

UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

Efecto biológico de *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) frente a bacterias asociadas a enfermedades infecciosas

PRESENTA

MARIO ALBERTO HERNÁNDEZ AGUILANDO

DIRECTORA

DRA. LORENA MERCEDES LUNA CAZÁRES

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNICACH

ASESORA

DRA. MARÍA DE LOURDES GÓMEZ TOLOSA

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. UNICACH

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Octubre de 2025



UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL

DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas
Fecha: 1 de octubre de 2025

C. **Mario Alberto Hernández Aguilando**

Pasante del Programa Educativo de: **Licenciatura en Biología**

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

**Efecto biológico de *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae) frente a bacterias
asociadas a enfermedades infecciosas**

En la modalidad de: **Tesis Profesional**

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

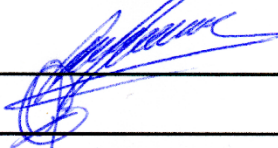
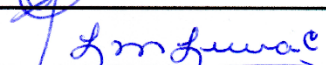
Revisores

Dra. Sandra Aurora González Sánchez

Dra. Christian Anabí Riley Saldaña

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres

Firmas:

Agradecimientos

A la Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres, por brindarme la confianza desde el primer día para trabajar con ella, por su tiempo y paciencia en cada revisión, por el apoyo y los consejos otorgados en este tiempo y por todos los aprendizajes obtenidos, siendo una increíble mentora para mí. Ha sido un placer trabajar con usted y le tengo mucho cariño, respeto y admiración.

A mi asesora de tesis, la Dra. María de Lourdes Gómez Tolosa por el tiempo, paciencia, y sugerencias para enriquecer este proyecto, y sobre todo por la confianza que me ofreció para completarlo.

Al Dr. Sergio López Mendoza, por su apoyo y recomendaciones realizadas. Gracias por recibirme con amabilidad en el laboratorio.

A la Dra. Sandra Aurora González Sánchez, por su tiempo y dedicación en la revisión de este documento. Agradezco la fortuna de haber sido su alumno y aprender de usted, por su confianza y por ser una figura clave en mi formación.

A la Dra. Christian Anabí Riley Saldaña, por dedicar tiempo en la revisión del presente y por sus aportaciones para enriquecerlo. Gracias por la confianza y apoyo al haber sido su alumno.

A la Mtra. Cecilia Guadalupe Hernández Tondopó, técnica académica del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, por el apoyo que me brindó desde el primer momento en cada una de las actividades a realizar, por su disponibilidad y paciencia. Gracias por la confianza y amistad brindada, y por alentarme a dar lo mejor de mí.

A cada una de las y los docentes que tuve la fortuna de conocer, por la confianza puesta en mí y por motivarme a ser un mejor estudiante, principalmente la Dra. Clara Luz Miceli Méndez y el Biól. Manuel Martínez Meléndez, quienes siempre me mostraron su confianza y se convirtieron en un referente para mí.

También agradezco a él y las técnicas académicas de los laboratorios de docencia, por su apoyo y confianza para trabajar en los laboratorios de docencia, y a la Sra. Clara L. Álvarez Morales, quien siempre me saludaba con una sonrisa por las mañanas y me transmitía entusiasmo.

El apoyo de cada una y uno de ustedes se encuentra plasmado en este proyecto, y estoy totalmente agradecido por eso.

*Esta tesis es parte del proyecto denominado **Plantas medicinales y su efecto sobre microorganismos causantes de infecciones** que se realiza en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal.*

Dedicatorias

A Dios...

Por permitirme culminar mi etapa universitaria, llenarme de sabiduría y protegerme a mí y a mi familia durante el proceso.

A mi familia...

Por ser mi punto de partida y de retorno.

*A mis padres, **Griselda** y **Mario**, quienes son mi más grande fuente de inspiración y a quienes les debo todo lo que soy. De ustedes aprendí que con sacrificios, disciplina y humildad puedo lograr cualquier objetivo y que soy capaz de superar cualquier obstáculo. Estoy muy orgulloso y agradecido con Dios de haber sido guiado en la vida por ustedes.*

*A mis hermanas, **Violeta** y **Mariam**, por ser mi ejemplo a seguir desde pequeño, por motivarme a dar lo mejor de mí y por no dejarme solo a pesar de la distancia. Me siento muy bendecido por haber crecido con las grandes mujeres que son. Gracias por ser el ejemplo del amor incondicional que me ha mantenido fuerte durante mucho tiempo.*

*A mi sobrina **Zoe Marié**, con quien desde que era pequeña compartí el amor por los animales y me permitió transmitirle lo poco que sé. Una niña increíble, llena de alegría, que me ha permitido ver el mundo de una forma distinta, de quien aprendo y para quien espero ser un buen ejemplo en su camino.*

*A mis abuelas **Reynalda** e **Irma**, gracias por siempre tenerme en sus oraciones cada que me tocaba emprender de nuevo el viaje, agradezco a Dios por verlas y abrazarlas en cada regreso. A mi abuelo **Everardo** (†), estoy seguro de que habría estado igual de feliz por este logro, bailando y aplaudiendo para mí, gracias por cuidarme y ser la estrella que ilumina mi camino.*

A aquellas y aquellos que siempre mostraron su cariño por mí y estaban pendientes de esta etapa. Gracias por su apoyo y por recordarme lo que soy capaz de lograr.

A mis amigas y amigos...

*A mis amigas: **Andrea Montiel**, por acompañarme en este camino, por escucharme cada que lo necesitaba y por sus palabras de apoyo en los momentos en los que me sentía exhausto; a **Fernanda Antonio**, quien en cada plática lograba hacerme reír y siempre estuvo presente, mostrando su confianza en mí para alcanzar mis objetivos; a **Amor Cuervo** y **Gabriela Vidaña**, por motivarme a lograr esta meta. Agradezco a Dios por ser su amigo, y porque a pesar de la distancia siempre sentí su cariño junto a mí.*

*A **Valeria Barragán Reyes**, quien además de ser mi compañera de clase en estos cuatro años y medio, también fue mi compañera de casa en nuestra etapa de foráneos. Agradezco a la vida por compartir todos esos momentos juntos, por ser mi apoyo en los momentos difíciles, y porque a pesar de la oscuridad que atravesaste seguiste siendo un rayo de luz para mí. Me siento muy feliz y bendecido de ser tu amigo.*

*A **Diana Girón** y **Ángeles Santiago**, quienes también fueron mis compañeras de casa. Hicieron que el tiempo compartido tanto en casa como en la escuela fuera muy alegre, divertido y seguro. Cada momento especial lo tendré siempre conmigo.*

*A **Citlali S. Miceli**, quien desde que la conocí sentí el aura tan cálida que irradiaba. Gracias por tu disposición a siempre ayudar y escuchar. A **Eliza R. Suart**, con quien guardo momentos en donde la ternura que existe en tu corazón quedó plasmada en el mío. Y a **Libertad Abarca**, a quien he admirado por la resiliencia que tiene para lograr sus metas. Gracias por su cariño.*

*Al equipo que me acompañó desde tercer semestre, quienes se convirtieron en grandes amigos y que admiro por su increíble capacidad: **Karla Carpio**, **Esmeralda Estrada** y **Edsel Ventura**, gracias por ser parte de este camino y por todo lo que aprendí de ustedes, por cada salida juntos, por las risas y bromas compartidas, y por ser un lugar seguro para mí. Hicieron que mi etapa universitaria fuera increíble. A **Jhoseline Ruíz**, quien fue una de las primeras personas que me dio la confianza de acercarme a ella, por ayudarme en un momento difícil al iniciar la carrera.*

*A mi amigo **Galo Guerrero**, gracias por tu energía, por siempre motivarme y por acompañarme en los buenos y no tan buenos momentos, agradezco seguir compartiendo tu amistad.*

*A mis demás **compañeras** y **compañeros** de clase que me acompañaron durante este tiempo, quienes se acercaban a mí cuando necesitaban algo, les agradezco por la confianza que tenían en mí y espero haber sido de ayuda en esos momentos.*

*A la familia de aquellas amigas que me abrieron las puertas de su casa, por darme la confianza para entrar a su hogar. **Citlali**, **Karla** y **Diana**, les agradezco por cada día y noche que me cobijaron, y especialmente a **Esmeralda** y a su familia, quienes me recibieron con mucho cariño durante estos últimos meses para poder terminar este proyecto, haciéndome sentir como en casa. Que Dios les llene de bendiciones en todo momento.*

A mis compañeras y compañeros del laboratorio...

