla 6. Caracterización de las extracciones, posterior al proceso completo de eliminación de solventes**

Extracciones concentradas	Características organolépticas		
	Procedimientos	Apariencia	Aroma
Extracto Metanólico A	Destilación, presión reducida (rotavapor)	Líquido- café oscuro	Olor concentrado a planta verde
Extracto Metanólico B	Destilación al vacío	Textura tipo emulsión,- color café muy oscuro	Olor a planta verde.
Extracto Acuoso A	Destilación simple, presión reducida (rotavapor) y liofilización	Sólido, café oscuro	Inodoro
Extracto Acuoso B	Liofilización	Sólido, café claro	Inodoro

Nota: Elaboración propia

## Pruebas Líquidas de Caracterización de Los Extractos

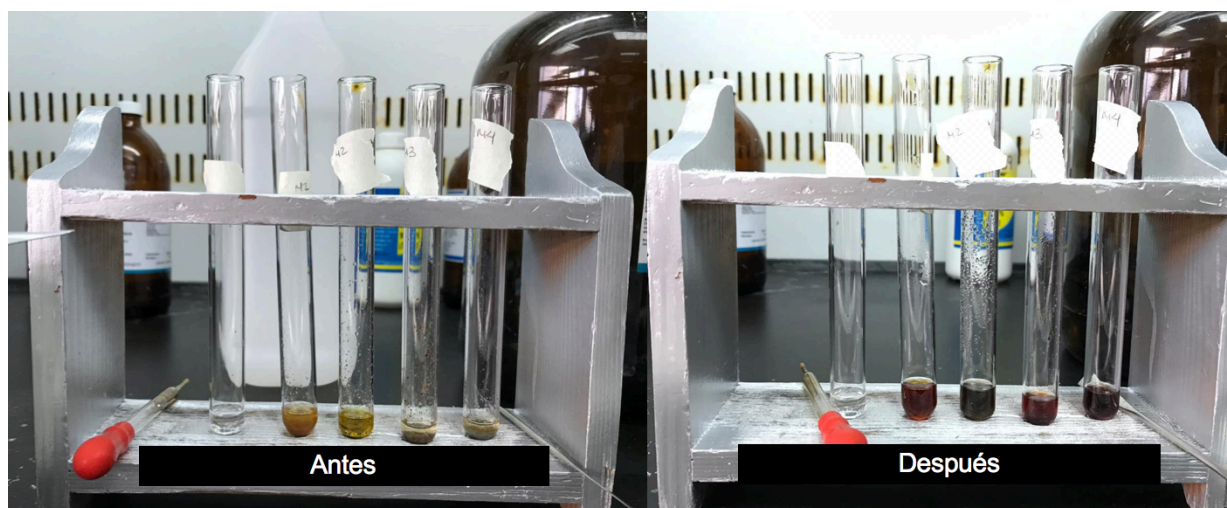
Para caracterizar los componentes activos del extracto de *Bixa orellana* se procedió a realizar pruebas de identificación para flavonoides, dobles y triples enlaces como en terpenos y alcaloides.

### Identificación de flavonoides

Para la identificación de flavonoides en los extractos de *Bixa orellana*, se aplicó a las 4 muestras sin disolvente el ensayo de Shinoda, en el que la aparición de colores en el rango de rojo a magenta indica la presencia de flavonoides. En esta prueba se genera hidrógeno debido a la reacción entre el ácido clorhídrico y el zinc, este gas produce la reducción del ion flavilo responsable de los cambios de color. Todos los flavonoides, excepto chalconas, auronas e isoflavonas, provocan una reacción positiva al realizar esta prueba (Marcano y Hasegawa, 2002, p. 58).

La figura 34 muestra los cambios antes y después de la adición del reactivo. Es de destacar que el primer tubo de ensayo corresponde a la prueba con el blanco, el cual no mostró ningún cambio de coloración. Las muestras están acomodadas como extracto metanólico A, extracto metanólico B, extracto acuoso A y extracto acuoso B de izquierda a derecha.

**Figura 34. Prueba de Flavonoides con Reactivo de Shinoda sobre Extractos de *Bixa orellana***



Nota: Elaboración propia

La aplicación de la prueba dio positiva para todos los extractos, excepto la Extracción acuosa B. De esta manera, se evidencia la posible presencia de los flavonoides en el resto de las muestras apoyando lo descrito en la literatura. La cuál indica que las hojas de Bixa orellana contienen entre sus principales componentes gran cantidad de flavonoides: 7-bisulfato de apigenina, 7-bisulfato de luteolina, 8-bisulfato de hipolaetina, glucósido de apigenina, bisulfato de apigenina, hipolaetina, cosmosiina (Melgar y Molina, 2013, p. 25).

El extracto metanólico B se mantuvo en contacto con el metanol por un tiempo prolongado antes de la eliminación de este disolvente, esto pudo causar una pérdida de la estructura de estos flavonoides, lo que podría explicar los resultados negativos.

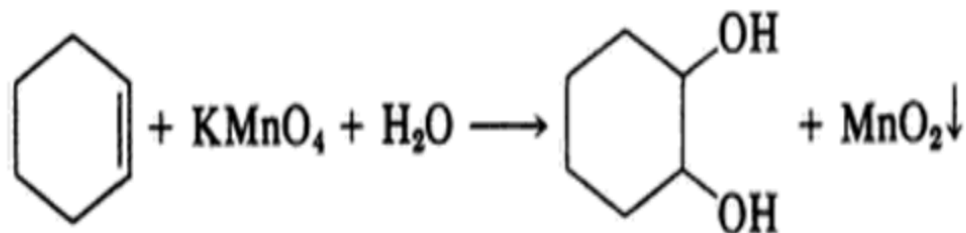
### **Identificación de Insaturaciones (Doble o Triple enlace de Carbonos)**

La segunda prueba fue realizada para demostrar la presencia de insaturaciones por doble enlace ( $C=C$ ) o triples adyacentes, como alquenos, terpenos o diterpenos (como el fitol presente en algunas de las muestras), entre otros.

Para esto se empleó el reactivo de Baeyer (un reactivo común que convierte al alqueno en un 1,2 -diol). La oxidación con permanganato de potasio cambió el color de morado a un pardo sucio ( $MnO_2$ ), el cual permanece púrpura siempre y cuando no haya saturación (Textos científicos, 2005).

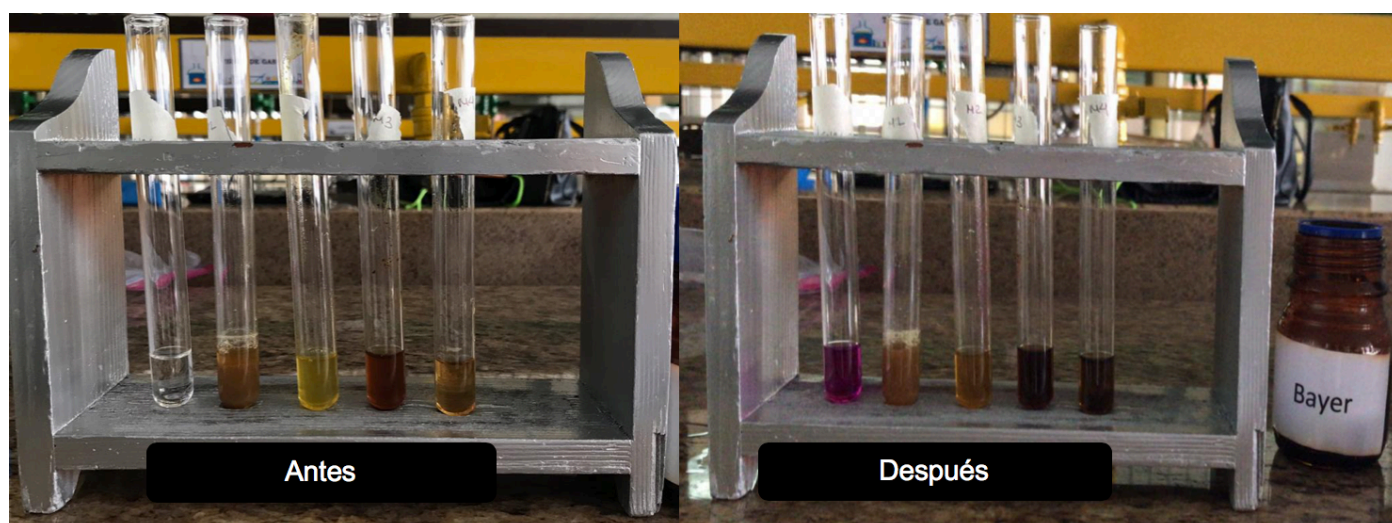
Al igual que en la prueba anterior se aplicó el reactivo de Baeyer en los 4 extractos, acomodadas izquierda a derecha empezando por el extracto metanólico A, el extracto metanólico B, extracto acuoso A, y extracto acuoso B, más el blanco, los resultados no se confirman en la prueba, ya que hubo un cambio de color en los extractos sin embargo no es tan evidente como se espera, más adelante se confirma la presencia de insaturaciones mediante las pruebas de análisis instrumental

**Figura 35. Ejemplo de la Reacción que ocurre con Reactivo de Baeyer ( KMnO4)**



Nota: Dupont y Gokel (1985)

**Figura 36. Prueba de Insaturaciones de Carbono con Reactivo De Bayer (KMnO<sub>4</sub>) sobre Extractos de *Bixa orellana***



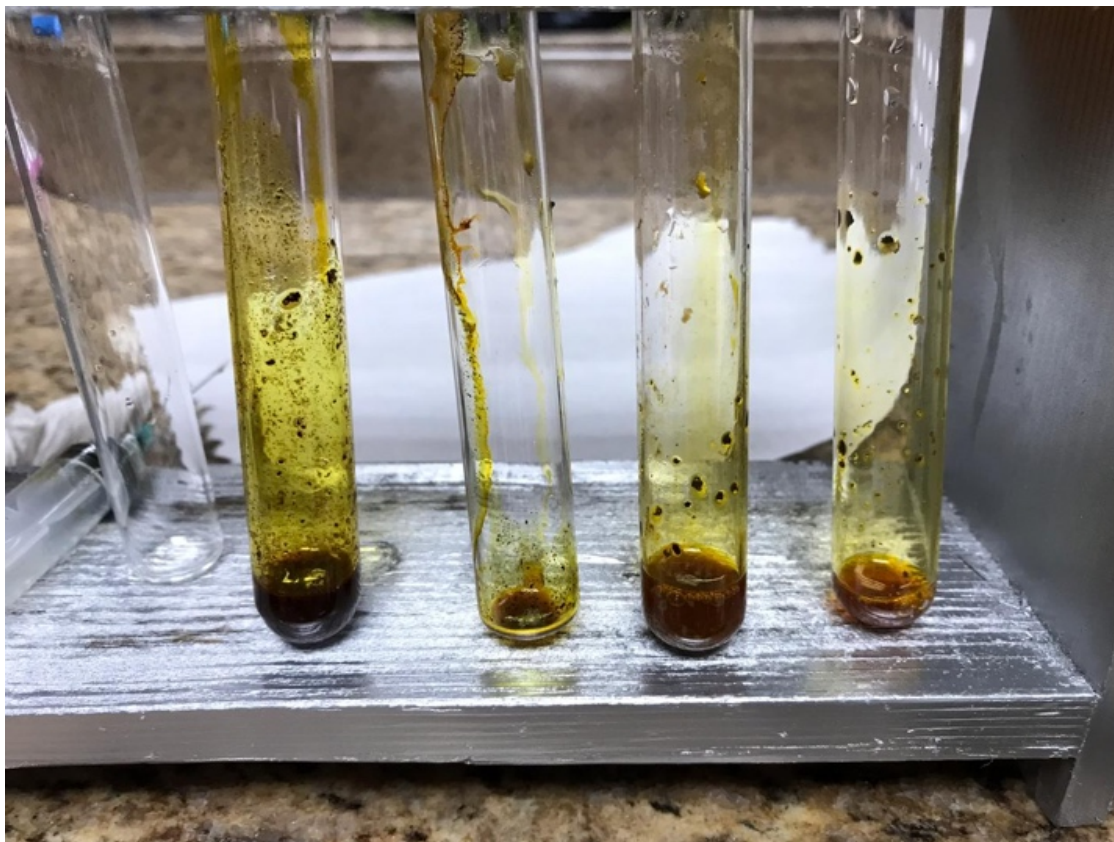
Nota: Elaboración propia.

### Identificación de Alcaloides

Para la determinación de la presencia de alcaloides se utilizó el reactivo de Dragendorff, que al formar un precipitado o coloración rojo naranja, indica la presencia de alcaloides. Pudo apreciarse un oscurecimiento de la muestra al adicionar el reactivo. Dado que los extractos eran

oscuros y se tornaron en un café rojizo, no obstante la prueba se toma como no concluyente ya que el cambio no es tan evidente, y podría darse debido al color de las muestras. Ver figura 37.