*A quienes me acompañaron al iniciar este proyecto, **Andrea Gerardo**, **May-lu Puerto** y **Jorge Noriega**, gracias por enseñarme el lugar de trabajo que compartimos, por su amabilidad y confianza, y por la ayuda brindada en cada momento. Hicieron que la estancia fuera más amena.*

*A la **Biól. Karina E. Pérez**, por su amistad y compañía durante los últimos meses de trabajo, por apoyarme en cada momento que lo necesité, por escucharme y compartirme su conocimiento.*

*Al **Biól. Eric Montoya**, quien también fue un gran apoyo durante este tiempo y de quien aprendí mucho en cada etapa.*

*A las y los integrantes del **Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal**, por hacer de este un lugar agradable, en especial a la **Dra. Claudia A. Durán Ruiz**, técnica académica del mismo, quien contagia de energía en cada momento.*

El cariño recibido por todas y todos ustedes ha dejado una huella en mí, y agradezco a la vida y a Dios por haberlos puesto en mi camino.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Enfermedades infecciosas	3
2.2. Plantas medicinales	5
2.3. Familia Muntingiaceae C. Bayer, M. W. Chase & M. F. Fay.	6
2.3.1. Generalidades	6
2.3.2. Género <i>Muntingia</i> L.	7
2.3.3. Especie en estudio: <i>Muntingia calabura</i> L.	7
2.3.3.1. Generalidades	7
2.3.3.2. Descripción botánica	7
2.3.3.3. Distribución geográfica	9
2.3.3.4. Nombres vernáculos y étnicos	10
2.3.3.5. Usos medicinales	10
2.4. Metabolitos secundarios	11
2.4.1. Generalidades	11
2.4.2. Clasificación	12
2.4.2.1. Alcaloides	12
2.4.2.2. Terpenos	14
2.4.2.3. Glucósidos	18
2.4.2.4. Compuestos fenólicos	21
2.5. Bacterias ensayadas	25
2.5.1. Generalidades	25
2.5.2. Bacterias Grampositivas	27
2.5.2.1. Género <i>Bacillus</i>	28
2.5.2.2. Género <i>Staphylococcus</i>	29
2.5.3. Bacterias Gramnegativas	32
2.5.3.1. Género <i>Escherichia</i>	32

2.5.3.2. Género <i>Salmonella</i>	34
2.5.3.3. Género <i>Shigella</i>	35
2.5.3.4. Género <i>Pseudomonas</i>	37
2.6. Toxicidad	39
2.6.1. Generalidades	39
2.6.2. Ensayo con <i>Artemia salina</i>	40
III. ANTECEDENTES	42
IV. OBJETIVOS	49
4.1. General	49
4.2. Específicos	49
V. ZONA DE RECOLECTA	50
5.1. Fisiografía	51
5.2. Edafología	52
5.3. Hidrografía	52
5.4. Clima	52
5.5. Vegetación	53
5.6. Fauna	54
5.7. Áreas Naturales Protegidas	54
VI. MÉTODOS	55
6.1. Recolecta y registro del material vegetal	55
6.2. Obtención de extractos	55
6.2.1. Extractos orgánicos	55
6.2.2. Extractos acuosos	56
6.3. Identificación de grupos de Metabolitos Secundarios	58
6.4. Ensayos bacterianos	61
6.4.1. Preparación del inóculo microbiano	61
6.4.2. Difusión en agar	63
6.4.3. Porcentaje de inhibición relativa (PIR)	65
6.4.4. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	65
6.5. Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	67
6.6. Diseño y análisis estadístico	69
VII. RESULTADOS	71

7.1. Extractos y sus rendimientos	71
7.2. Grupos de metabolitos secundarios	71
7.2.1. Extractos de hojas	72
7.2.2. Extractos de cortezas de tallos	73
7.3. Actividad antibacteriana	73
7.3.1. Ensayo de difusión en disco	73
7.3.1.1. Bacterias Grampositivas	73
7.3.1.2. Bacterias Gramnegativas	75
7.3.1.3. Respuesta de las bacterias ensayadas frente a <i>M. calabura</i>	78
7.3.1.4. Efecto combinado de la estructura vegetal y la concentración de los extractos	79
7.3.2. Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR).....	85
7.3.2.1. Extractos de hojas.....	85
7.3.2.2. Extractos de cortezas de tallos.....	85
7.3.3. Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM)	86
7.3.3.1. Extractos de hojas.....	86
7.3.3.2. Extractos de cortezas de tallos.....	87
7.4. Efectos de los extractos sobre <i>A. salina</i>	89
7.4.1. Extractos de hojas	89
7.4.2. Extractos de cortezas de tallos	90
VIII. DISCUSIÓN	91
IX. CONCLUSIONES.....	102
X. RECOMENDACIONES	104
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	105
XII. ANEXOS	126

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de terpenos.....	16
Cuadro 2. Clasificación de flavonoides.	23
Cuadro 3. Porcentaje de inhibición relativa producido por los extractos de hojas de <i>M. calabura</i> sobre las bacterias evaluadas.	85
Cuadro 4. Porcentaje de inhibición relativa producido por los extractos de cortezas de tallos de <i>M. calabura</i> sobre las bacterias evaluadas.	86
Cuadro 5. Valores de CIM producidos por los extractos de hojas sobre las bacterias evaluadas.....	87
Cuadro 6. Valores de CIM producidos por los extractos de cortezas de tallos sobre las bacterias evaluadas.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características botánicas de <i>M. calabura</i>	8
Figura 2. Distribución geográfica de <i>M. calabura</i> en México.	9
Figura 3. Ejemplos de alcaloides heterocíclicos.	13
Figura 4. Estructura química de terpenos: mentol y limoneno.	15
Figura 5. Helenalina, lactona sesquiterpénica con acción antimicrobiana.	18
Figura 6. Estructura de la amigdalina (glucósido cianogénico).	19
Figura 7. Estructura química de saponinas.	20
Figura 8. Estructura química del grupo fenol.	21
Figura 9. Estructura química de la flavonona.	23
Figura 10. Estructura química de taninos.	25
Figura 11. Pared celular de bacterias Grampositivas.	27
Figura 12. Morfología de <i>B. subtilis</i>	28
Figura 13. Morfología de bacterias del género <i>Staphylococcus</i>	29
Figura 14. Pared celular de bacterias Gramnegativas.	32
Figura 15. Morfología de <i>E. coli</i>	33
Figura 16. Morfología de <i>S. Typhi</i>	35
Figura 17. Morfología de <i>S. sonnei</i>	36
Figura 18. Morfología de <i>P. aeruginosa</i>	38
Figura 19. Morfología microscópica de <i>A. salina</i>	41
Figura 20. Zona de recolecta de las estructuras vegetales de <i>M. calabura</i>	51
Figura 21. Recolecta de material vegetal y obtención de extractos	57
Figura 22. Pruebas de identificación de grupos de metabolitos secundarios.....	60
Figura 23. Preparación del inóculo microbiano de las bacterias a ensayar	62
Figura 24. Prueba de difusión en disco de las bacterias a evaluar	64
Figura 25. Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM).....	66
Figura 26. Prueba de toxicidad con <i>A. salina</i>	68
Figura 27. Rendimiento de los extractos de <i>M. calabura</i>	71
Figura 28. Grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de hojas de <i>M. calabura</i>	72

Figura 29. Grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de cortezas de tallos de <i>M. calabura</i>	73
Figura 30. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas de <i>M. calabura</i> frente a bacterias Grampositivas.	74
Figura 31. Actividad antibacteriana de los extractos de cortezas de tallos de <i>M. calabura</i> frente a bacterias Grampositivas.....	75
Figura 32. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas de <i>M. calabura</i> frente a bacterias Gramnegativas.	76
Figura 33. Actividad antibacteriana de los extractos de cortezas de tallos de <i>M. calabura</i> frente a bacterias Gramnegativas.	77
Figura 34. Actividad antibacteriana de <i>M. calabura</i> sobre las bacterias ensayadas	78
Figura 35. Actividad de los extractos activos de <i>M. calabura</i> sobre las bacterias inhibidas	79
Figura 36. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de <i>M. calabura</i> sobre <i>B. subtilis</i> ATCC	80
Figura 37. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de <i>M. calabura</i> sobre <i>S. aureus</i> AC	81
Figura 38. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de <i>M. calabura</i> sobre <i>E. coli</i> ATCC	82
Figura 39. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de <i>M. calabura</i> sobre <i>S. Typhi</i> ATCC	83
Figura 40. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de <i>M. calabura</i> sobre <i>S. sonnei</i> ATCC	84
Figura 41. Concentración letal media (CL ₅₀) de los extractos de hojas de <i>M. calabura</i>	89
Figura 42. Concentración letal media (CL ₅₀) de los extractos de cortezas de tallos de <i>M. calabura</i>	90

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas y oportunistas continúan siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo. El uso inadecuado de antibióticos para tratar estas infecciones ha generado resistencia, por lo que investigaciones recientes se han enfocado en conocer el potencial terapéutico de las plantas usadas en la medicina tradicional, ya que poseen compuestos activos con propiedades para atender problemas infecciosos comunes de salud en gran parte de la población humana en muchos países del mundo.

En este estudio se evaluó la actividad biológica de *Muntingia calabura* L., una planta medicinal originaria del Neotrópico con usos variados. Para ello, se analizó el efecto de ocho extractos de hojas y cortezas de tallos sobre bacterias de colección ATCC: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei* y *Pseudomonas aeruginosa*; así como tres provenientes de aislamientos clínicos: *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, se identificaron a los grupos de metabolitos secundarios (MS) presentes en cada extracto y se determinó su toxicidad mediante ensayos con *Artemia salina*.

Se identificaron nueve grupos de MS, destacando los fenoles, glucósidos y lactonas sesquiterpénicas, compuestos posiblemente relacionados con la actividad antibacteriana de la planta, lo que fue evidenciado mediante ensayos de difusión en agar y de concentración inhibitoria mínima (CIM). La inhibición fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) sobre las cepas ATCC de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. Typhi* y *S. sonnei*, así como en *S. aureus* de aislamiento clínico (AC). La especie más sensible fue *S. aureus* AC frente al extracto acuoso de hojas, con halos de 7.7 a 15.7 mm, marcando dosis-dependencia con este extracto y el de acetato de etilo; la CIM fue de 0.313 mg/mL, usando el extracto de acetato de etilo con cortezas de tallos. Finalmente, se demostró que tres extractos de la planta fueron no tóxicos, mientras que cinco de ellos se consideraron moderadamente tóxicos. Estos hallazgos respaldan el uso tradicional de *M. calabura* L. y su potencial en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

Palabras clave: efecto antibacteriano, planta medicinal, productos naturales, toxicidad sobre *Artemia salina*.