**Figura 37. Aplicación de prueba de alcaloides con reactivo de Dragendorff**

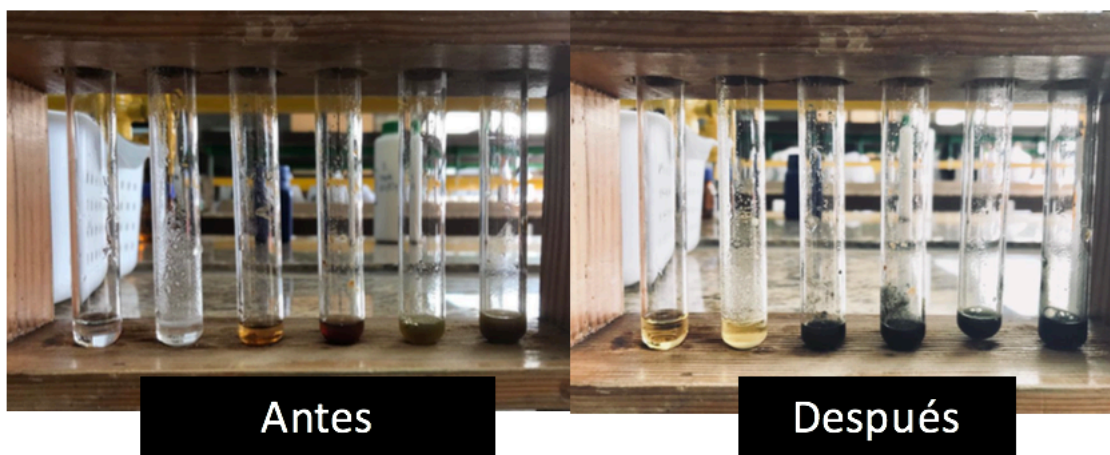


Nota: Elaboración propia.

### **Identificación de Compuestos Fenólicos- $\text{FeCl}_3$**

Para realizar esta prueba se utiliza el  $\text{FeCl}_3$ , esta prueba utilizada para reconocer fenoles, es positiva cuando los taninos reaccionan con el cloruro férrico causando un cambio de coloración a azul o verde (Colina, 2016). En este caso todas las muestras se tornaron verde oscuro, sin embargo se analiza un posible falso positivo ya que en pruebas instrumentales no se observan compuestos fenólicos.

**Figura 38. Identificación de Compuestos Fenólicos con  $\text{FeCl}_3$**



Nota: Elaboración propia.

### **Identificación de esteroides**

Esta prueba es la más utilizada para esteroides o triterpenoides, la cuál para esteroides con insaturación en sus anillos causan un cambio de color debido a la deshidratación que se da para la formación de dienos; aquí se da una coloración rosa, violeta, azul y verde. (Marcano y Hasewaga, 2002) Al realizar la prueba no se obtuvo cambios de coloración por lo que se asume que la misma es negativa.

**Figura 39. Identificación de esteroides - Reactivo Liberman-Buchnard**



Nota: Elaboración propia.

**Tabla 7. Resultados Obtenidos durante la Caracterización o Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de *Bixa orellana***

<b>Tipo de prueba</b>	<b>Componente a indentificar</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Resultado</b>
Shinoda	Flavonoides	Rojizo oscuro	Positivo
Baeyer	Dobles y triples enlaces	Coloraciones café	No concluyente
Dragendorff	Alcaloides	Cambio de color a café oscuro	No concluyente
FeCl <sub>3</sub>	Compuestos fenólicos	Cambio a verde oscuro	Falso positivo
Lieberman-Buchnard	Esteroides -triterpenos	No se pudo apreciar ningún cambio	Negativo

Nota: Elaboración propia

Con las pruebas realizadas se demostró que no todos los resultados obtenidos en estas pruebas son consistentes con lo reportado en la literatura en cuanto a los tipos de compuestos presentes, tanto la presencia de flavonoides, como de insaturaciones y alcaloides, terpenos. Melgar y Molina (2013) señalan que las sustancias químicas obtenidas de las extracciones realizadas en las hojas de *Bixa orellana* son: flavonoides, alcaloides, antraquinonas, esteroides, saponinas; lo que justifica su uso como planta medicinal.

### **Análisis Instrumental de los Extractos de las Hojas de *Bixa orellana***

En esta etapa se analizaron los extractos y sus fracciones, posterior al proceso de eliminación de los solventes, por medio de espectrometría de infrarrojo y cromatografía de gases acoplado a masas.

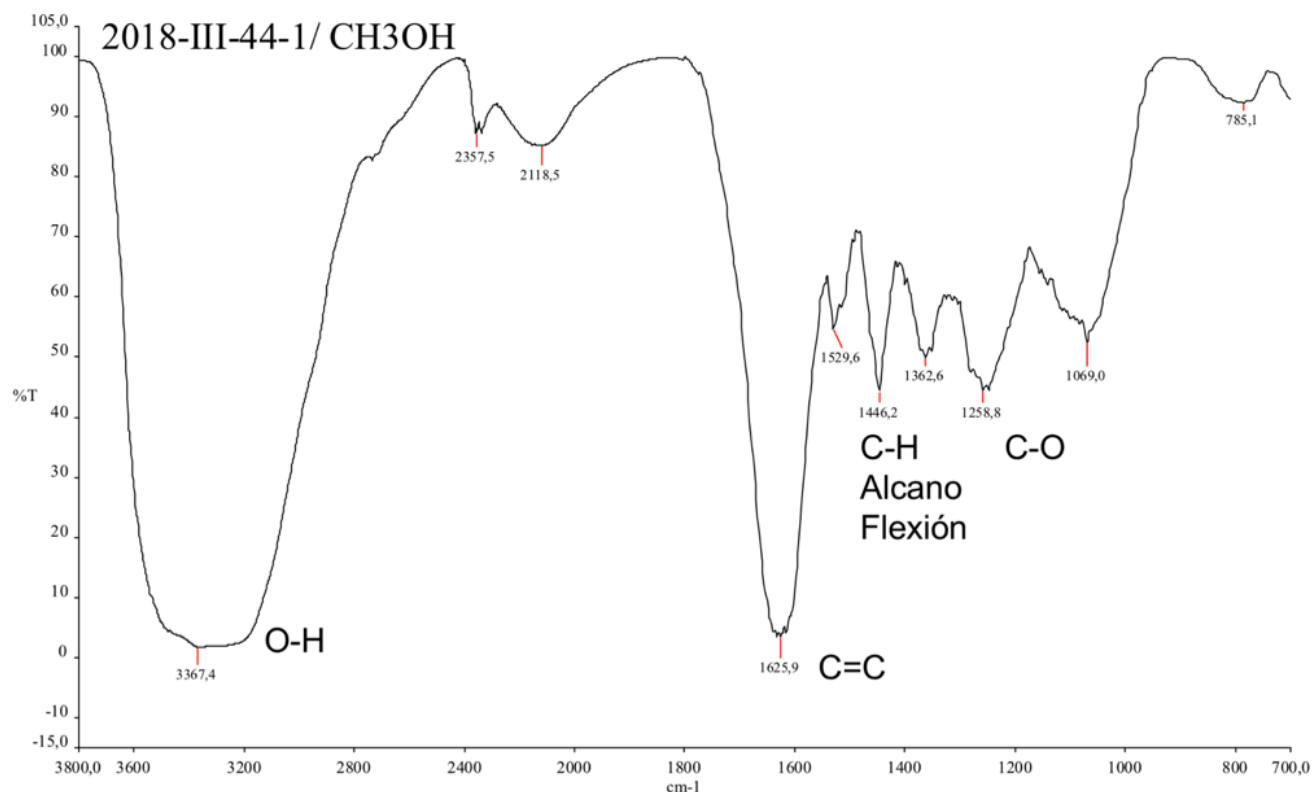
### **Análisis de los Extractos de las Hojas de *Bixa orellana* mediante Espectrometría de infrarrojo**

Se verificó la presencia de los principales grupos funcionales de los extractos de *Bixa orellana* mediante el análisis espectroscópico. Las pruebas se realizaron únicamente a las muestras que pasaron por todos los procesos de separación de disolvente, dado que estos podían interferir con el espectro de absorción. El espectro de infrarrojo evidenció señales para grupos funcionales presentes en todas las muestras; sin embargo hubo varianzas entre cada uno.

El extracto metanólico A, evidenció una señal del grupo O-H a  $3367.4\text{ cm}^{-1}$ , así mismo una señal relevante a  $1630.3\text{ cm}^{-1}$  para un enlace C=C de un alqueno, una señal a  $1446.2\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de un alcano C-H y otra más a  $1258.8\text{ cm}^{-1}$  que evidencia la señal de un enlace C-O.

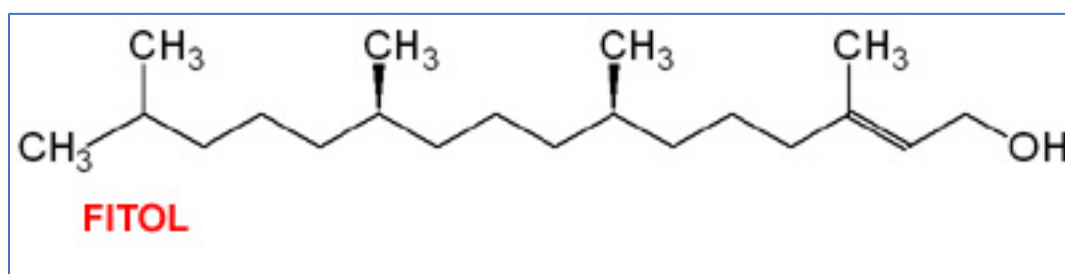
Se puede interpretar que la señal del O-H puede pertenecer al Fitol que se identificó por medio de la cromatografía de gases en las muestras metanólicas. Estos resultados se pueden observar más adelante en las tablas 8 y 9. El Fitol es un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas, presente en las hojas (Marcano y Hasewaga, (2002), p.56).

**Figura 40. Espectro Infrarrojo de la Extracción Metanólica A (CH<sub>3</sub>OH) - 2  
Destilados**



Nota: Elaboración propia.

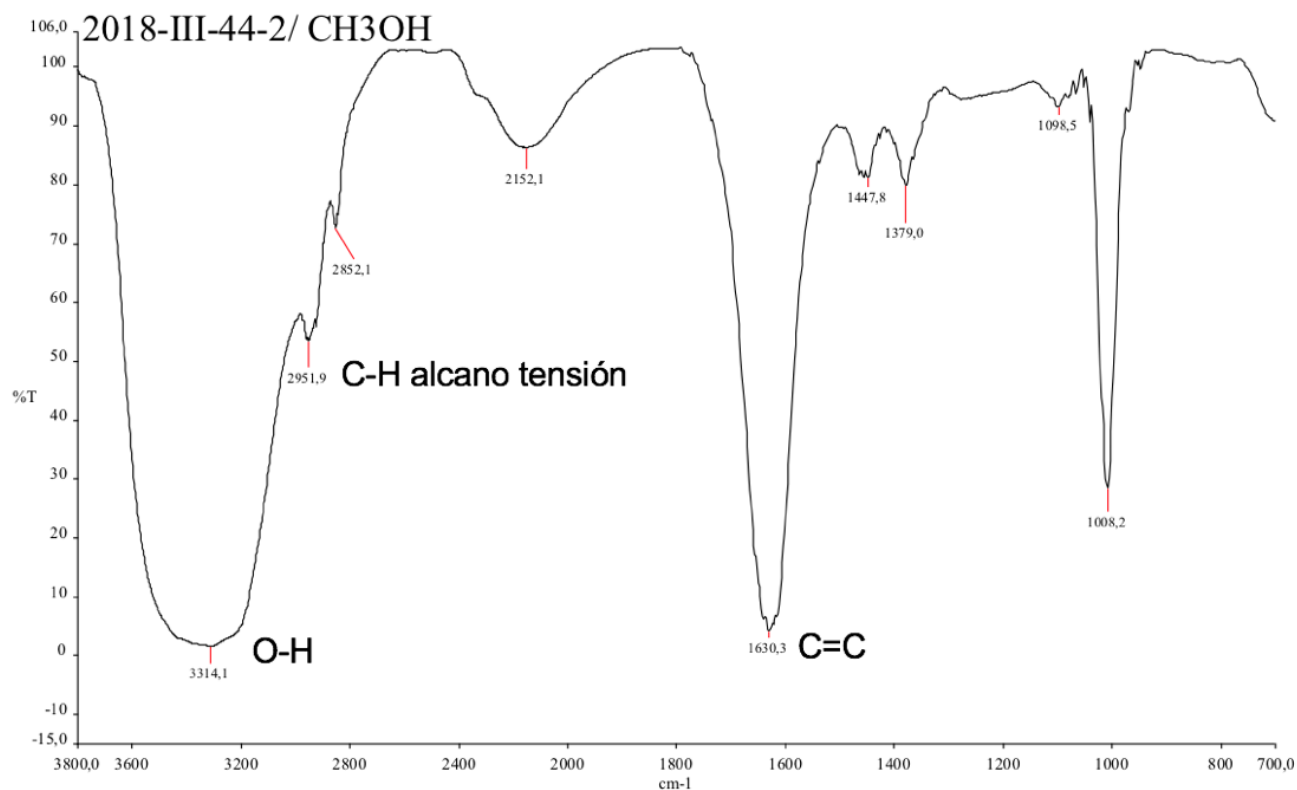
**Figura 41. Estructura del Fitol**



Nota: Kimyaevi (S.f)

El extracto metanólico B, tratado por diferentes medios para extraer el solvente ( sólo un porceso de destilación) con respecto al Extracto metanólico A, mostró los siguientes resultados: la señal del grupo O-H a  $3313.3\text{ cm}^{-1}$  y del doble enlace C=C a  $1630\text{ cm}^{-1}$ , al igual que la primera muestra. A pesar de las diferencias en el tratamiento y en la respuesta de esta fracción al resto de las pruebas realizadas, en las señales de infrarrojo si se obtuvo resultados similares con la excepción de una vibración entre estas las dos señales mencionadas anteriormente a  $2951.9\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al alcano. De igual manera se puede destacar que esta muestra también parece mostrar la presencia del Fitol en el infrarrojo por lo que la señal O-H podría relacionarse a este. Obsérvese la figura 41.

**Figura 42. Espectro infrarrojo de la Extracción Metanólica B de *Bixa orellana* – 1 Destilado**



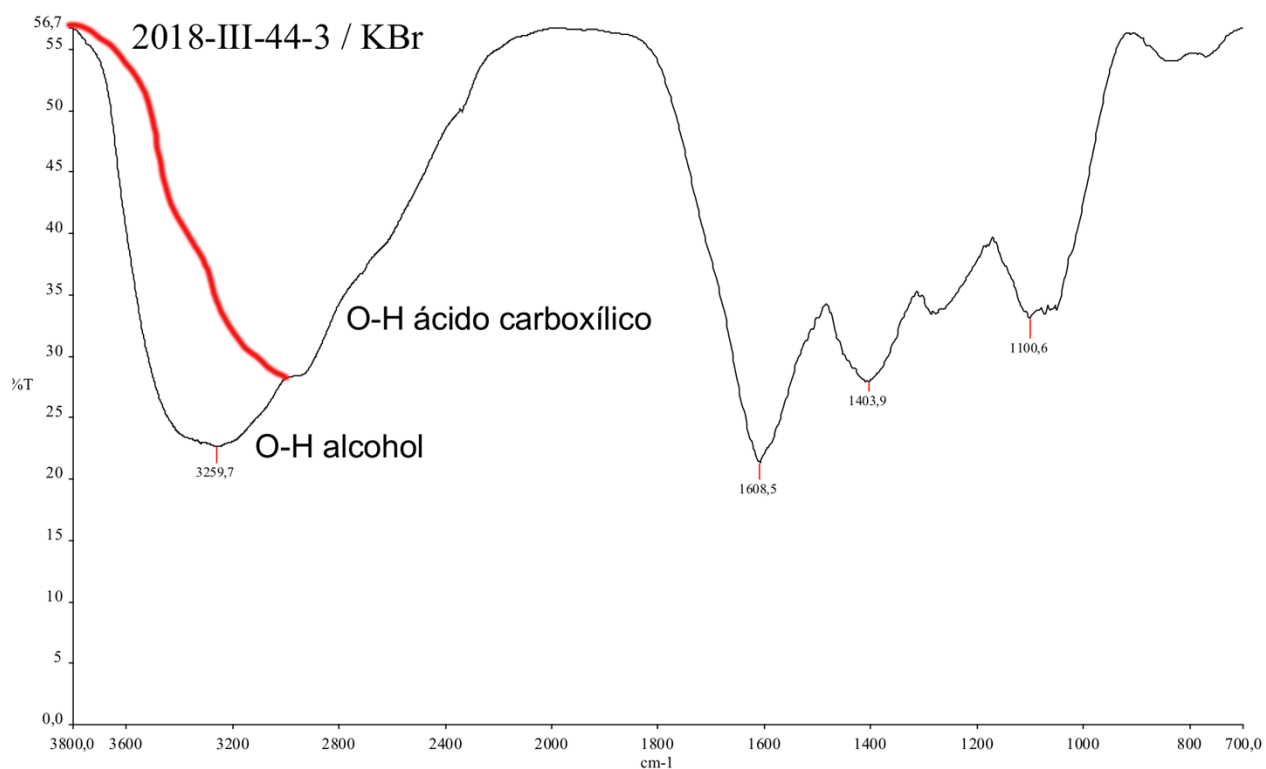
Nota: Elaboración propia.

Cabe destacar que en ambos espectros de los extractos metanólicos se evidenció la presencia del doble enlace C=C, que no se había podido confirmar por medio de las pruebas

fitoquímicas.

Por otro lado el extracto acuoso A, que fue sometido a destilación como a liofilización, presentó la tensión del alcohol a los  $3259.7\text{cm}^{-1}$ , y se observa en esta una irregularidad centrada en los  $3000\text{cm}^{-1}$  aproximadamente, la cuál es típica de ácido carboxílico. Esta señales se traslaparon, razón por la cual se resalta en rojo para que pueda apreciarse su formación. Se observó nuevamente el doble enlace, aunque con una frecuencia más baja a  $1608\text{ cm}^{-1}$ , lo cual puede verse en la figura 42. Esta señal de ácido carboxílico puede estar relacionado a la presencia de acidos grasos, que se observan más adelante en la comratografía de gases.

**Figura 43. Espectro infrarrojo de la Extracción Acuosa A de la *Bixa orellana* – Destilado y Liofilizado**

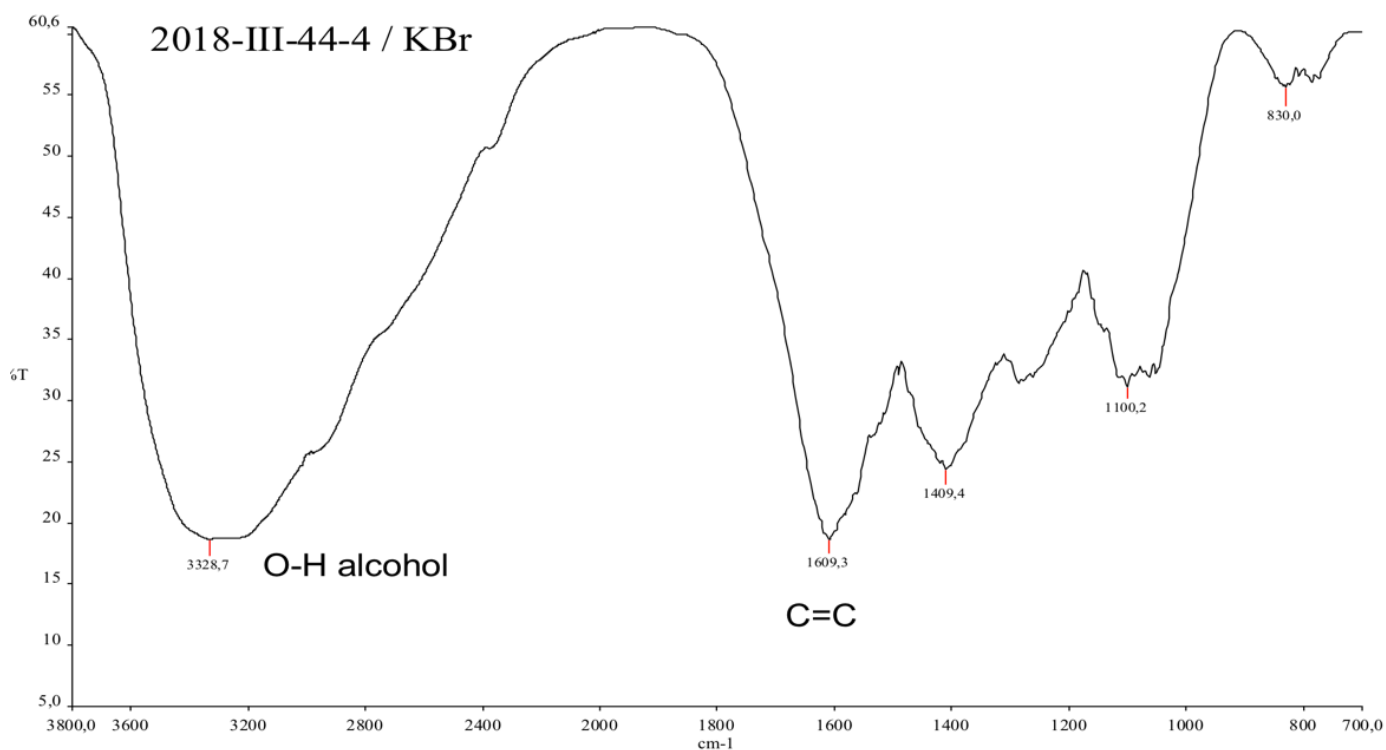


Nota: Elaboración propia

Finalmente, en el extracto acuoso B se identificó la vibración del alcohol a los  $3259.7\text{ cm}^{-1}$  del doble enlace al  $1608\text{cm}^{-1}$ , pero no se rastreó señal alguna para el ácido carboxílico. El resto de

señales no fueron muy representativas.

**Figura 44. Espectros Infrarrojos del Extracto acuoso B de *Bixa orellana* - Liofilizado**



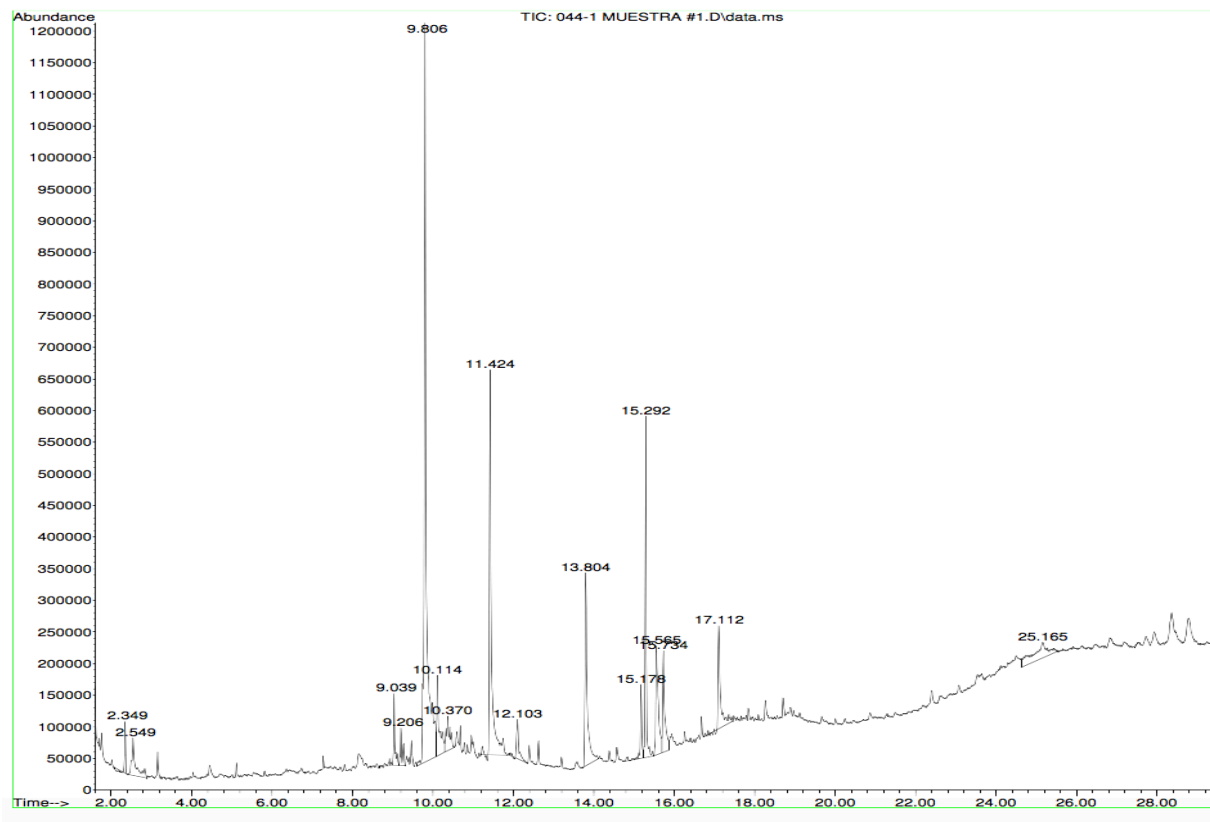
Nota: Elaboración propia

Los principales picos encontrados en los espectros infrarrojos se ubicaron entre los 3360  $\text{cm}^{-1}$  y 3200  $\text{cm}^{-1}$  que es la zona de estiramiento del O-H. Otra señal recurrente en todas las muestras fue en los 1600  $\text{cm}^{-1}$ , situación que puede atribuirse al estiramiento de los enlaces C=C, siendo probable que estas fueran características del Fitol, diterpeno observado posteriormente en la señal de gases acomplado a masas. Otras señales de menor intensidad que posiblemente involucran alcanos entre los 1400  $\text{cm}^{-1}$  y 1300  $\text{cm}^{-1}$  (Sierra, Pérez, Gómez et al., 2010, pp. 73-78).