ABSTRACT

Infectious diseases caused by pathogenic and opportunistic bacteria continue to be a major cause of morbidity and mortality worldwide. The inappropriate use of antibiotics to treat these infections has generated resistance, so recent research has focused on understanding the therapeutic potential of plants used in traditional medicine, because they contain active compounds with properties to address common infectious health problems in a large part of the human population in many countries of the world.

This study evaluated the biological activity of *Muntingia calabura* L., a medicinal plant native to the Neotropics with varied uses. To do this, the effect of eight extracts of leaves and bark from stems on ATCC collection bacteria was analyzed: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Shigella sonnei* and *Pseudomonas aeruginosa*; as well as three from clinical isolations: *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. In addition, the groups of secondary metabolites (SM) present in each extract were identified and their toxicity was determined by testing with *Artemia salina*.

Nine groups of SM were identified, highlighting phenols, glucosides and sesquiterpene lactones, compounds possibly related to the antibacterial activity of the plant, which was evidenced by agar diffusion tests and minimum inhibitory concentration (MIC). The inhibition was statistically significant ($p < 0.05$) on ATCC strains of *B. subtilis*, *E. coli*, *S. Typhi* and *S. sonnei*, as well as in clinical isolation *S. aureus* (AC). The most sensitive species was *S. aureus* AC versus aqueous extract of leaves, with halos from 7.7 to 15.7 mm, marking dose-dependence with this extract and ethyl acetate; the IMC was 0.313 mg/mL, using ethyl acetate extract with bark of stems. Finally, three plant extracts were found to be non-toxic, while five of them were considered moderately toxic. These findings support the traditional use of *M. calabura* L. and its potential in developing new therapeutic alternatives.

Keywords: antibacterial effect, medicinal plant, natural products, toxicity on *Artemia salina*.

I. INTRODUCCIÓN

Las patologías infecciosas han sido tratadas por el personal de salud con fármacos conocidos como antibióticos, los cuales tienen un valor indiscutible para curar enfermedades de ese tipo. No obstante, el mal uso y abuso de su empleo ha ocasionado un problema mundial de resistencia de los microorganismos que representa un desafío terapéutico en la actualidad, el cual de no combatirse a tiempo puede seguir comprometiendo a futuras generaciones (Medina-Morales *et al.*, 2015; Contreras-Omaña *et al.*, 2021).

Estos padecimientos son muy frecuentes en la actualidad, siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en personas de cualquier edad, en donde las niñas y niños, adultos mayores y personas con un sistema inmunitario débil son los más vulnerables. Son ocasionados por microorganismos patógenos, e incluso oportunistas, como bacterias, hongos o parásitos que invaden fluidos, tejidos o cavidades del organismo, por lo que son consideradas uno de los primeros motivos de consulta médica en México y en el mundo (García-Palomo *et al.*, 2010; Losa, 2021).

Debido a esta problemática, el uso de plantas medicinales para combatir estas infecciones y enfermedades se ha incrementado en los últimos años, llegando a ser un excelente recurso para tratar cualquier tipo de infecciones y enfermedades crónico-degenerativas. Las especies vegetales utilizadas con fines terapéuticos poseen principios activos que en conjunto son los que le otorgan sus propiedades (Ávila-Uribe *et al.*, 2016; Gallegos-Zurita, 2016).

A partir de las plantas usadas en la medicina tradicional se han logrado desarrollar tratamientos que en ocasiones provienen de la época prehispánica, los cuales han utilizado las personas para reducir tanto los síntomas de un problema de salud infeccioso como la enfermedad misma, por lo que en la actualidad las empresas farmacéuticas se han motivado a dirigir sus investigaciones en la diversidad vegetal para descubrir plantas que presentan metabolitos secundarios que puedan ser utilizados en la farmacia para sustituir el uso de antibióticos a los que la mayoría de los microorganismos se han vuelto resistentes (Pabón *et al.*, 2017; Fonnegra, 2023; Frías y Rosales, 2023).

Debido a lo anterior, una de las plantas que ha sido utilizada con fines medicinales de manera empírica es *Muntingia calabura* L., ya que posee diversos efectos benéficos para la salud. Entre sus aplicaciones, las investigaciones de Candelaria y Flota (2018) y el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (2024) han reportado que las infusiones de raíces y flores se emplean para tratar molestias estomacales, así como el uso de hojas para controlar los espasmos, neuralgias e infecciones cutáneas. Sin embargo, es la infusión de la corteza la que tiene mayor reporte de usos, siendo empleada como emoliente y para el tratamiento contra padecimientos digestivos y afecciones broncopulmonares.

Por ello, esta investigación tiene la finalidad de evaluar la actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *M. calabura* frente a bacterias asociadas a enfermedades infecciosas, para lo cual se obtendrán extractos orgánicos y acuosos de hojas y cortezas de tallos con el fin de identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes y determinar la capacidad inhibitoria de estos sobre las bacterias. Además, se determinará la actividad sobre *Artemia salina* para conocer si los extractos pueden provocar toxicidad.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Las enfermedades infecciosas son trastornos de salud causados por bacterias, parásitos u hongos, que tras invadir un huésped, se multiplican e invaden tejidos, fluidos o cavidades del organismo, transformando la manera en la que éste funciona. La interacción puede ser muy variable, ya que depende de factores como las características del microorganismo, la cantidad de inóculo y otros factores relacionados al huésped, especialmente la respuesta inmunitaria (García-Palomo *et al.*, 2010; Jawerth, 2020).

El equilibrio establecido entre los factores de patogenicidad o virulencia del microorganismo, y los factores del huésped representados por su respuesta inmune, determina que se establezca una relación de colonización (en donde el microorganismo vive y se multiplica sin causar daño), una infección latente (cuando se limita por la respuesta inmune), o bien da lugar a la enfermedad. En este sentido, una enfermedad infecciosa es la expresión clínica de la infección, caracterizada por un conjunto de signos y síntomas que surgen tanto del daño causado por el patógeno como de la inflamación producida por el huésped (García-Palomo *et al.*, 2010).

Estas enfermedades representan un problema de salud pública en la actualidad, ya que son una importante causa de morbilidad y mortalidad en personas de cualquier edad, siendo más vulnerables las niñas y niños, adultos mayores y personas inmunodeprimidas. En regiones económicamente desarrolladas, la mayoría de las enfermedades suelen estar causadas por microorganismos pertenecientes a la microbiota normal del huésped, que colonizan principalmente el tracto gastrointestinal, la piel y el tracto genitourinario; cuando se altera el equilibrio huésped-patógeno, se desencadena una infección que provoca alteraciones estructurales en la piel o en las mucosas, disminuyendo las defensas del huésped y facilitando la progresión de la enfermedad (García-Palomo *et al.*, 2010; Losa, 2021).

En regiones con recursos más limitados, las patologías suceden por otras razones, principalmente por la falta de acceso a agua potable y saneamiento, así como una infraestructura médica y farmacéutica deficiente. En este contexto, la mayoría se

transmiten por microorganismos encontrados en agua o alimentos contaminados, de persona a persona por contacto directo, o a través de fómites, es decir, objetos inertes contaminados con materia fecal u otro tipo de fluidos, como saliva, secreciones nasales o sangre (García-Palomo *et al.*, 2010).

Uno de los principales agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas en humanos son las bacterias patógenas, aunque se ha demostrado que algunas oportunistas también se encuentran asociadas a distintos padecimientos, causando complicaciones en pacientes con un sistema inmunitario débil. Entre las principales bacterias causantes de estas infecciones se encuentran: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* o *Campylobacter jejuni*, asociadas comúnmente con cuadros de gastroenteritis, así como *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*, que provocan neumonía, y especies como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, implicadas en toxiinfecciones alimentarias (Morey-León *et al.*, 2020; García-Palomo *et al.*, 2010).

El tratamiento para estas enfermedades depende del diagnóstico y las manifestaciones clínicas del paciente, sin embargo, el uso de antibióticos ha sido fundamental, ya que combaten directamente a las bacterias, reducen su población y previenen distintos tipos de complicaciones. A pesar de esto, en los últimos años el uso indiscriminado e inapropiado de estos fármacos ha conducido a un problema de resistencia bacteriana, por lo que deben ser prescritos de acuerdo con las necesidades del paciente y siguiendo las indicaciones y supervisión del personal de salud (Medina-Morales *et al.*, 2015; Contreras-Omaña *et al.*, 2021; Alpuche-Aranda y Echániz-Avilez, 2024).

Es por ello que para atender los padecimientos que sufren, las comunidades étnicas y campesinas suelen combinar los conocimientos modernos, como el uso de antibióticos, con prácticas tradicionales, realizando preparaciones a base de plantas medicinales consumidas principalmente en forma de té o infusiones por medio de la decocción de las partes duras de las plantas, como cortezas, raíces, rizomas e incluso frutos, aunque también se suelen usar hojas y flores, siendo las hojas la estructura vegetal más utilizada (Consolini, 2023; Lara-Reimers *et al.*, 2023).

2.2. PLANTAS MEDICINALES

Los medicamentos producidos por la industria farmacéutica frecuentemente están fuera del alcance de la mayoría de la población en países en desarrollo, ya que presentan altos costos y dificultad para conseguirlos, por lo que se han buscado nuevas opciones para combatir las distintas infecciones y enfermedades. Una de las alternativas ante esta problemática que ha alcanzado un apogeo y desarrollo inesperado es el uso de plantas medicinales, llegando a ser un excelente recurso para tratar los problemas más frecuentes de salud (López, 2008; Alós, 2014; Fonnegra, 2023).