## Análisis de los Extractos de las Hojas de *Bixa orellana* mediante Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas

Para comprobar los componentes presentes en los extractos, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS). Esta técnica es considerada altamente confiable y eficaz para identificar y determinar la proporción de componentes de un analito. Los resultados del cromatógrafo se muestran en tablas para cada fracción de cada una de las muestras. Asimismo se detallan los compuestos obtenidos en mayor proporción, de los cuales algunos pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana.

**Figura 45. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Metanólico A (CH<sub>3</sub>OH)- 2 Destilados**



Nota: Elaboración propia

**Tabla 8. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Metanólico A (CH<sub>3</sub>OH)- 2 Destilados**

TR/min	Compuesto	Porcentaje en la muestra (%)	Probabilidad porcentual (%)
9.80	Ácido dodecanoico	31.8	78.8
11.42	Tetradecanoico	14.9	65.4
15.29	Fitol	7.5	63.5
25.68	Metil fenil oxima	9.0	80.8

Nota: Elaboración propia

Al observar los resultados de las pruebas en el cromatógrafo de gases se obtiene en el extracto metanólico A que existe la presencia de un fitol a aproximadamente 7.51%, y si se repasa el espectro Infrarrojo, en este parecieron las señales de un O-H y un doble enlace C=C, ambos grupos funcionales presentes en la estructura del Fitol antes mencionado, el cuál en las pruebas líquidas (prueba de Baeyer) no se pudo concretar, se termina de confirmar tanto en el masas como en el infrarrojo.

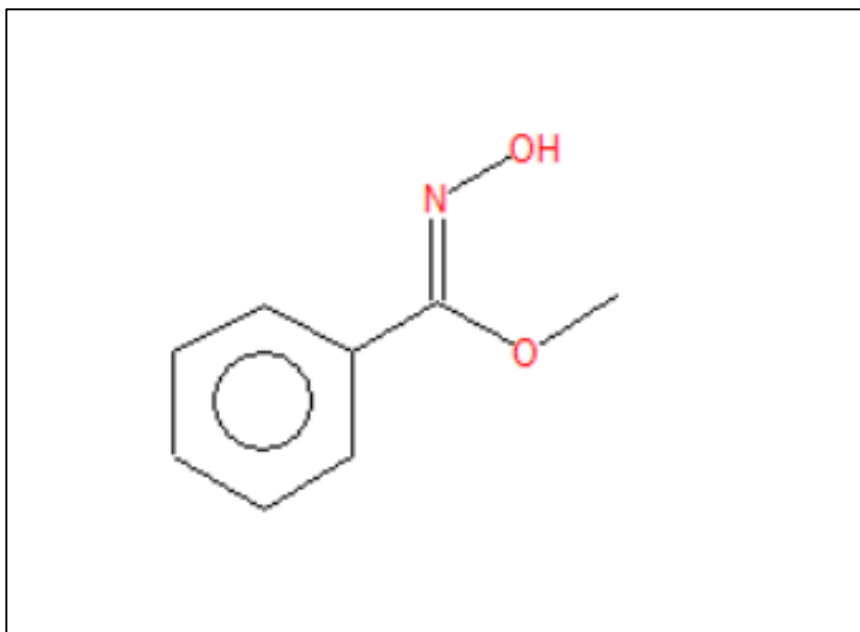
Por lo tanto se sugiere que los resultados obtenidos podrían tener relación con el fitol, que aparece tanto en la cromatografía de gases como en la literatura. Donde además se indica que este tiene propiedades terapéuticas, este compuesto ya ha sido propuesto por tener una cierta actividad antimicrobiana. (Plaza, et al, 2010).

Así mismo, no se descarta la probabilidad de que la señal OH del infrarrojo comparta señal con otros compuestos por ejemplo con el ácido dodecanoico, compuesto que se encuentra en mayor porcentaje en el extracto metanólico A acorde con la cromatografía de gases acoplado a masas.

Por otro lado se encuentra la presencia de un Metil fenil oxima, un compuesto con una estructura similar a la de un fenol, por lo que se propone, que el falso positivo obtenido en la prueba de química líquida con FeCl<sub>3</sub> se debe a este. Los fenoles forman complejos con el ión

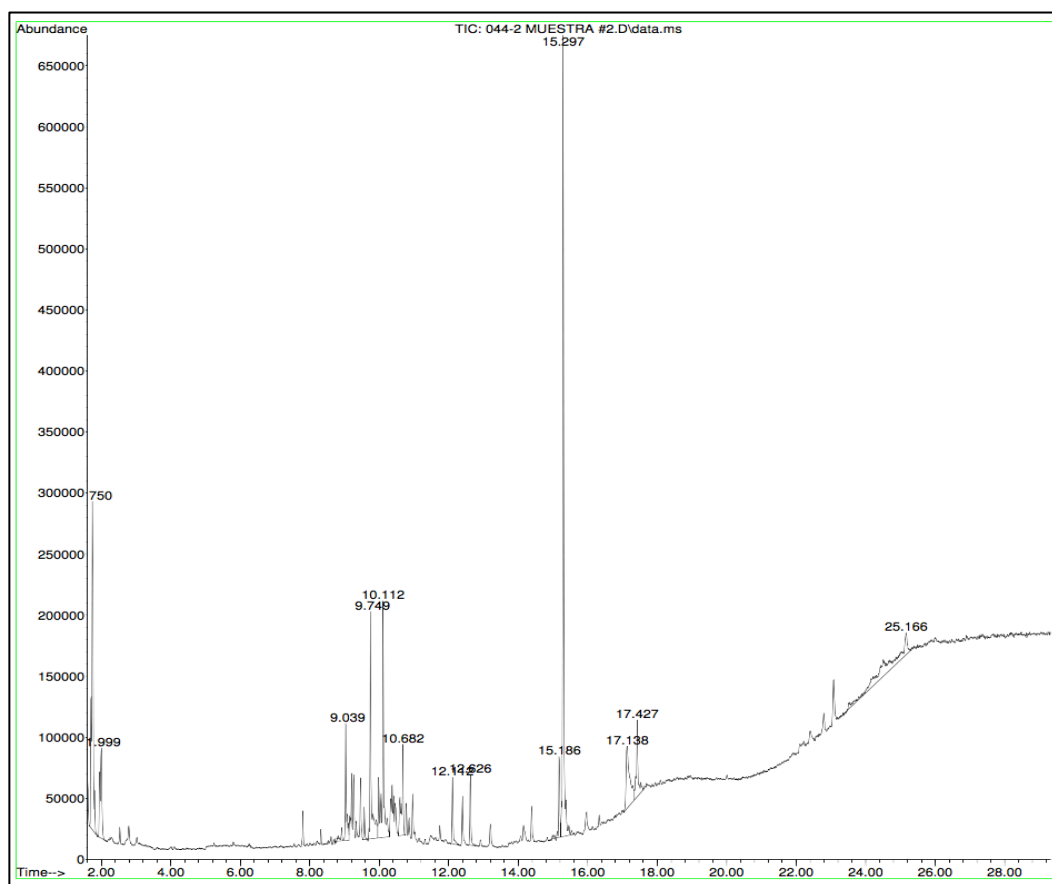
$\text{Fe}^{+3}$  en este caso la metil fenil oxima contiene un O-H, donde se puede formar el complejo y el doble enlace de la oxima puede tener resonancia con el anillo al cuál esta unido, permitiendo que se dé la formación del complejo obteniendo así el cambio de coloración observado. En la siguiente figura se muestra la estructura de la metil fenil oxima.

**Figura 46. Estructura de la Metil Fenil Oxima**



Nota: Merck, 2018.

**Figura 47 Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS) del Extracto metanólico B (CH<sub>3</sub>OH) – 1 Destilado**



Nota: Elaboración propia

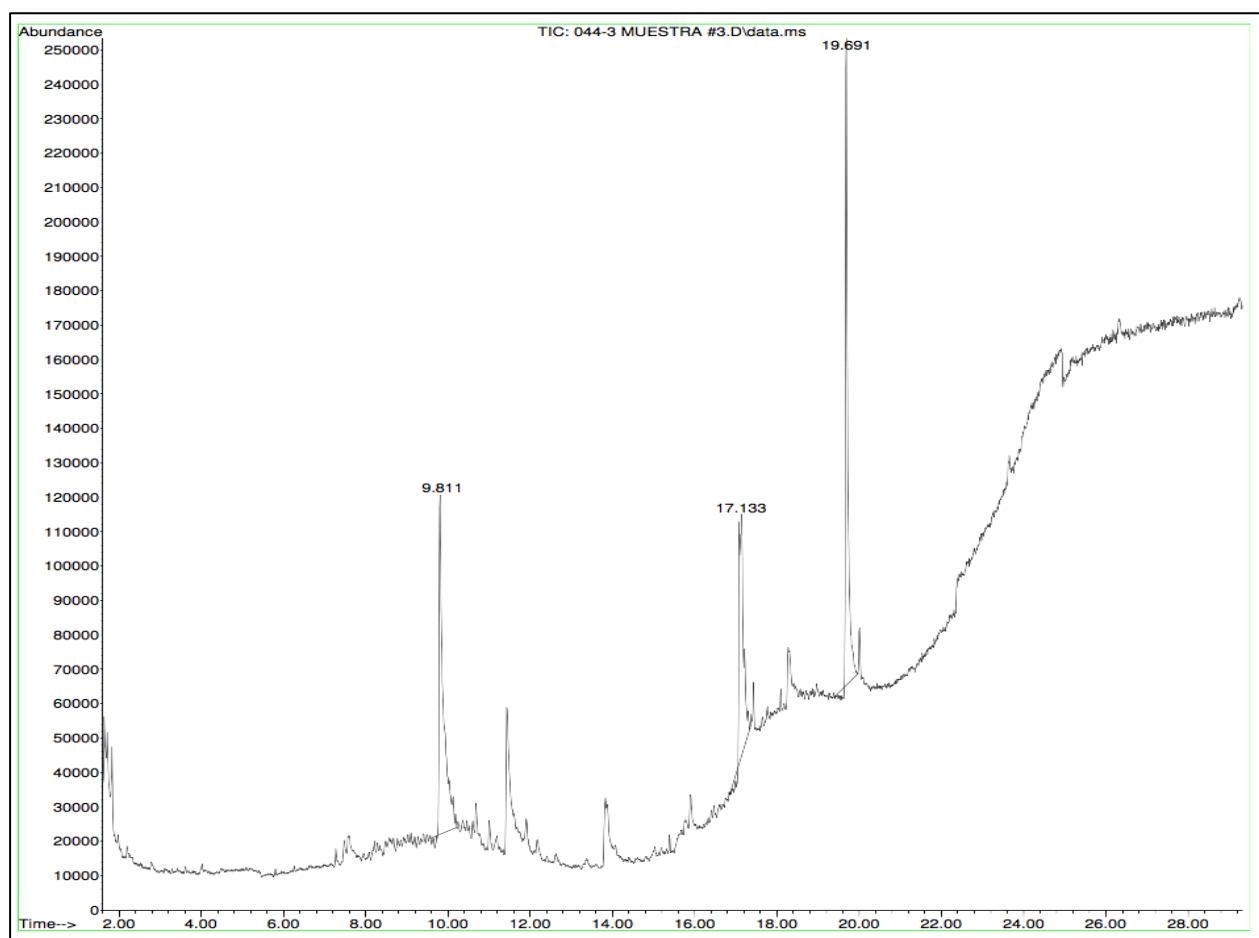
**Tabla 9. Datos Obtenidos por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto metanólico B (CH<sub>3</sub>OH) – 1 Destilado**

TR/min	Compuesto	Porcentaje con la muestra (%)	Probabilidad porcentual (%)
9.749	Dodecatrienol	8.59	0.10
10.424	Guaiol	7.51	63.5
15.297	Fitol	25.43	63.5

Nota: Elaboración Propia

Por su parte el extracto metanólico B, mostró la presencia de un fitol, compuesto mencionado por Raga (2011), quien describe cómo, al realizar un extracto de *Bixa orellana* con diclorometano, fueron aislados los compuestos ishwarano, fitol, poliprenol, estigmasterol y sitosterol. Así mismo la señal del O-H y el doble enlace de carbono se repite el espectro de infrarrojo de este extracto, lo cuál podría sugerir nuevamente la presencia del fitol, repitiéndose las señales del extracto metanólico A, tanto en el IR, como en la cromatografía de gases acopladas a masas como en la prueba de Baeyer.

**Figura 48. Análisis por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Acuoso A – Destilado y liofilizado**



Nota: Elaboración propia.

**Tabla 10. Datos Obtenidos por Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) del Extracto Acuoso A – Destilado y liofilizado**

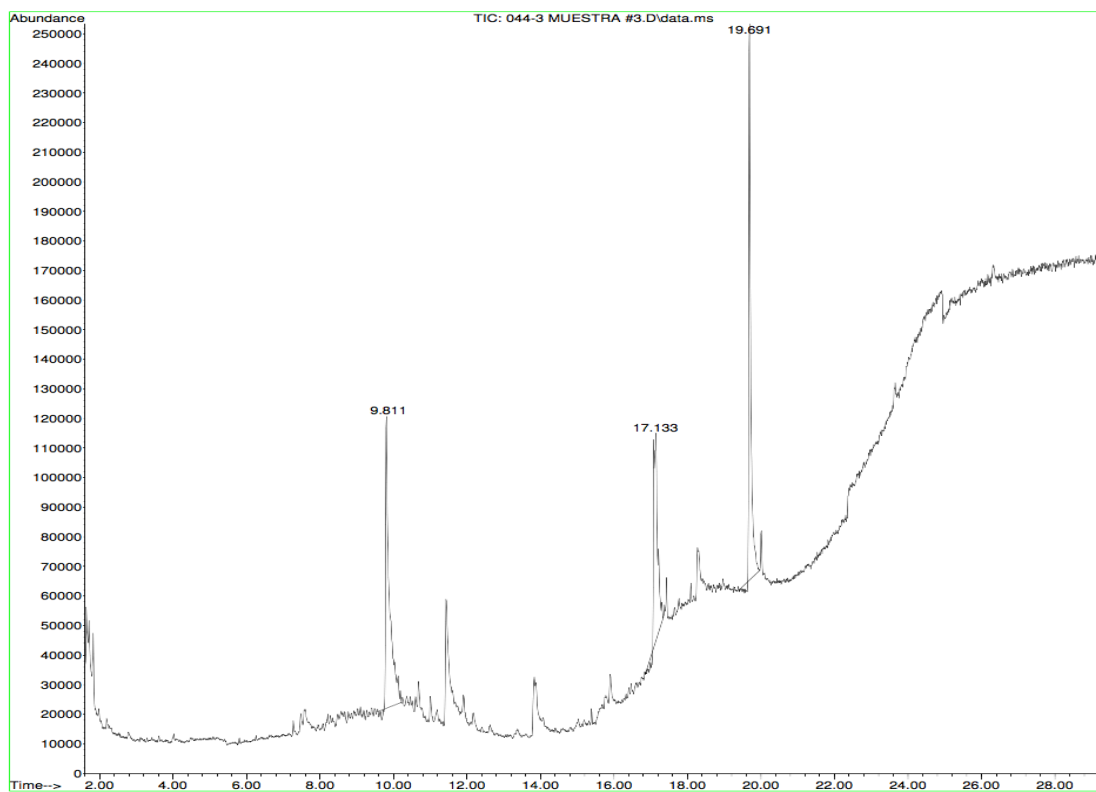
TR/min	Compuesto	Porcentaje en la muestra (%)	Probabilidad de coincidencia (%)
9.8	Ácido dodecanoico	36.91	65.6
17.1	Octasenamida	26.55	67.1
19.7	Docosenamida	36.54	0.79

Nota: Elaboración Propia

El extracto acuoso A, , muestra un dato interesante de recalcar: la presencia del ácido dodecanoico (ácido láurico) en una proporción de 36.9%. Este mismo compuesto se identificó en el análisis cromatográfico del extracto metanólico A, arrojando también un porcentaje alto en la muestra de 31.9%. En este caso para el extracto acuoso no se encuentra presencia de Fitol, en las pruebas cromatográficas, Por lo que la señal infrarroja que al parecer era de un ácido carboxílico podría pertenecer al ácido dodecanoico encontrado. La presencia de los dobles enlaces de Carbono representados en el IR y en la prueba positiva de Baeyer podrían pertenecer a la Docosenamida y Octasenamida, reflejadas la Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas (CG-MS) y estos contienen doble enlace.

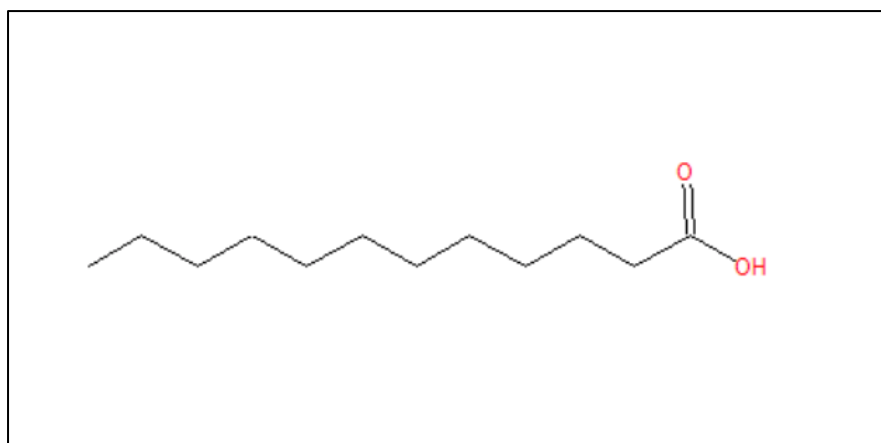
Por su parte, el ácido dodecanoico identificado, conocido también como ácido láurico, posee potencial antimicrobiano; en una investigación realizada por Pérez (2004), consistente en un análisis de ácidos grasos para identificar su actividad antimicrobiana, indicó que el ácido dodecanoico, identificado también por análisis de cromatografía de gases (CG), presentó actividad sobre las bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus* y las Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (p. 6).

**Figura 49. Datos obtenidos mediante el análisis por Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS) del Extracto acuoso A (CH<sub>3</sub>OH)**



Nota: Elaboración propia

**Figura 50 Estructura del Ácido Dodecanóico**



Nota: Cailà y Parés, 2018.

Finalmente, el extracto acuoso B, no mostró presencia de compuestos, razón por la cual no se adjunta tabla de resultados ni el cromatograma.

### **Determinación de la Posible Actividad Antibacteriana de las Extracciones Metanólicas y Acuosas de *Bixa orellana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus***

#### **Resultados del ensayo microbiológico etapa 1**

Como se mencionó anteriormente, esta etapa del proyecto se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en la toma de muestras de los extractos aún con solvente o con trazas de este, y las pruebas se realizaron en 4 placas de Petri, las cuales se ralaron con *Staphylococcus aureus*. La primera placa se utilizó para evaluar los extractos metanólicos, por lo que se hicieron 3 pruebas con la muestra metanólica A; mientras que se condujeron otras 3 pruebas con la muestra metanólica B. En una placa completa solo se agregó disolvente, para este caso metanol.

Los resultados de este proceso se muestran a continuación en la tabla 11.

**Tabla 11. Resultados de la Prueba de Sensibilidad Microbiana de *Staphylococcus aureus* con las Extracciones Metanólicas de *Bixa orellana* Bajo la Presencia del Solvente Placa 1**

<b>Extracciones en Metanol Metanol (CH<sub>3</sub>OH)</b>	<b>Número de hoyo</b>	<b>Actividad</b>	<b>Halo de inhibición (mm)</b>
Extracto metanólico A	2	Positiva	8 mm
Extracto metanólico A	3	Positiva	9 mm
Extracto metanólico A	4	Positiva	10 mm
Extracto metanólico B	1	Negativa	0 mm
Extracto metanólico B	5	Positiva	5 mm
Extracto metanólico B	6	Negativa	0 mm

Nota: Elaboración propia

En este ensayo se observó que las tomas provenientes de la extracto metanólico A, dieron un resultado positivo al inhibir el crecimiento antimicrobiano en poca medida. Es necesario hacer notar que esta muestra se trató previamente en el laboratorio bajo métodos de destilación, sin embargo aún conservaba trazos del solvente. A su vez la extracción metanólica B contenía todo el solvente cuando se hizo esta prueba. El punto 5 en la placa presentó una ligera inhibición, pero siendo esta una muestra de extracción metanólica B, se asumió que dicha presencia fue causada por un error a la hora de manipular la micropipeta (fue agregado más contenido del previsto), lo cual podría indicar que, aún bajo los efectos del solvente, un mayor volumen del extracto podría mostrar actividad frente a la cepa. El control positivo Prodesin SF agregado en el centro mostró un halo de inhibición de 15 mm. A continuación en la figura 51 es posible observar los resultados obtenidos en la placa

**Figura 51. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *Staphylococcus Aureus* Frente a Extracciones Metanólicas de *Bixa Orellana* Bajo la Presencia del Solvente Placa 1 (Vista Frontal)**



Nota: Elaboración propia

Con respecto a las pruebas realizadas en la Placa 2, donde se utilizaron los extractos acuosos, la extracción acuosa A reveló trazas de agua y la extracción acuosa B (sin destilar). Al cabo de 24 horas de incubación no hubo registros de ninguna actividad frente al raspado de *Staphylococcus aureus*, observándose así el crecimiento de la bacteria en toda la placa. Por otra parte, en el centro se formó un halo inhibitorio por efecto del control positivo de Prodesin S.R. Los resultados pueden observarse en la figura 52.

**Figura 52. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *Staphylococcus aureus* frente a las Extracciones Acuosa de Bixa orellana Bajo la Presencia del Solvente Placa 2 (Vista Frontal)**



Nota: Elaboración propia

Adicionalmente se probaron dos placas más con la bacteria, a una se le adicionó en los agujeros solamente agua destilada, mientras que a la otra tan solo metanol, ambas como blancos. En este caso ninguna presentó actividad frente a las cepas, revelando que los solventes utilizados por sí solos no ejercen ningún tipo de actividad antimicrobiana frente al *Staphylococcus aureus*.

### Resultados del ensayo microbiológico etapa 2

Para llevar a cabo este proceso se utilizaron los extractos tratados para la eliminación completa de sus solventes. Se tomaron nuevamente dos placas de Petri, a las que se aplicó la técnica de raspado en zigzag con la cepa de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente se utilizó una de las placas para realizar las pruebas con las extracciones metanólicas sin disolvente. A esta primera se le aplicó la extracción metanólica A (destilada 2 veces), una toma de 5  $\mu\text{L}$ , y en la marca 2 una toma de 10 $\mu\text{L}$ . A continuación, de la extracción acuosa B se tomaron también 5  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  que fueron aplicados en las marcas 3 y 4 respectivamente. A las otras dos se les agregó sólo metanol como blanco. En el centro de la placa se adicionó 5 $\mu\text{L}$  de Fucicort: una crema con acción antibacteriana utilizada de manera tópica para infecciones en piel y mucosas como control positivo. Este presentó un halo inhibitorio de 30 mm. Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 12.