Las plantas medicinales corresponden a cualquier especie vegetal que posee sustancias utilizadas con fines terapéuticos o principios activos que se utilizan como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. A partir de las plantas medicinales, la medicina tradicional ha logrado desarrollar distintos tratamientos efectivos para reducir la sintomatología y los trastornos asociados a las enfermedades. El uso de estos tratamientos no corresponde a una práctica moderna, pues ha estado presente desde tiempos antiguos remontados a la prehistoria, donde cada una de las culturas ha creado conocimiento sobre las propiedades medicinales de las plantas a través de la búsqueda de medicamentos, aprendiendo por ensayo y error a utilizar los elementos de la naturaleza para curar sus dolencias (Bermúdez *et al.*, 2005; Fonnegra, 2023).

El uso a diferente escala de las plantas medicinales se encuentra relacionado con la cultura de los pueblos, ya que para unos es una práctica permanente, mientras que otros (aún sin excluir las propiedades de estas plantas) optan por usar la medicina formal. De acuerdo con la práctica médica y la experimentación farmacológica, la actividad biológica de una planta no puede explicarse solo por uno de sus compuestos activos, generalmente dichas moléculas son mezclas de compuestos químicos bajo la forma de fitocomplejos, en los que los principios activos se unen a otras moléculas aparentemente inactivas o sustancias adyacentes que les confieren sus propiedades (Frías y Rosales, 2023).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2023), un total de 170 países han comunicado que usan la medicina tradicional, siendo de forma común

en 113 de ellos y en muchos países se comienza a reconocerla e integrarla en sus sistemas de salud, dicho uso implica el consumo directo y/o el empleo de los extractos de diferentes partes de la planta. Por otro lado, los principios activos también se suelen usar para satisfacer estas necesidades, sin embargo, en la mayoría de los casos son desconocidos, por lo que distintos investigadores se han dado a la tarea de identificar a los compuestos con actividad biológica para así aportar mayor conocimiento dentro de este campo, aun cuando la caracterización química de las miles de especies utilizadas en la medicina tradicional es un trabajo que está lejos de completarse (Bermúdez *et al.*, 2005; Sarker *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2017).

En México existe una gran cantidad de plantas medicinales conocidas y utilizadas desde tiempos prehispánicos. Pueden encontrarse a lo largo del país, desde lugares tan populares como los jardines de las más grandes ciudades hasta los traspatios de los hogares, mientras que algunas también se comercializan frescas o secas en puestos de tianguis o en tiendas naturistas (Guzmán *et al.*, 2017).

Entre las familias botánicas que poseen especies con potencial medicinal distribuidas en México, se encuentran las siguientes: Leguminosae Juss., Euphorbiaceae Juss., Asteraceae Giseke, Lamiaceae Martinov, Verbenaceae J. St.-Hil., Rutaceae Juss. y Solanaceae Adams., por lo que su conservación es importante al representar un valioso legado para las nuevas generaciones, así como por su valor incalculable en la exploración de nuevos medicamentos para atender las necesidades de salud del pueblo mexicano (Méndez *et al.*, 2010; Villarreal-Ibarra *et al.*, 2014).

2.3. FAMILIA MUNTINGIACEAE C. BAYER, M. W. CHASE & M. F. FAY.

2.3.1. Generalidades

La familia Muntingiaceae C. Bayer, M. W. Chase & M. F. Fay. es originaria y distribuida de forma natural en la región Neotropical. Es considerada como un posible grupo basal del orden Malvales Juss., perteneciente al grupo de las angiospermas o también conocidas como plantas con flores. Está conformada por tres géneros monotípicos: *Muntingia* L., *Dicraspidia* Standl. y *Neotessmannia* Burret, siendo *Muntingia* el único género con distribución en México. En cuanto a su situación taxonómica, esta familia

se encontraba en controversia porque algunos caracteres que la definen los comparte con otras familias botánicas como Tiliaceae Juss., Flacourtiaceae Rich. ex DC. y Elaeocarpaceae Juss., en donde se habían incluido a sus tres géneros. Posteriormente se propuso que los vínculos más cercanos de esta familia estarían relacionados con Cistaceae Juss. y Dipterocarpaceae Blume (Bayer *et al.*, 1998; Carvajal y Acosta, 2010; Ferrer y Laguna, 2013).

2.3.2. Género *Muntingia* L.

Este género comprende a una sola especie distribuida a lo largo de América tropical y está conformado por árboles o arbustos pubescentes (Calderón, 2002). La ubicación taxonómica del género se encuentra en discusión ya que distintos autores la ubican como miembro de la familia Tiliaceae, aunque otros la consideran como parte de Flacourtiaceae o Elaeocarpaceae. No obstante, el criterio aceptado hoy en día sitúa a *Muntingia* dentro de la familia Muntingiaceae (Bayer *et al.*, 1998).

2.3.3. Especie en estudio: *Muntingia calabura* L.

2.3.3.1. Generalidades

Es una especie arbustiva o arbórea de hasta 12 m de altura, con follaje vistoso, hojas alargadas siempre verdes, flores blancas y frutos rojizos en la madurez, floreciendo y fructificando de manera intermitente a lo largo del año. Es originario de América tropical, habitando en climas semicálidos a cálidos y asociada a la vegetación perturbada de bosques tropicales subcaducifolio, caducifolio y perennifolio, desde el nivel del mar hasta los 1 800 m. Se encuentra a orillas de arroyos permanentes o ríos pequeños, en matorral espinoso, terrenos planos y lomeríos o laderas rocosas, cañadas poco profundas con tolerancia a la sombra y rara vez a las orillas de los canales de riego, afines a suelos arcillosos con grava o franco-arenosos, húmedos, pedregosos o con rocas calcáreas aflorantes (Carvajal y Acosta, 2010; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2024; The World Flora Online, 2024).

2.3.3.2. Descripción botánica

Es un árbol comúnmente pequeño o arbustivo, facultativamente perennifolio de 10-12 m de alto (Figura 1A). El tronco mide de 12-15 cm de diámetro, con corteza lisa, ramas delgadas y pelos simples o glandulosos (Figura 1B). Las hojas son alternas con textura membranacea, cuya lámina es lanceolada a elíptica u oblonga de 4-14 cm de largo y

1.5-4 cm de ancho, acuminadas, con base oblicua, truncada o subcordada y margen serrado. El haz de las hojas es de color verde mientras que el envés es blanco o grisáceo-tomentoso (Figura 1C). Las inflorescencias son supraaxilares, de una o comúnmente dos a tres flores de color blanco, pedicelos de 1-2 cm de largo, cinco sépalos de 5-7 mm de largo con 1.5-3 mm de ancho, y cinco pétalos blancos de 1 cm de largo y ancho, obovados a suborbiculares y con textura delgada (Figura 1D). El fruto es globoso y carnoso, con un diámetro de aproximadamente 1 cm, color rojo brillante en la madurez y epicarpio glabro y granuloso (Figura 1E). Las semillas son numerosas y miden 0.5 mm de largo, con forma subglobosa a elipsoide (Carvajal y Acosta, 2010; Candelaria y Flota, 2018).

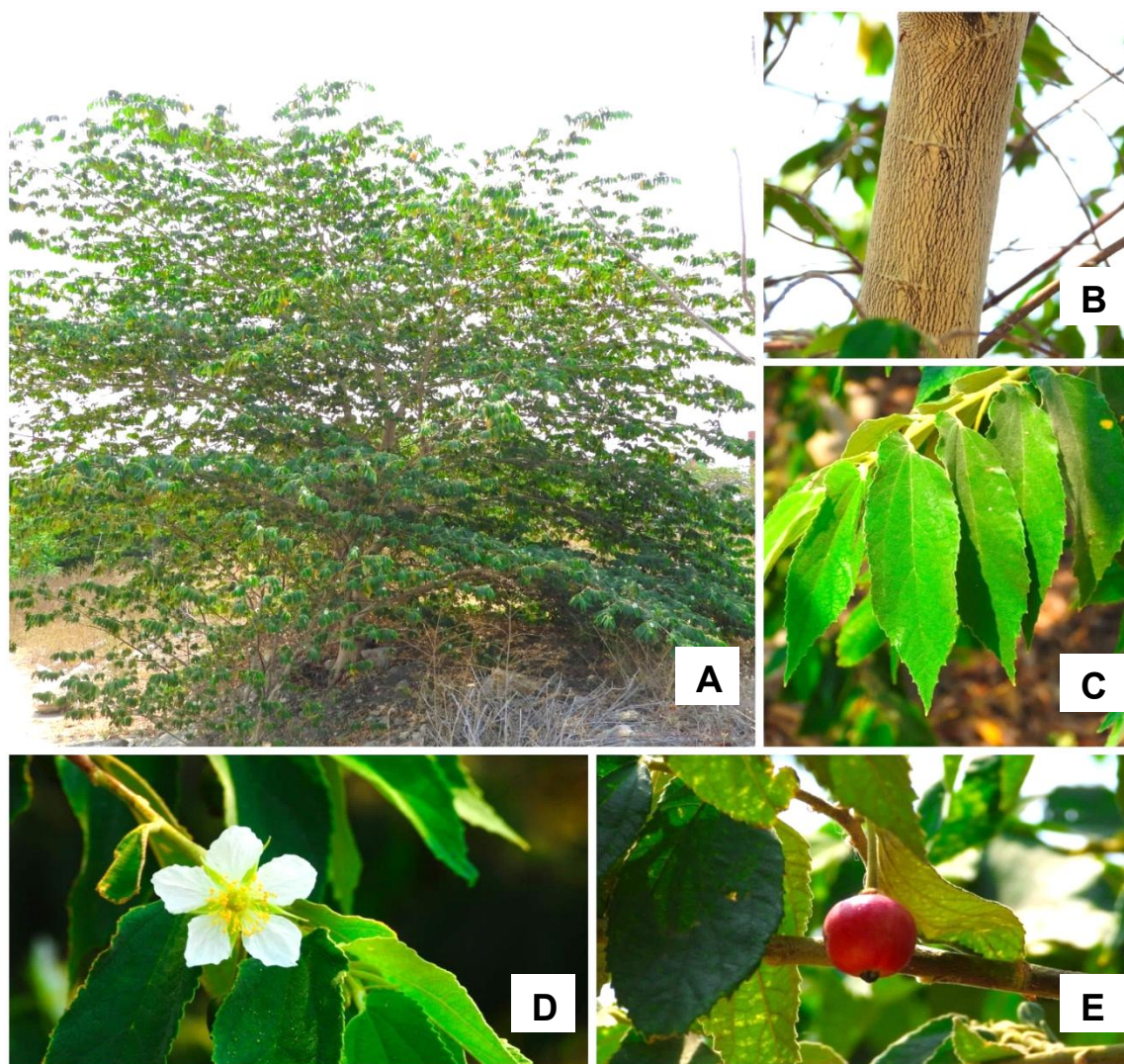


Figura 1. Características botánicas de *M. calabura*. A) Árbol de estudio; B) Corteza de tallos; C) Hoja; D) Flor y E) Fruto. Fotografías: Hernández-Aguilando (2024)