**Tabla 12. Resultados de la Prueba de Sensibilidad Microbiana de Extracciones Metanólicas Concentradas de *Bixa orellana* Frente a *Staphylococcus Aureus* Placa 1**

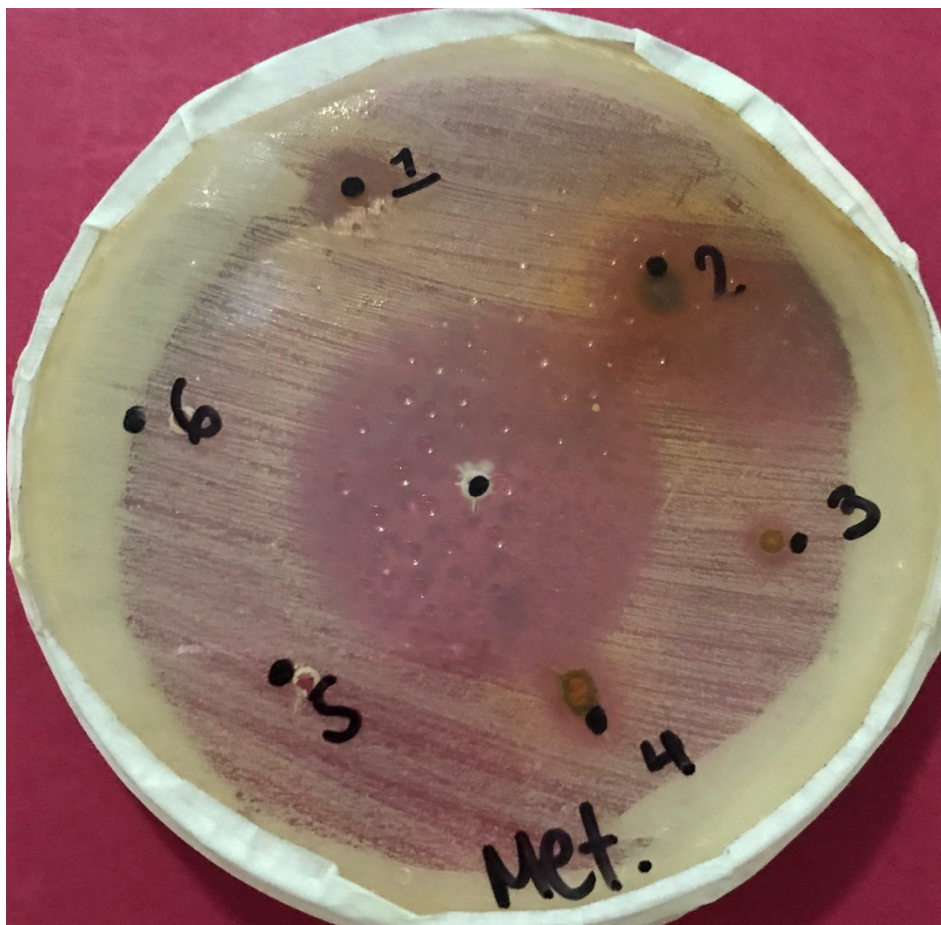
Extracciones en Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	Número de hoyo	Actividad	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )	Halo de inhibición (mm)
Extracto metanólico A	1	Positiva	5	10
Extracto metanólico A	2	Positiva	10	25
Extracto metanólico B	3	Negativa	5	3
Extracto metanólico B	4	Negativa	10	5

Nota: Elaboración propia

En la figura 53 es posible observar los halos inhibitorios predominantes de esta prueba.

Pueden identificarse con los números 1 y 2, así como el halo central, que corresponde al control positivo.

**Figura 53. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *Staphylococcus aureus* Frente a Extracciones Metanólicas Concentradas de Hojas de *Bixa orellana* Placa 1 (Vista Frontal)**



Nota: Elaboración propia

Asimismo, se realizó el procedimiento pero con las muestras de las extracciones acuosas sin solvente, las cuales se probaron concentradas como sólidos para así comparar el efecto sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* sin intervención del solvente. Para este caso se utilizaron microespátulas de 0.05 y 0.1 mg. A la placa de Petri con el agar se le realizó el mismo procedimiento que a las otras, de modo que se le hicieron 6 marcas con su respectivo agujero alrededor y uno al centro. Se tomaron 2 muestras en su forma sólida y se adicionaron en los agujeros como se detalla en la tabla 13. Las marcas 5 y 6 se llenaron con agua destilada como blanco y el centro con 0.1 mg de Fucicort.

**Tabla 13. Resultados de la Prueba de Sensibilidad Microbiana de *Staphylococcus aureus* con las Extracciones Metanólicas de *Bixa orellana* Bajo la Presencia del Solvente Placa 2**

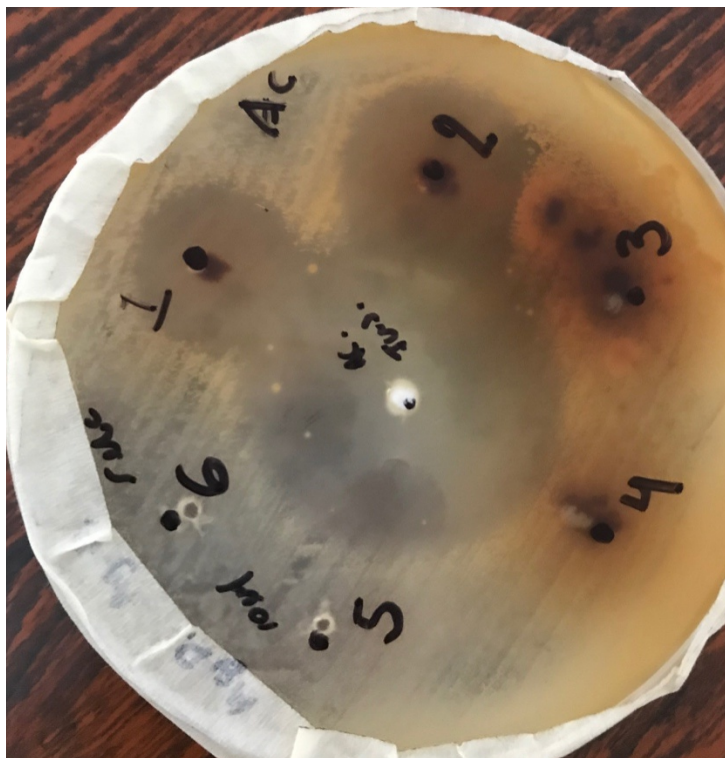
<b>Extracciones en Agua (H<sub>2</sub>O)</b>	<b>Número de hoyo</b>	<b>Actividad</b>	<b>Cantidad (mg)</b>	<b>Halo de inhibición (mm)</b>
Extracción acuosa A	1	Positiva	0.05	10
Extracción acuosa A	2	Positiva	0.1	20
Extracción acuosa B	3	Negativa	0.05	0
Extracción acuosa B	4	Negativa	0.1	0

Nota: Elaboración propia

Posteriormente al período de incubación de las cepas en las placas, se evidenció que extracto acuoso A mostraban actividad, a diferencia de los que contenían solvente. Es importante destacar que la respuesta positiva se dio en la fracción de la muestra que fue inicialmente destilada en el laboratorio y luego sometida al proceso de liofilizado para eliminar todo el solvente, dado que no se obtuvo ninguna respuesta por parte del extracto que solo fue liofilizado.

Esto sugiere que la falta de actividad de el extracto metanólico B sin disolvente puede deberse a que antes de enviarse al laboratorio para el proceso de eliminación del solvente, se mantuvo durante tres semanas en refrigeración; período durante el cual el extracto pudo variar sus características químicas. Así mismo, existe la posibilidad de que el proceso de destilación simple y por rotavapor por el que pasó la primera muestra generara una diferencia al extraer sus componentes activos. En la figura 54 se observan los halos inhibitorios formados. El control positivo de Fucicort mostró un halo de inhibición de 35 mm.

**Figura 54. Prueba de Sensibilidad Microbiana de *Staphylococcus aureus* frente a Extracciones Metanólicas de *Bixa orellana* Placa 2 (Vista Frontal)**



Nota: Elaboración propia

De acuerdo con los lineamientos establecidos por el Clinical Laboratory Standards Institute CLSI (2017), la manera de caracterizar un halo de inhibición es mediante tres niveles: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), pues de esta manera se expresa que, cuando una bacteria es sensible a una sustancia, desarrolla la capacidad de generar un halo de inhibición de entre 30 mm y 35 mm de diámetro. De igual manera se clasifica como intermedio el que ronda entre 30 y 15 mm y es considerado resistente cuando genera halos de inhibición menores a 15 mm. Por medio de la aplicación de estos parámetros, es posible establecer cuáles sustancias antibacterianas son eficaces y permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), por cuanto establece que esta es la mínima concentración de una sustancia que logra inhibir el crecimiento y desarrollo de una bacteria específica (pp. 56-63).

En la tabla 12 se observan los valores de medición obtenidos. El extracto metanólico A (destilado 2 veces) presentó un diámetro de 25 mm con 10  $\mu\text{L}$ ; esto la califica como de acción intermedia mientras que a 5  $\mu\text{L}$  es resistente, dado que se obtuvieron halos de inhibición de 10 mm. Por otro lado, el extracto metanólico B (destilado 1 sola vez) mostró unos halos pequeños de 5 y 3 mm para las concentraciones de 5  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$  respectivamente. Esta varianza entre extractos del mismo medio muestra que la diferencia en los tratamientos de cada uno para eliminar el disolvente tiene un impacto en la determinación de su capacidad antimicrobiana. Por lo que se concluyó que la opción con mayor actividad antimicrobiana es el extracto metanólico que pasó por procesos de destilación en rotavapor inmediatamente después de la maceración, y luego por un sistema de destilación al vacío de mayor potencia. A diferencia de la extracción B que se mantuvo en refrigeración durante 22 días previo a la eliminación del solvente en rotavapor de alto rendimiento.

En el caso del control positivo, para las cantidades de 5  $\mu\text{L}$  produjo un halo inhibitorio de 30 mm para la primera prueba, con lo que se verifica que es sensible, según los estándares de la CLSI. Cabe destacar que se utilizó este medicamento tanto por su disponibilidad como por su conocida acción frente a microorganismos Gram+ y cocos Gram-, pues actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana mediante el bloqueo del factor de elongación G (FE-G), evitando así que este se una a los ribosomas y a la GTP (guanosina trifosfato), e interrumpa el aporte energético para el proceso de síntesis de la bacteria.

Continuando con los resultados obtenidos en el análisis microbiológico con relación a los extractos acuosos concentrados mostrados en la tabla 13, se pudo observar que el extracto acuoso A, sí presentó actividad. Este resultado es relevante ya que los extractos con traza de solvente no presentaron ninguna respuesta (figura 46), por lo tanto es necesaria aclarar que las fracciones acuosas fueron tratadas de manera diferente para retirar el solvente, y el que generó respuesta positiva fue el que se destiló de manera simple, en rotavapor y posteriormente se liofilizó; asimismo la fracción D, que no generó actividad frente a la cepa, fue la misma en que el análisis cromatográfico no identificó los componentes.

Los valores de medición para la extracción acuosa A fueron de 10 mm y 20 mm para el extracto concentrado de 0.05 mg y 0.1 mg respectivamente, por lo que se puede interpretar, acorde con la CLSI, que el extracto acuoso concentrado de hojas de *Bixa orellana*, a partir de 0.05 mg muestra resistencia, mientras que el de 0.1 mg presenta sensibilidad intermedia frente al *Staphylococcus aureus*.

Con respecto a estos resultados es relevante destacar que la acción antibacteriana de los extractos puede variar: desde el solvente utilizado para la extracción, como el tratamiento que se dé a estos para su eliminación posterior. Igualmente, existen variables en la composición de los metabolitos, que pueden darse desde las condiciones (ambientales, climáticas, geográficas, etc.) en que creció la planta, hasta la manipulación del material vegetal en el laboratorio (como contaminación o descomposición, entre otras). Siguiendo esta misma línea, pudieron obtenerse variaciones en el proceso microbiológico que alteraran en el ensayo.

Por otro lado, es necesario enfatizar la relación existente en la respuesta microbiológica entre el Extracto metanólico A y el extracto acuoso A. Ambos presentaron halos de inhibición relevantes, siendo los mismos extractos que, al realizar la cromatografía de gases acoplada a masas, presentaron presencia del ácido dodecanóico. Algunas investigaciones han demostrado la actividad antimicrobiana y bactericida de los ácidos grasos, registraron la capacidad de estas sustancias para causar la lisis de las células bacterianas, por ruptura de la membrana celular (Kabara *et al.*, 1977). Y un estudio realizado acerca del poder antimicrobiano de los ácidos grasos indica el ácido láurico, es el ácido graso más inhibitorio contra organismos grampositivos.

### **Determinación de la Posible Actividad Antibacteriana de las Extracciones Metanólicas y Acuosas de *Bixa orellana* frente al *Streptococcus pyogenes***

En la búsqueda de las cepas bacterianas después de tener inconvenientes encontrando la cepa de *Streptococcus pyogenes*. Laboratorios Prelab, colaboró con la obtención de las mismas. Sin embargo, hicieron la aclaración de que las cepas de *Streptococcus pyogenes* eran muy inestables y difíciles de ingresar al país, y que por su alto grado de patogenicidad e inestabilidad, no se manipulan mucho.

Con la mejor intención de apoyar esta investigación, los laboratorios hicieron entrega de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* que tenían disponibles, desafortunadamente al realizar los medios de cultivo en tioglicolato la cepa de *Streptococcus pyogenes* no creció, dado que ya se encontraba inactiva.

A razón de este hecho se quiso hacer el esfuerzo de traer una cepa activa de *Streptococcus pyogenes* de Estados Unidos. No obstante, por ser un agente biológico y patógeno inestable, el costo de traerlo es de alrededor de 90 días y representaba un costo monetario alto, que no era posible cubrir. Por dicho motivo no se logró comprobar los efectos de los extractos realizados frente a cepas activas de *Streptococcus pyogenes*.

En la figura 55 aparece una comparación de un cultivo en tioglicolato con el *Streptococcus pyogenes* inactivo versus el cultivo en tioglicolato del *Staphylococcus aureus*. El primero muestra únicamente el líquido como medio de cultivo, mientras que el segundo se muestra como una sustancia turbia por el crecimiento de la bacteria.

**Figura 55. Comparación de un Cultivo Inactivo *Streptococcus pyogenes* (izquierda) Versus Cultivo Activo de *Staphylococcus aureus* (derecha)**



Nota: Elaboración propia

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar esta investigación se comparten las principales conclusiones.

Se determinó que el medio de extracción más conveniente para las hojas de la *Bixa orellana* es el metanólico. Una vez realizado el proceso de maceración, la eliminación del agua aumenta la complejidad del proceso al tener un punto de ebullición muy alto; dado que se necesitan medios especiales para lograr retirar todo el solvente, como un liofilizador, y que además al momento de agregar más calor existe la posibilidad de descomponer el extracto. Esto no solo hace más difícil el proceso por la necesidad de utilizar equipo, sino que también acarrea implicaciones económicas que no tiene el extracto metanólico, ya que se puede tratar por medios de destilación de fácil acceso.

El análisis de química líquida permitió confirmar la presencia de metabolitos activos como flavonoides del reactivo de Shinoda. Y se pudo confirmar la presencia de insaturaciones sin embargo se requirió realizar el infrarrojo para esto. Algunas de las pruebas no fueron concluyentes por lo que se sugiere realizar más pruebas, y la prueba de esteroides si fue negativa para los extractos obtenidos.

La extracción metanólica presenta mayor efecto antimicrobiano frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* que el extracto acuoso. Fue posible concluir que los extractos de las hojas de *Bixa orellana* tienen acción antimicrobiana de sensibilidad intermedia bajo tratamientos especiales de extracción del solvente. Para el extracto en metanol, este proceso debe iniciarse una vez finalizada la maceración: primero debe hacerse filtrado a vacío y destilarse por medio de rotavapor de alto rendimiento. Por su parte, la eliminación del extracto acuoso debe realizarse al cabo del proceso de maceración, pasando por filtrado al vacío, destilación simple y por rotavapor, y por último ser liofilizado.

Al aplicar la técnica de espectrofotometría infrarroja en las muestras de extracto de las hojas de *Bixa orellana*, fue identificada la presencia de bandas de absorción características de los OH y posiblemente de terpenos, alquenos y alcanos. No obstante, se detecta que existe la

probabilidad de que se detectaran señales que se pueden atribuir al fitol de la clorofila, presente también en la espectrometría infrarrojo.

Al emplear la técnica de cromatografía de gases acoplados a masas, se identificó diferentes componentes en cada una de las muestras. Sin embargo, en los extractos metanólicos se reflejó en ambas fracciones la presencia de un fitol. A su vez, en las dos muestras (acuosa y metanólica) que presentaron efecto frente a la cepas de *Staphylococcus aureus* se identificó la un alto porcentaje de la presencia del ácido dodecanóico, el cuál se considera puede inferir en la respuesta antimicrobiana de los extractos.

La actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Bixa orellana* contra cepas de *S. aureus* mediante la medición de halos de inhibición, establece que a partir de 5 $\mu$ L del extracto metanólico concentrado hay una respuesta sensible a estas, mientras que a 10  $\mu$ L hay una respuesta intermedia. Por otro lado a partir de 0.1 mg del extracto acuoso concentrado (liofilizado) se puede percibir una respuesta de sensibilidad intermedia. Lo que indica un potencial agente antimicrobiano si se hace una extracción a mayor concentración o mayores dosis en la posología, si se realizara un medicamento.

La actividad de los extractos frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* no se pudo realizar, tanto por la inestabilidad de las bacterias como por la dificultad de ingresar cepas activas de este microorganismo a Costa Rica, ya que requiere una inversión de tiempo y dinero muy considerable.

### **Recomendaciones**

Se recomienda al hacer procesos de maceración que se extraiga el solvente de los extractos tan pronto esta se termine.

Para futuras investigaciones sería muy enriquecedor, para apoyar el trabajo de los alumnos, que la Universidad tuviera al alcance de estos el equipo adecuado para poder realizar las pruebas instrumentales, el cual incluiría un equipo rotavapor de mayor rendimiento y un espectrómetro de

gases acoplado a masas.

Al escoger solventes para procesos de extracción se recomienda utilizar solventes con puntos de ebullición bajos.

Probar los extractos de las hojas *Bixa orellana* en el *Streptococcus pyogenes*, dado que por las ya mencionadas limitaciones económicas, de tiempo y estabilidad de las cepas no se pudo llevar a cabo en esta investigación.

Analizar el extracto metanólico de *Bixa orellana* frente a otros microorganismos patógenos.

Realizar estudios a mayor concentración del extracto metanólico de las hojas de *Bixa orellana*.

Continuar las investigaciones acerca de las propiedades de los terpenos y ácidos grasos presentes en las hojas de *Bixa orellana*.

Realizar las extracciones con muestras con hojas secas.

Estudiar otras propiedades de los extractos de las hojas de *Bixa orellana*, como su poder cicatrizante, antifúngico y antioxidante.

Sugerir una forma farmacéutica tópica a partir del extracto de *Bixa orellana* y evaluar sus efectos in vitro e in vivo.

## REFERENCIAS

### Artículos de revistas científicas

Aga, D., Espíritu, R., Shen, C., y Raga, D.D. (2011). A Bioactive Sesquiterpene from *Bixa orellana*. *Journal of Natural Medicine*, Vol. 65, pp. 206-211. Recuperado de Google Scholar. (Consultado el 3 de octubre de 2018).

Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. En *Reduca, Serie Fisiología Vegetal*, vol. 2, pp. 119-120.

Benavides, O. Datos y guía para la recolección de hojas de *Bixa Orellana*. *Ingeniero Forestal. Entrevistador: Brenes, M.* Universidad Internacinal de las Américas. Costa Rica

Camponovo, R. (2002). Problemas de resistencia en *Streptococcus pyogenes*. En *Revista chilena de Infectología*, Vol. 19, pp. 5-6.

Cartaya, O. y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, Vol. 22, no. 2, pp. 5-14. Recuperado en <http://www.redalyc.org>

Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. En *Clin. Microbio. Rev*, Vol. 12, pp. 564-582. Recuperado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515903>

De la C, H., Pérez, L. y Martínez, G. (2010). La *Bixa orellana* L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. En *Revista Cubana de Farmacia*, Vol. 44, pp. 231-244.

Dos Santos, F. (2013). Determinación de los contenidos de bixina y análisis de la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos de las semillas de dos variedades de urucum (*Bixa orellana* L.) en diferentes temperaturas de Aococagem. Brasil. pp. 21-96.

Fernández, A., Mendiola, J., Acuña, D., Scull, R. y Gutiérrez, Y. (2011). Actividad antimalárica de un extracto hidroalcohólico de *Bixa orellana* L. En *Revista Cubana de Medicina Tropical*, Vol. 2, pp. 181-184.

Ferretti, J.J., McShan, W.M., Ajdic, D., Savic, D.J., Savic, G., Lyon, K., Primeaux, C., Sezate S., Suvorov, A.N., Kenton, S., Lai H.S., Lin S.P., Qian, Y., Jia, H.G., Najjar, F.Z., Ren, Q., Zhu, H.,

Song, L., White, J., Yuan, X., Clifton, S.W., Roe, B.A., Mc Laughlin, R. (2010). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. En *Proc Natl Acad Sci*, Vol. 98, pp. 4658-4663. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11296296>

Fleisher, T.C., Ameade, E.P., Mensah, M.L. y Sawyer, I.K. (2003). Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. En *Revista Fitoterapia*, Vol. 74, pp. 136–138.

Gallardo, V., Ceja, J., Arroyo, M., Aureoles, G., Galván, D., Lan, J. (2004). Farmacognosia: Breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. En *Revista Biomédica*, Vol. 15, pp. 123-136. Recuperado de [https://www.academia.edu/15515132/Farmacognosia\\_breve\\_historia\\_de\\_Gallardo\\_2004](https://www.academia.edu/15515132/Farmacognosia_breve_historia_de_Gallardo_2004)

Gérvás, N. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. En *Revista Atención Primaria*, Vol. 25. pp. 589-596.

Giner, R., Máñez, S., Zafra-Polo, M.C., Cortes, D., Ríos, J.L., Terencio, M.C., Blázquez, M.A. (2010). Evaluation Activities in Pharmacognosy. En *Ars Pharm*, vol. 51, pp. 184-1. Recuperado de <https://googlescholar.com/>

Kabara, J., Vrable, R., y Lie, K. (1977). Antimicrobial Lipids: Natural and Synthetic Fatty Acids and Monoglycerides. En *Lipids*, Vol. 12, pp. 753-759.

Huamán, O., Sandoval, M., Béjar, E., Huamán, Z., y Tarazona, V. (2013). Efecto de los extractos acuoso e hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* (achiote) sobre los indicadores no enzimáticos de la hepatotoxicidad por paracetamol, en ratas. En *Anales de la Facultad de Medicina*, Vol. 74 (4), pp. 279-283.

Irobi, O. N. y Anderson, A. (2008) Antimicrobial Activity of Annatto (*Bixa orellana*) Extract, En *International Journal of Pharmacognosy*. DOI: 10.1076/phbi.34.2.87.13201

Jungbluth ,H.(2013) *Química de los Flavonoides, Aislamiento y caracterización de Isoflavonas y su Actividad Biológica*. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Perú

Leal, F. y Michaelangeli, C. (2010). Acerca de la historia, taxonomía, botánica y usos de *bixa orellana*. En *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, vol. 28, pp. 78-86. Recuperado de

<http://revistas.unellez.edu.ve/revista/index.php/ruct/article/view/150/143>

Madaleno, I. (2007). Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. En *Revista Cuadernos Geográficos de la Universidad de Granada*, vol. 41.

Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/>

Medina, F. (2015). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de *Bixa orellana* L. (achiote) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). En *Revista de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas*, Perú.

Miranda, M. (2011). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, vol. 68. párr 2-3.

Nitto, D., Idiazabal, G., Rodríguez, V. y Rossi, G. (2007). Erisipelas de miembros inferiores. *Revista de Flebología y linfología*, Vol. 5, p. 276.

Plaza, M., Ibáñez, E., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy, G., Herrero, M., y Señoráns, F. (2010) *Bioactive compounds from algae. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* V.51: pp. 450-455.

Pérez, R. (2004). Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. En *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, vol. 36, pp. 5-10.

Pérez, S., Cuen, M. y Becerra, R. (2003). El achiote. En *Revistas Biodiversitas*, Vol. 46. pp. 7-11. Recuperado de <http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/>

Silva, M. (2006). Resistencia a antibióticos. En *Revista Latinoamericana*. Vol 48(2), pp. 105-112. Recuperado de <http://www.google scholar.com>

Silva, R., Almeida, C., Chavasco, J., y Chavasco, JK., (2009). Antimycobacterial activity evaluation and MIC determination of liophilized hydroalcoholic extracts of *Bixa orellana* L., Bixaceae. En *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 2, pp. 171-174. Recuperado de : <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200006>

Soloaga, R., Corso, A., Galletti, A., Faccone, D. y Galas, M. (2004). Detección de meticilino resistencia en *Staphylococcus aureus*: Comparación de métodos convencionales y aglutinación con mrsa-Screen latex. En *Revista Argentina de Microbiología*, Vol. 36, pp. 1-7. Recuperado de: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412004000100008](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412004000100008)

Wagner, K.H. y Elmadfa, I., 2003. *Biological relevance of terpenoids*. *Annals of Nutrition and Metabolism* Vol. 47 (3-4), pp. 95-106.

Zampini, I., Cudmani, N., Isla, M. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico resistentes. En *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, Vol. 41, pp. 385-393.