2.3.3.3. Distribución geográfica

Es una especie de la región Neotropical en América, distribuida desde México hasta Brasil, norte de Argentina y las Antillas. En la república, los estados en los que se distribuye corresponden a los del Centro y Sureste, como lo son San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México, Morelos, Puebla, Veracruz, Guerrero, Ciudad de México, Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Figura 2) (Carvajal y Acosta, 2010).



Figura 2. Distribución geográfica de *M. calabura* en México. Fuente: Hernández-Aguilando (2024)

Para el caso de Centroamérica puede observarse en los países de Belice, Costa Rica, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua y Panamá, mientras que en Sudamérica se encuentra en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Su presencia está igualmente reportada en El Caribe, particularmente en Las Bahamas, Cuba, Haití, Jamaica, Puerto Rico, República Dominicana y Trinidad y Tobago (*Idem*).

Esta especie también ha sido introducida y cultivada en Oceanía, Australia, Madagascar y el sureste asiático, incluidos los países de Tailandia, Filipinas, China, Malasia, Indonesia y Singapur, donde se ha expandido de modo artificial como cultivo agroforestal y ornamental, alcanzando relieve como especie invasora (Carvajal y Acosta, 2010; Ferrer y Laguna, 2013).

2.3.3.4. Nombres vernáculos y étnicos

La especie es conocida de distintas maneras alrededor del mundo. De acuerdo con Janick y Paull (2008) y Ferrer y Laguna (2013), en países del Centro y Sur de América recibe los nombres comunes de capulín, cerezo de montaña, teresita, uvilla, puam, calabura, sachacapuli y pau de seda. En otros países se conoce como bois de soil o bois (Francia), jam tree (India y Sri Lanka), bua cheri o kerukup siam (Malasia), cay trung ca (Vietnam), datiles, cereza o manzanita (Filipinas), tarkop farang (Tailandia) y cerri o talok (Indonesia). Adicionalmente, en inglés es conocido como calabur, strawberry tree, jamaican cherry, malayan cherry, Panama cherry y Singapore cherry.

Para el caso de México, Vázquez *et al.* (1999) mencionan que la planta se conoce como capulín, capulincillo, carecillo y huztlán. No obstante, en algunos estados posee algunas variantes, las cuales son: bisilana (Oaxaca), capolín (Tabasco y Chiapas), capolín de mayo (Chiapas), nigua (sur de Veracruz), palmán (Puebla), puan, pus, pua o guinda (sureste de San Luis Potosí) y capulín manso (Veracruz y Oaxaca).

De igual forma, algunos nombres de diferentes lenguas étnicas que recibe son: yaga-bi-ziaa o mbe'e'ze'c (zapoteco), la-in-nó (chontal), ma-lau o manun (chinanteco), puan o puyán (totonaco), cacanicua (tarasco) y was ak (tzeltal) (*Idem*).

2.3.3.5. Usos medicinales

Los usos medicinales de la especie son ampliamente variados, usando prácticamente todas las estructuras de la planta. Entre las aplicaciones que se han reportado se encuentran las infusiones de raíces y flores para combatir molestias estomacales y controlar los espasmos. Por otro lado, las hojas son también recomendadas mediante infusiones para ser usadas como antiespasmódico, para neuralgias, en baños contra el sarampión, urticaria, viruela o para clarificar la vista (Niembro, 1990; Vázquez *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2001; Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2024).

Así mismo, la infusión de la corteza tiene mayor reporte de usos, ya que se emplea como emoliente y se prescribe para el tratamiento contra intoxicación, amenorrea y en padecimientos digestivos como empacho, vómito, diarrea, disentería, dolor de estómago y gastroenteritis, al igual que para afecciones broncopulmonares

asociadas a tos y bronquitis. Además, para fiebres altas se recomienda frotar o bañar al paciente con el mismo preparado. Esta estructura también se ha usado para tratar el algodoncillo frotando con ella el área afectada, mientras que para mordeduras de víbora se aplica la corteza pulverizada, con la que también se prepara un té (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2024).

Por otra parte, Janick y Paull (2008), mencionan que la infusión de la raíz de la planta es usada como antiséptico en Vietnam y como abortivo en Malasia, mientras que la infusión de las flores es usada como solución tranquilizante y tónico en Colombia, o para tratar dolores de muelas en Filipinas, donde también aprovechan sus propiedades antidiarréicas, antiespasmódicas y diaforéticas.

El potencial curativo de estas plantas es ocasionado por una gran variedad de principios activos que producen a través de su metabolismo, variando en concentración en los distintos órganos de las plantas. Los compuestos activos más relevantes son los metabolitos secundarios, a los que se les ha otorgado actividad biológica contra distintos microorganismos, como bacterias y hongos, siendo así responsables de la eficacia de las plantas medicinales para el combate de distintas dolencias y enfermedades (Martínez *et al.*, 2012; Cebrián, 2016).

2.4. METABOLITOS SECUNDARIOS

2.4.1. Generalidades

Los compuestos naturales poseen una gran diversidad y complejidad molecular. Se han agrupado en dos distintos grupos de acuerdo con su origen biosintético: productos del metabolismo primario y productos del metabolismo secundario. Los más abundantes en la naturaleza son los del metabolismo primario, correspondientes a las proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos, mismos que aparecen en todo el reino vegetal y desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de las plantas. Además de estos, las plantas también contienen una gran cantidad de compuestos orgánicos que se encuentran implicados en su crecimiento y desarrollo: los metabolitos secundarios (Acero *et al.*, 2021).

Los metabolitos secundarios (MS) son un grupo de compuestos de bajo peso molecular de gran importancia, responsables del olor, sabor y color de la planta, así

como de sus propiedades medicinales al ser usados como antimicrobianos, para el tratamiento contra el cáncer y para tratar diversos padecimientos. A nivel ecológico participan en procesos de adaptación de las plantas en su ambiente, al igual que en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas y frutos. Además, cuando las plantas se encuentran expuestas a condiciones adversas ocurre una síntesis activa de MS, lo que es inducido por la presencia de herbívoros, el ataque por microorganismos patógenos, la competencia por espacio, luz y nutrientes, la exposición a la luz solar y otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003; Sarker *et al.*, 2006; Taiz y Zeiger, 2006; Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Acero *et al.*, 2021).

Esta clase de compuestos tienen una distribución restringida entre los distintos grupos taxonómicos, por lo que algunos pueden encontrarse en una sola especie vegetal o bien en un grupo de especies relacionadas. La cantidad de MS existentes en una planta depende de diferentes factores, los cuales pueden ser extrínsecos o intrínsecos, de los primeros se considera el clima, la temperatura, la humedad o las condiciones del suelo, mientras que los intrínsecos pueden ser de tipo genético, por interacción con enzimas para transformarse y por variaciones diurnas o estacionales de la especie vegetal (Taiz y Zeiger, 2006; Dueñas, 2009).

2.4.2. Clasificación

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse bajo distintos criterios, ya sea de acuerdo con su estructura, por su ruta biosintética, por los grupos funcionales que posee o por la actividad biológica que cumplen, no obstante, ninguna de estas es exclusiva ni excluyente, por lo que pueden ser ubicados dentro de varios grupos. En este caso, los MS son agrupados en cuatro tipos químicamente diferentes: alcaloides, terpenos, glucósidos y fenoles (Guarnizo y Martínez, 2009).

2.4.2.1. Alcaloides

La mayoría de las plantas contienen compuestos aromáticos nitrogenados llamados alcaloides, que a diferencia de la mayor parte de los metabolitos secundarios son química y biológicamente muy heterogéneos. Constituyen el grupo de sustancias vegetales más representativo, numeroso y diverso, caracterizado por moléculas más

o menos complejas y de carácter básico, lo cual se debe a la presencia de uno o más átomos de nitrógeno que pueden formar un heterociclo (Figura 3). Se describen como cristales amargos, sin olor y generalmente incoloros, que en su forma base son poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos, aunque en forma de sal se vuelven hidrosolubles, solubles en alcoholes e insolubles en disolventes apolares (Salisbury y Ross, 2000; Piñol *et al.*, 2013; Acero *et al.*, 2021; Frías y Rosales, 2023).