### Fuentes consultadas en línea

Achiote vademecum. (S.f.). Recuperado de: [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/7/jer/censi\\_plant\\_indi/Achiote\\_Vademecum.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/7/jer/censi_plant_indi/Achiote_Vademecum.pdf)

Achiote vademecum. (S.f.). Recuperado de <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps>

Aires, F. (2010). *Streptococcus*. Recuperado de [www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/texto3b.pdf](http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/texto3b.pdf)

Bermejo, et. al. (2012). Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. *Medicina Buenos Aires*, volumen 72, parr 3. Recuperado de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0025-76802012000400002](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802012000400002)

Bixa orellana L. (1753). Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx>

Bixa orellana. (s.f.). Recuperado de <http://www.cnf.gob.mx:8090/snif/portal/libraries>

Bixa orellana. (S.f.) Recuperado de <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/890Bixa%20orellana>

Caballero, E. (2009). *Bacteriología anaeróbica práctica*. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Cea de Amaya, R. (2013). *Célula Inventa Química y Farmacia*. Recuperado de: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>

Central Manchester University Hospitals NHS Foundation Trust. (S.f.). Cellulitis. Recuperado de: <https://www.sciencesource.com/>

Centers for disease control and prevention, (2018). *Streptococcus pyogenes* (group A *Streptococcus*). National Center for Immunization and Respiratory Diseases. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/index.html>

Curtis, K. (2005). *Staphylococcus aureus*. Monmouth University. DOI: 10.13140/RG.2.2.10828.62081

Enciclopedia de la OIT. (2012). *La piel*. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Fisher Scientific. (2018) *Imagen de rotavapor*. Recuperado de <https://www.fishersci.es>

Gamiño, A., Barrios, M., y Cárdenas D. (2009). *Flora normal, probióticos y salud humana*. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Grave, E. (S.f.). *Sarcina Bacteria, LM*. Recuperado de :<https://www.sciencesource.com/>

Jong-wook, L., (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Recuperado de <http://www.who.int/es>

Harris, E. (s.f). Biochemical Facts behind the Definition and Properties of Metabolites. Facultad de Nutrición. California, Florida: Texas A&M University. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/22c7/77dca442d4166a6454032418a81ec4cd2572.pdf>

Khan, Z. (2017). *Group A Streptococcal (GAS) Infections Medication*. Medscape. Recuperado de <https://emedicine.medscape.com>

Kwangshin K. (S.f). *Micrococcus tetragenus*. Recuperado de <https://www.sciencesource.com/archive/Micrococcus-tetragenus-SS2242555.html>

Laurent, A. y Hollard, H. (1828). *Manual de anatomía general*. Recuperado de <https://books.google.co.cr>.

Linnae. (1753). Conabio. Recuperado de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/13-bixac1m.PDF](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/13-bixac1m.PDF)

Litterio, M., Bianchini, H., y Carloni, G. (2005). *Actividad "in vitro" de 10 antimicrobianos frente a bacterias anaerobias*. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Medline Plus. (19 de setiembre, 2018). Infecciones Bacterianas. Recuperado de: <https://medlineplus.gov/spanish/bacterialinfections.html>

Mulvehill, L. (S.f.). *Streptococcus pyogenes*. Recuperado de <https://www.sciencesource.com/CS>

OPS. (2006). *Medicina indígena tradicional y medicina convencional*. Recuperado de <https://www.paho.org/hq/?lang=es>

Ostrooumov, M. (2018). *Espectrometría infrarroja de reflexión en mineralogía avanzada, geomología y arqueometría*. Recuperado de <https://books.google.com>.

Phillips, D. (S.f.). *Staphylococcus aureus*. Recuperado de <https://www.sciencesource.com>

Phillips, D. (S.f.). *Neisseria Gonorrhoeae, TEM*. Recuperado de <https://www.sciencesource.com/archive/Neisseria-Gonorrhoeae--TEM-SS2656769.html>

Sellares, E. y Moraga, F. (S.f.). Infecciones cutáneas bacterianas. Recuperado de <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/infeccionescutaneas.pdf>

Silva, M. (2007). *Staphylococcus aureus. Curso de Microbiología y Parasitología.*, párr. 1-2. Recuperado de <http://7Staphylococcus-aureus.com>

Stohs, S. (2013). Safety and Efficacy of Bixa orellana (Achiote, Annatto) Leaf Extracts. *Creighton University Medical Center*, vol. 28 pp.1-5. DOI: 10.1002/ptr.5088

De La Puerta, Don G., (1869) *Química Orgánica General y Aplicada*. Madrid. Establecimiento Tipográfico de T. Fortanet p.137

Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (s.f) Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En *Revista Temas de Bacteriología y Virología Médica*, pp. 669-671. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>

Textos científicos. (2005). *Hidrocarburos*. Recuperado de <https://www.textoscientificos.com/quimica/hidrocarburos>

Universidad de Ciencias e Ingenierías del Noroeste. (2015). *Especies para restauración*. Recuperado de [http://www.especiesrestauracionuicn.org/data\\_especie.php?sp\\_name=Bixa%20orellana](http://www.especiesrestauracionuicn.org/data_especie.php?sp_name=Bixa%20orellana)

Universidad E.I.A. (2014). Catálogo virtual de flora del Valle de Aburrá. Recuperado de: <http://www.ehorticulture.com/tree-plants-seeds/medicinal-plants/bixa-orellana-detail.html>, 2018.

Universidad Nacional Autónoma de México. (2004). Recuperada de: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met>

Valeant Farmacéutica (S.f.). Fucicort. Recuperado de: <http://mufel.net/plm/prods/38863.htm>

Vignoli, R; Seija, V. (s.f). Principales Mecanismos de resistencia antibiótica. En Revista Temas de Bacteriología y Virología Médica, pp 649-662. Recuperado de: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Principalesmecanismosderesistenciaantibiotica.pdf>

Yong, Y., Zakaria, Z.A., Kadir, A.A., Somchit, M.N., Lian, G.E., y Zuraini, A. (2013). Chemical constituents and antihistamine activity of *Bixa orellana* leaf extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, pp.13:32. doi: 10.1186/1472-6882-13-32.

## **Libros**

Avello, A. y Cisternas, I. (2010). Fitoterapia: sus orígenes, características y situación en Chile. En *Revista Médica de Chile*, Vol. 13, p. 2.

Barros, D. y Domínguez, L. (2013). *Identificación preliminar de los fitoconstituyentes y cuantificación de flavonoides totales en las hojas de Bixa orellana (achiote)*. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.

Bello, J. (2000). *Ciencia Bromatológica*, Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.

Bussmann, R. y Sharon, D. (2015). *Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia. La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú*. Perú, Centro William L. Brown - Jardín Botánico de Missouri. pp. 10-50.

Chateaneuf, R. y Benavides, M. (2016). *Plantas Medicinales y Medicina Natural*. Santiago, Chile: Ocho Libros Editores Ltda.

Chizmar, L. y Correa, M. (2009). *Plantas de uso folclórico y tradicional en Panamá*. Heredia: Instituto Nacional de Biodiversidad.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical Laboratory Standards Institute. 27th Ed., pp. 56-63.

Cole, C. y Gazewood, J. (2007) *Diagnosis and Treatment of Impetigo*. Charlottesville, Estados Unidos: University of Virginia, School of Medicine, p.860.

Costa, J., Cervera, M., Cunill, F., Esplugas, S., Mans C. y Mata, J. (1991). *Curso de Ingeniería química: introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte*. Barcelona, Editorial Reverté. pp. 69-70.

Cruz, A. (2001). *Antibióticos Naturales*, México, Selector.

Dupont, H. y Gokel, W. (1985). *Química orgánica experimental*. Puerto Rico. Editorial Reverté

Fonnegra, R. y Jiménez, S. (1999). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín, Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.

García, M., Gavilanes, J., Martínez, A., Montero, F., Oñaderra, M. y Vivanco, F. (1999). *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*. España: Síntesis.

Guamán, B. y Viteri, J.A. (2018). *Efecto antifúngico del extracto metanólico de las hojas de achiote (Bixa orellana L.) sobre láminas de acrílico contaminadas de Candida albicans, estudio in vitro*. Quito, Ecuador: Editorial de la Universidad Central del Ecuador.

Hernández, A. (2013). *Farmacología general*. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana

Marcano, D y Hasewaga, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela. Editorial Torino, pp. 38-100.

Medina, A. (2000). *Guía de Antimicorbianos y tratamiento de las infecciones*, España: Editorial Díaz de Santos.

Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquía. pp. 27-29.

Organización Panamericana de la Salud. (2013). *Fitoterapia*. Recuperado de <https://www.paho.org/>

Muñoz, C., Grau, M. (2013). *Ingeniería Química*, San José, Universidad Internacional a Distancia.

Nonhebel, G. y Moss, A. (2002). *El Secado de Sólidos en la Industria Química*. Argentina: Editorial Reverté, p.333.

Pavia, Kriz, Lampman, y Engel. (1998). *Introduction to Laboratories Techniques*. Orlando, Florida: Harcourt Collegue Publishers.

Pírez, M y Mota, M. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Universidad de la República, Uruguay: Oficina del Libro, FEFMUR.

Pous, R. (2010). *Nociones de infectología*. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Prats, G. (2007). *Microbiología Clínica*, España, Editorial Médica Panamericana, p. 17.

Ramos, J. (2012). *Infectología clínica*. Editorial El Manual Moderno (2a. ed.). México, D.F. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com>

Ríos, M. y Muñoz, E. (2013). *Ingeniería Química*, Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.

Rodríguez, E. (1999). *Medicina Natural: el Retorno a nuestra esencia*. San Juan, Puerto Rico: Editorial de la Universidad de Puerto Rico

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: CYTED.

Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D. y Morante, S. (2010). *Análisis instrumental: algunas herramientas de enseñanza-aprendizaje*. España: Netbiblo.

Smith, T. y Babcock, H. (2010). *Streptococcus (group A)*. New York, NY: Chelsea House. Recuperado de <https://www.scribd.com>

Vanaclocha, B. y Cañigüeral, S.(2003). *Fitoterapia Vademécum de Prescripción*. España. Editorial Masson. pp 30-37

Velásquez, A., Lorenzo, T., Moreno, H., Seza, P., Lizasoian, R. y Moro, T. (2008) *Farmacología Básica y Clínica*, 18° ed., Editorial Panamericana.

Zagrheca, S.L. (2007). *Libro Blanco de los herbolarios y las plantas medicinales*. España: Fundación Salud y Naturaleza.

### **Tesis y trabajos de graduación**

Acevedo, L., (2015). *Estudio farmacognóstico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Bixa orellana (achiote) proveniente del distrito de Usquil, provincia de Otuzco, región la libertad*. Tesis de bachillerato en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional De La Amazonía Peruana. Perú

Barrios, M., (2012). *Características Epidemiológicas, Clínicas y Microbiológicas de las Infecciones por Staphylococcus Aureus adquirido en la Comunidad en pediatría*. Tesis doctoral en pediatría. Universidad Complutense De Madrid. España

Colina, A.C. (2016). *Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “Muehlenbeckia hastulata (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco)*. Tesis para optar por el título de licenciada en Química en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Guamán, B. (2018). *Efecto antifúngico del extracto metanólico de las hojas de achiote (Bixa orellana l.) sobre láminas de acrílico contaminadas de candida albicans. Estudio in vitro*. Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Odontóloga. Carrera de Odontología. Quito: UCE

Melgar, L.M. y Molina, L.M. (2013). Efecto protector de un extracto acuoso de hojas de Bixa orellana vs misoprostol en un modelo de úlceras gástricas inducidas por indometacina en ratones. Protocolo de investigación para optar por el título de Doctor en Medicina, de la Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador.

## ANEXOS

San José, Costa Rica.  
Año 2018.  
A quien Interese

-Por medio de la presente, yo Oscar Enrique Benavides Mora, con numero de cedula 1-1391-0187, Ingeniero forestal colegiado 7620, hago constar que la señorita María Teresa Brenes Mata con numero de cedula 1-1389-0042, utilizo hojas de Achiotte (*Bixa orellana* L), para la tesis "Análisis comparativo de la actividad microbiológica de los extractos acuoso y metanólico de las hojas de *Bixa Orellana* y su evaluación in vitro frente a cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes". Para optar por el grado de licenciatura en farmacia en la Universidad internacional de las Américas.



---

Oscar Enrique Benavides Mora  
Ing Forestal  
Colegiado



Prelab S.A.  
 Cédula jurídica: 3-10-1-03343  
 Tibás, Costa Rica, frente a Plywood Park  
 Tels: (506) 2997-2900/ 2997-2900/ 2940-4719  
 Fax: (506) 2297-1209  
 Página web: www.prelab.com

San José, 19 de noviembre del 2018  
 Ref: 18-1702

Srita. María Teresa Brenes  
 Estudiante de Farmacia U.I.A.

Estimada María Teresa:

Con respecto a su solicitud para la importación de la cepa liofilizada de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, Culti-Loop R 4607000 (Thermo Fisher Scientific), me permito indicarle lo siguiente:

- 1- Este producto requiere, para ser importado, contar con el registro respectivo ante el Ministerio de Salud como Equipo y Material Biomédico EMB.
- 2- El proceso de importación de este microorganismo tarda, en el mejor de los casos, cerca de 2 meses, siempre y cuando el fabricante lo tenga a disposición. En algunas oportunidades, su importación podría tomar hasta 4 o más meses.
- 3- El costo de esta cepa es elevado, y se encarece más al ser considerada un producto peligroso por las compañías aéreas las cuales cobran USD 80,00 por su transporte.

Atentamente,



Dr. Edgar Salgado León  
 Prelab, S.A.

---

Prelab, San José, Costa Rica  
 Avdo. Prent 1380-1-00, Tibás, Costa Rica