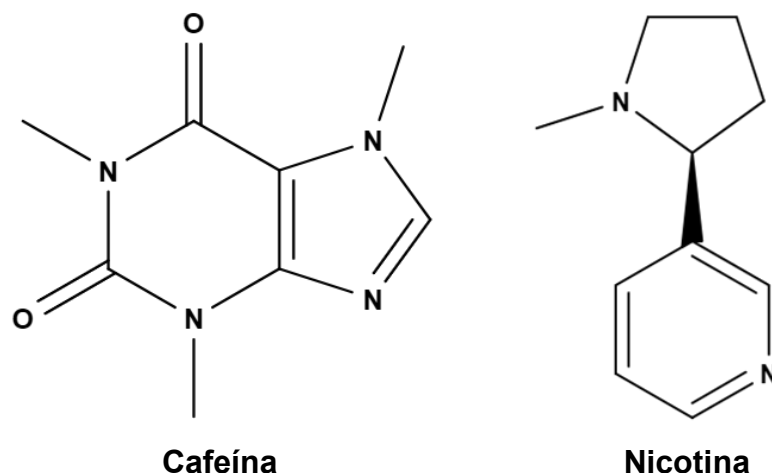


Figura 3. Ejemplos de alcaloides heterocíclicos. Fuente: MolView (2024)

La síntesis de los alcaloides se lleva a cabo a partir de aminoácidos, como la lisina, tirosina y el triptófano, no obstante, el esqueleto carbonado de algunos alcaloides contiene un componente que se deriva de la ruta de los terpenos o de sus derivados inmediatos. En su estado natural se encuentran en todos los órganos de la planta como hojas, flores, frutos, semillas, corteza y raíz. Su distribución se encuentra limitada a algunos grupos taxonómicos, como las angiospermas, donde son abundantes en dicotiledóneas y escasos en monocotiledóneas, mientras que en gimnospermas están disponibles en baja proporción (Salisbury y Ross, 2000; Taiz y Zeiger, 2006).

De acuerdo con Acero *et al.* (2021) y Frías y Rosales (2023), los alcaloides pueden clasificarse en tres tipos: a) alcaloides verdaderos, con el nitrógeno heterocíclico y siempre procedentes de aminoácidos, tales como la estricnina y ajmalina, b) protoalcaloides, correspondiente a aminas simples con carácter básico, nitrógeno no heterocíclico y formados a partir de aminoácidos, destacando la

muscarina, la efedrina y la mezcalina y c) pseudoalcaloides, los cuales tienen propiedades idénticas a los alcaloides verdaderos provenientes de compuestos no aminoácidos, como la aconitina y la tomatidina.

Los efectos terapéuticos de algunos alcaloides han sido demostrados en distintos estudios, donde mencionan el uso de estos como antibacterianos, antiinflamatorios, antivirales, anticancerígenos, analgésicos, antitusivos, antidepresivos, antipiréticos y anticonvulsivos. De igual forma se han citado a otros por sus efectos hepatotóxicos y alucinógenos, o bien por actuar como antifibrilantes, bloqueantes espasmolíticos, neuromusculares, antimaláricos y antineoplásicos (Velu *et al.*, 2018; González-Chavarro *et al.*, 2020; Frías y Rosales, 2023).

Las propiedades antimicrobianas de estos compuestos se han reportado tanto para la inhibición de bacterias como de hongos, por alcaloides como el harman y la harmalina, así como de algunos alcaloides bencilisoquinolínicos a los que se les atribuye mayor efecto contra bacterias, principalmente las Gramnegativas. Por otra parte, algunos alcaloides como la tomatina, solanina, β -solamarina y desacetoxi-solafilidina han mostrado efectos antibacterianos frente a bacterias Grampositivas como *S. aureus*, o sobre Gramnegativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Cuca *et al.*, 2011; Peña, 2011; Soto, 2014).

El mecanismo de acción de estos compuestos nitrogenados es diverso, ya que pueden actuar inhibiendo el metabolismo bacteriano, la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas y la actividad de proteasas funcionales. Por otro lado, también se ha demostrado que pueden dañar la pared celular y la permeabilidad de la membrana, así como a las bombas de expulsión activa, la ADN topoisomerasa y la respiración celular (Domingo y López-Brea, 2003; Yan *et al.*, 2021).

2.4.2.2. Terpenos

Los terpenos, también conocidos como isoprenoides, forman parte de uno de los grupos más abundantes de compuestos secundarios caracterizados por ser insolubles en agua. Sus estructuras pueden ser lineales o cíclicas que poseen enlaces conjugados (Figura 4), los cuales pueden ser excitados por luz o temperatura, por lo que están relacionados con la recepción de estímulos lumínicos o químicos. Los

metabolitos secundarios de este grupo están distribuidos en el reino vegetal localizados en hojas, flores y frutos, así como en tallos, troncos y raíces pero en menor proporción (Taiz y Zeiger, 2006; Piñol *et al.*, 2013; Frías y Rosales, 2023).

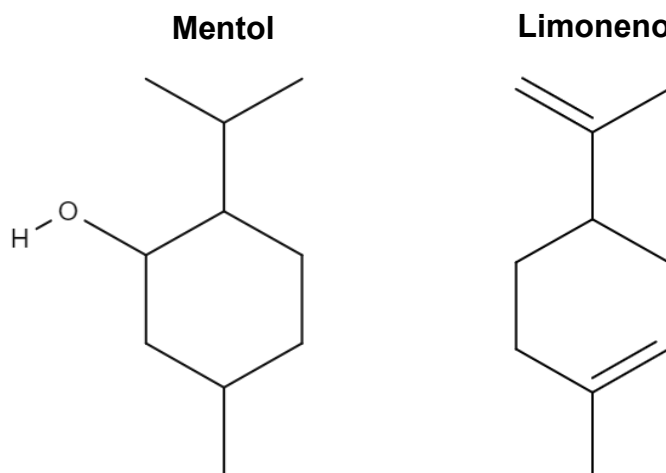


Figura 4. Estructura química de terpenos: mentol y limoneno. Fuente: MolView (2024)

La ruta biosintética de los terpenos es compartimentalizada en las células vegetales, por lo que puede ocurrir en el citoplasma o en el cloroplasto a partir del isopentenil difosfato (C_5H_8), considerado como el isopreno activo. En el citoplasma, la biosíntesis de los terpenos ocurre por la ruta del mevalonato, donde se condensan tres moléculas de acetil-CoA para originar al ácido mevalónico, precursor del isopentenil pirofosfato (IPP). Por otro lado, en los cloroplastos sucede por la vía del metileritritol fosfato, teniendo como precursor al piruvato y el gliceraldehído, cuyo producto después de la condensación también se transforma en IPP. El producto de ambas rutas puede transformarse por isomerización en dimetilalil difosfato (DMAPP) (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009; Piñol *et al.*, 2013).

De acuerdo con Piñol *et al.* (2013) y Frías y Rosales (2023), los terpenos pueden clasificarse según las unidades de isopreno que los componen (Cuadro 1):

Cuadro 1. Clasificación de terpenos

Nombre del terpeno	Unidades de isopreno	Número de carbonos	Ejemplos
Hemiterpenos: grupo más pequeño de terpenoides de característica muy volátil.	1	5 (C_5H_8)	Isopreno, emitido a través de las hojas de la mayoría de los árboles, helechos y plantas tropicales.
Monoterpenos: componentes de las esencias naturales debido a su volatilidad.	2	10 ($C_{10}H_{16}$)	Mentol, limoneno y geraniol.
Sesquiterpenos: presentes en esencias y resinas.	3	15 ($C_{15}H_{24}$)	Farnesol, ácido abscísico y feromonas.
Diterpenos: suelen ser aceites o sólidos a temperatura ambiente.	4	20 ($C_{20}H_{32}$)	Ácidos resínicos y abiéticos de la resina de pino, giberelinas, fitol y fitoquinonas.
Triterpenos: se encuentran como resinas, ésteres o heterósidos.	6	30 ($C_{30}H_{48}$)	Limonoides y esteroides de lanolina.
Tetraterpenos: generalmente pigmentos intensos y liposolubles.	8	40 ($C_{40}H_{64}$)	Carotenos y xantofilas.
Politerpenos: con propiedades elásticas y resistentes a la degradación química.	>8	>40	Libres o unidos a estructuras quinónicas, formando a la plastoquinona y la ubiquinona.

Esta amplia variedad de terpenos ha sido encontrada en casi todas las plantas, siendo de gran interés comercial. A muchos de estos compuestos no se les conoce ninguna actividad biológica, sin embargo, muchos influyen en interacciones con

plantas o animales, de manera que ambas especies sean beneficiadas. En el campo de la farmacia las aplicaciones de los terpenos son variadas, pues se les han atribuido efectos como antibacterianos, analgésicos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales e incluso como inmunoestimulantes (Salisbury y Ross, 2000; Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Según Paduch *et al.* (2007) y Bueno-Sánchez *et al.* (2009), distintos terpenos han sido encontrados activamente contra una gran variedad de microorganismos, estos estudios se han realizado sobre bacterias Grampositivas y Gramnegativas, al igual que en hongos. Debido a las diferencias en la permeabilidad, composición y carga de las estructuras externas, se demostró que las bacterias Grampositivas son más sensibles a los terpenos que las Gramnegativas. Dicho esto, el mecanismo de acción de los terpenos está relacionado con el carácter lipofílico; los monoterpenos, aquellos que poseen mayor uso terapéutico contra bacterias, influyen de manera particular en las estructuras membranales, lo que incrementa la fluidez y permeabilidad de la membrana, cambiando la topología de las proteínas e induciendo alteraciones en la cadena respiratoria. Así mismo, se ha reportado que la actividad antibacteriana de los terpenos está estrechamente relacionada con el número de átomos de carbono en la cadena hidrofóbica de los grupos hidroxilo hidrofílicos.

2.4.2.2.1. Lactonas sesquiterpénicas

Corresponden a un grupo de compuestos pertenecientes a los sesquiterpenos, clasificados según los esqueletos carbocíclicos que forman. Son sustancias incoloras, amargas, relativamente estables y de carácter lipofílico que se encuentran mayormente en hojas y cabezas florales. La función biológica de estos metabolitos en las plantas es diversa, ya que tienen un papel en la protección ante depredadores, así como de señalización para comunicarse con otros organismos dentro de su ecosistema. Presentan actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, antileucémica y citotóxica, además de ser los posibles responsables de alergias cutáneas en el ser humano y de algunos efectos sobre el sistema nervioso central y cardiovascular (Humar *et al.*, 2003; Díaz *et al.*, 2017; Martino y Sülsen, 2019; Frías y Rosales, 2023).

Las lactonas sesquiterpénicas poseen un grupo α -metileno- γ -lactona al que se le adjudica su actividad biológica, el cual en una reacción de alquilación irreversible se adiciona a nucleófilos, grupos sulfhidrilos de enzimas, factores de transcripción y de proteínas. De igual forma, la presencia de grupos funcionales aumenta la reactividad de conjugación de lactonas sesquiterpénicas, influyendo en la actividad antimicrobiana de estos. Algunas de estas moléculas se han identificado como responsables de la actividad antimicrobiana, como la helenalina (Figura 5), presentando inhibición sobre especies de bacterias Grampositivas y Gramnegativas (Amorim *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2017; Martino y Sülsen, 2019).

Helenalina

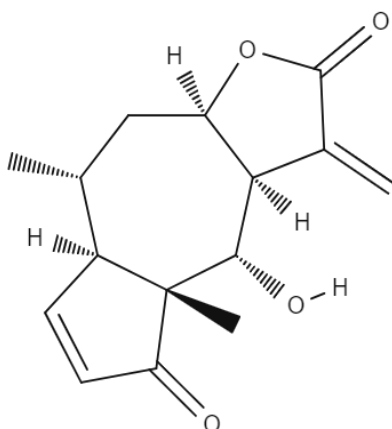


Figura 5. Helenalina, lactona sesquiterpénica con acción antimicrobiana. Fuente: MolView (2024)

2.4.2.3. Glucósidos

Los glucósidos son metabolitos secundarios formados por la condensación de una molécula de azúcar o glicona (principalmente polisacáridos) a un compuesto no glucídico llamado aglicona, caracterizado por un grupo hidroxilo en su estructura. La unión de ambas moléculas ocurre a través del enlace glucosídico, el cual es el que le da el nombre a este grupo de compuestos. La hidrólisis enzimática de los glucósidos produce la formación de glucósidos activos. Son incoloros y de estructura cristalina, formados por carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre y nitrógeno (Doughari, 2012; Velu *et al.*, 2018; Frías y Rosales, 2023).

Los glucósidos también son conocidos como profármacos debido a que la actividad farmacológica se activa cuando la aglicona se separa del azúcar durante la hidrólisis. Existen distintos tipos de glucósidos: a) glucósidos cardíacos, los principales responsables de distintos trastornos del corazón, b) glucósidos de chalcona, usados por su actividad anticancerígena, c) glucósidos antracénicos, utilizados para tratar infecciones en la piel y d) glucósidos cianogénicos, empleados en la industria farmacéutica como agentes aromatizantes (Doughari, 2012; Velu *et al.*, 2018).

Algunos estudios han determinado que los glucósidos cianogénicos como la amigdalina (Figura 6), presentes en diversas plantas, podrían estar relacionados con actividad antimicrobiana principalmente en bacterias Grampositivas aunque también en Gramnegativas. Este mecanismo estaría dado por la inhibición de la pared celular, la síntesis de proteínas y la replicación del ADN (Arauz, 1998; Jaszczak-Wilke *et al.*, 2021).

Amigdalina

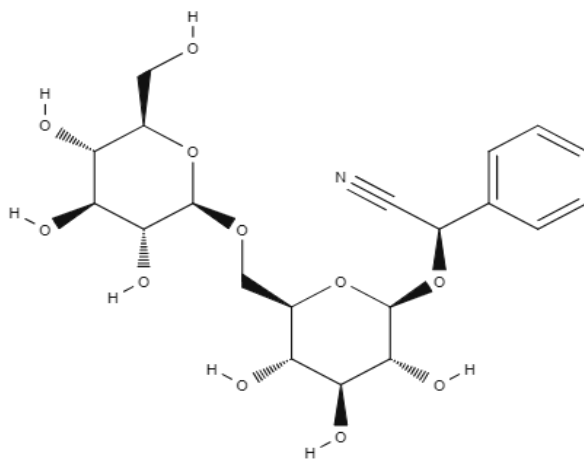


Figura 6. Estructura de la amigdalina (glucósido cianogénico). Fuente: MolView (2024)

2.4.2.3.1. Saponinas

Las saponinas constituyen un amplio grupo de glucósidos distribuidos en plantas terrestres superiores. En su estructura incluyen a un grupo de compuestos que contienen una genina (llamada sapogenina), que puede ser triterpénica o esteroídica (Figura 7). Las sapogeninas triterpénicas son de estructura tetracíclica o pentacíclica, frecuentes en plantas dicotiledóneas, mientras que las esteroídicas poseen una estructura que ha perdido tres átomos de carbono y se encuentran principalmente en

bulbos, raíces y semillas de distintas familias de angiospermas. Ambos tipos de saponinas se originan por la ruta del acetil-CoA, la cual corresponde a la del ácido mevalónico (Acero *et al.*, 2021; Frías y Rosales, 2023).

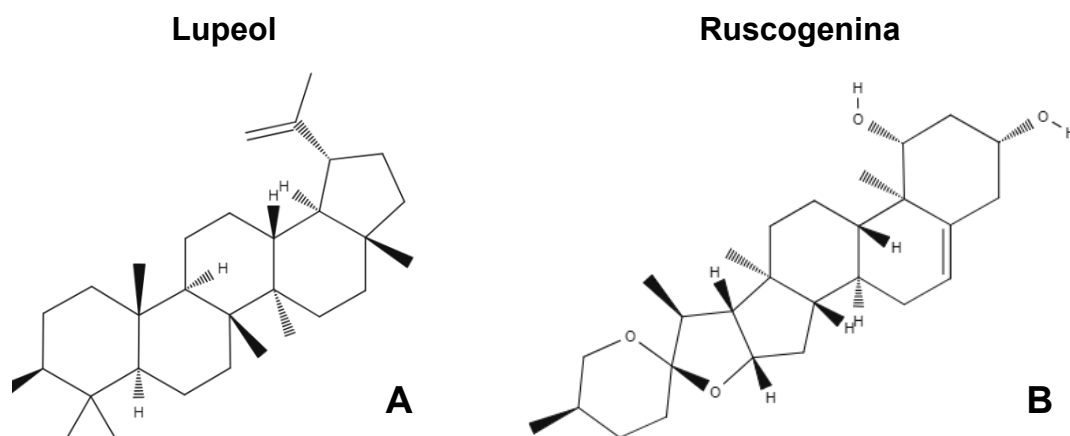


Figura 7. Estructura química de saponinas. A) Lupeol (saponina triterpénica) y B) Ruscogenina (saponina esteroídica). Fuente: MolView (2024)

Las plantas con saponinas han sido empleadas desde la antigüedad como jabones, ya que debido a sus propiedades tensioactivas forman espuma en el agua. Estas moléculas tienen una amplia gama de usos en la industria cosmética y farmacéutica, donde se usan como materias primas para la semisíntesis de productos costosos, como hormonas sexuales de uso clínico. También tienen aplicaciones farmacológicas, por lo que se han usado como antimicrobianos, venenos, hemolíticos, expectorantes, inhibidores de la agregación plaquetaria, insecticidas, antioxidantes, antitumorales, antidiabéticos y antiinflamatorios (Doughari, 2012; Frías y Rosales, 2023).

La actividad antimicrobiana de las saponinas depende de la ramificación de los azúcares, ya que cuando esta pierde un azúcar terminal la cadena de azúcares se vuelve lineal y la saponina pierde dicha propiedad, mientras que para la actividad citotóxica es más relevante el radical ácido carboxílico. El mecanismo de acción de estos compuestos frente a bacterias es a través de la formación de grandes complejos con los esteroides de la membrana celular, lo que produce poros en la membrana que

alteran su permeabilidad y provoca la lisis celular (Díaz, 2009; Alcázar, 2016; Ahumada *et al.*, 2016; López-Sánchez *et al.*, 2022).

2.4.2.4. Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos secundarios que poseen un grupo fenol (Figura 8), los cuales reciben el nombre de compuestos fenólicos. Poseen un anillo aromático al que se unen grupos sustituyentes como hidroxilo, carboxilo, metoxilo y frecuentemente otras estructuras cíclicas no aromáticas. Son solubles en agua y menos solubles en solventes orgánicos no polares. Debido a su estructura química son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas (como ácidos fenólicos) hasta polímeros complejos (como los taninos) y pigmentos llamados flavonoides (Salisbury y Ross, 2000; Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009).

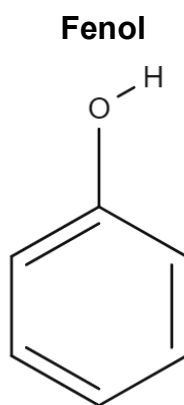


Figura 8. Estructura química del grupo fenol. Fuente: MolView (2024)

Entre ellos, los flavonoides proceden de la participación simultánea de la vía del ácido sikímico y de la malonil-CoA, mientras que otros son mixtos de las rutas del acetato y del mevalonato, o bien del ácido sikímico y del mevalonato. De acuerdo con su origen y complejidad estructural, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en: a) fenoles propiamente dichos, que incluye a los ácidos fenólicos, cetonas polifenólicas y a taninos hidrolizables, b) fenilpropanoides, constituidos por cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos, c) xantonas, estilbenos y quinonas y d) flavonoides, que incluyen a las antocianinas, flavonoides menores, flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados (Acero *et al.*, 2021).

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, desde raíces y tallos hasta flores, frutos y semillas. Son responsables del color de las plantas y de algunos beneficios para la salud, por lo que tienen aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica, ya que contienen moléculas con actividades diversas, entre ellas la antimicrobiana (Abarca-Vargas y Petricevich, 2019).

Entre los ácidos fenólicos de las plantas se encuentra el ácido gálico y ácido elágico, los cuales tienen capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos. El número de grupos hidroxilo y el lugar que ocupan dentro del anillo parece estar relacionado directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de tal manera que un aumento en la hidroxilación provocaría mayor toxicidad; de esta forma, el mecanismo estaría relacionado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (Domingo y López-Brea, 2003; Zambuchini, 2018).

El mecanismo de acción de los fenoles también incluye alteraciones en la pared y membrana bacteriana, o bien por absorción y difusión citoplasmática para afectar las vías metabólicas de síntesis de ácidos grasos e inactivar los sistemas enzimáticos. La actividad efectiva de estos compuestos se ha demostrado mayormente sobre las bacterias Grampositivas que sobre las Gramnegativas (Abud-Blanco *et al.*, 2015; Chacón-Jiménez y Rojas-Jiménez, 2020).

2.4.2.4.1. Flavonoides

Los flavonoides son un tipo de compuestos fenólicos de bajo peso molecular sintetizados a partir de flavononas, cuya estructura incluye dos anillos fenólicos ligados a un anillo heterociclo (Figura 9). Contienen en su estructura química un variable número de grupos hidroxilo fenólicos y propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, por lo que tienen una gran capacidad antioxidante (Dueñas, 2009; Espinosa *et al.*, 2012). Todos los flavonoides se derivan de chalconas provenientes de la vía fenilpropanoide. Aunque esta ruta es conservada en todas las plantas, según la especie pueden aparecer enzimas como las isomerasas, reductasas, hidroxilasas o aquellas que modifican su esqueleto básico, lo cual da lugar a las diferentes clases de flavonoides (Drago, 2007; Frías y Rosales, 2023).

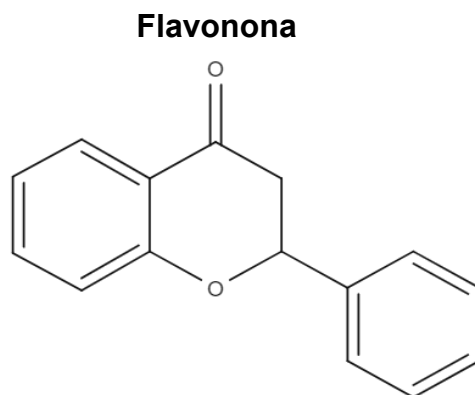


Figura 9. Estructura química de la flavonona. Fuente: MolView (2024)

Según Acero *et al.* (2021), el sistema heterocíclico que contienen los flavonoides es llamado flavano, que conforme a la diferencia en su grado de oxidación se clasifican en (Cuadro 2):

Cuadro 2. Clasificación de flavonoides

Nombre	Descripción	Ejemplos
Antocianinas, antocianos o antocianósidos	Son frecuentemente combinados con azúcares. Confieren el color rojo, rosa, púrpura, azul o violeta a las flores, frutos y hojas de casi todas las angiospermas, así como en algunos musgos, helechos y gimnospermas.	Cianidina, presente en las flores de color rojo.
Flavonoides menores	Derivados reducidos con el esqueleto flavano. Incluyen a todos los flavonoides con distribución natural más restringida.	Las flavanonas y los dihidroflavonoles son de las más conocidas.
Flavonas y flavonoles	Distribuidos de forma glucosilada en pétalos y hojas de plantas superiores.	Los más comunes son el kaenferol, la quercetina y la mircetina.

Los flavonoides son los compuestos fenólicos con mayor actividad biológica, principalmente como antimicrobiano, antiviral, antifúngico, antioxidante, antitumoral, antiinflamatorio, antihipertensivo, captador de radicales libres y hormonal (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Domingo y López-Brea, 2003; Drago, 2007; Escamilla *et al.*, 2009; Frías y Rosales, 2023).

El efecto antimicrobiano está relacionado con la inactivación de enzimas celulares, la cual depende de la relación en la penetración de estos compuestos a la célula del microorganismo o por cambios en la permeabilidad de la membrana. Además, el anillo aromático de los flavonoides puede desempeñar una función en la intercalación o también en el enlace del hidrógeno por el apilamiento de bases de ácidos nucleicos, lo que podría explicar la acción inhibitoria en la síntesis de ADN y ARN. Así mismo, se ha planteado que el mecanismo puede ser por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en función del número de grupos hidroxilo, ya que los flavonoides resultan ser más eficientes desacopladores cuando hay mayor cantidad de estos grupos funcionales (Modak *et al.*, 2002; Simões *et al.*, 2009; Grande-Tovar *et al.*, 2021).

2.4.2.4.2. Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles que contienen un importante número de grupos hidroxilo y otros grupos funcionales capaces de unirse a proteínas y macromoléculas. Al igual que las reacciones clásicas de los fenoles, los taninos tienen la propiedad de precipitar los alcaloides, la gelatina y otras proteínas. Forman parte de las sustancias fenólicas poliméricas que pueden dividirse en hidrolizables y condensados en función de que sean o no hidrolizadas por el calor o por ácidos diluidos. (Domingo y López-Brea, 2003; Porras-Loaiza y López-Malo, 2009; Piñol *et al.*, 2013; Pérez-Ibáñez, 2014).

Los taninos hidrolizables se clasifican en galotaninos (o derivados del ácido gálico, como la glucogalina) y elagitaninos (derivados del ácido elágico), mientras que los taninos condensados tienen como precursores a las moléculas de flavan-3-ol (catequinas) o flavan-3,4-diol (leucoantocianidina) (Figura 10). En las angiospermas y dicotiledóneas son más abundantes los taninos hidrolizables, mientras que los condensados pueden encontrarse tanto en gimnospermas como en angiospermas (Pérez-Ibáñez, 2014; Frías y Rosales, 2023).

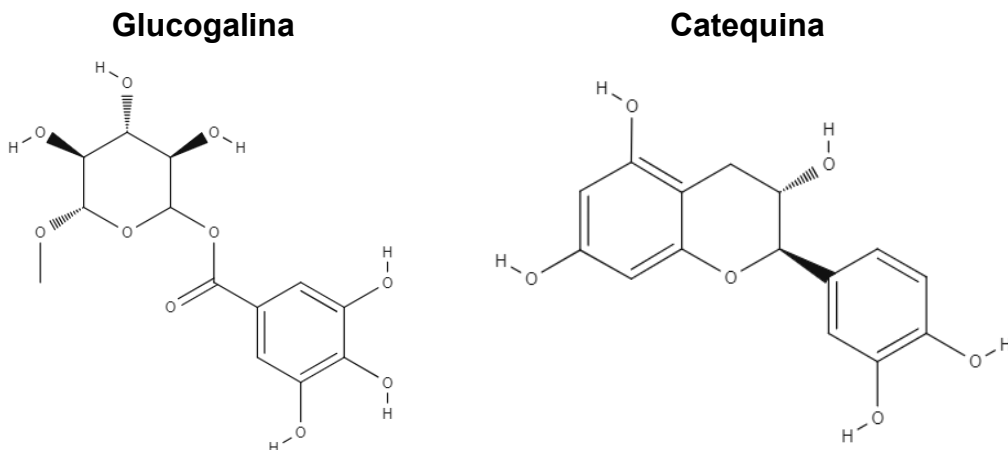


Figura 10. Estructura química de taninos. Fuente: MolView (2024)

La actividad biológica de los taninos está relacionada con su capacidad de unirse a proteínas y combinarse con enzimas. La interacción de los taninos con enzimas les confiere capacidad para emplearse como antimicrobianos, pues forman complejos que alteran la estructura y función de las células bacterianas (Frías y Rosales, 2023).

2.5. BACTERIAS ENSAYADAS

2.5.1. Generalidades

Los microorganismos son un grupo de organismos vivos que incluye a bacterias, hongos (levaduras y mohos), protozoarios y algas microscópicas. Poseen una gran variedad de funciones, ya que la mayoría contribuyen a mantener el equilibrio de los organismos vivos y de las sustancias químicas del planeta. Algunos microorganismos marinos y de agua dulce son parte de la cadena alimentaria de océanos, ríos y lagos, mientras que los presentes en el suelo degradan los residuos e incorporan nitrógeno del aire a los compuestos orgánicos. En el humano son encargados de procesos de digestión en el intestino y de la síntesis de vitaminas que el cuerpo necesita, sin embargo, algunos son patógenos o causantes de enfermedades, por lo que el conocimiento de estos es necesario para la medicina y áreas relacionadas con la salud humana (Tortora *et al.*, 2007; Rivas y Giraldo, 2021).

Uno de los grupos de mayor importancia son las bacterias, que se refiere a microorganismos unicelulares, relativamente simples, que se reproducen a través de

un mecanismo conocido como fisión binaria. Están formadas por un citoplasma envuelto por una membrana, en la que se lleva a cabo la síntesis de proteínas, y una pared celular externa. Esta membrana funciona como barrera de permeabilidad selectiva, regulación osmótica, metabólica y de excreción de enzimas o toxinas, siendo también el lugar de reacciones energéticas de fosforilación oxidativa, síntesis de polímeros para la pared y la diana de acción de muchos antibióticos y detergentes. Sin considerar la membrana celular, las células bacterianas no poseen otras estructuras membranosas, por lo que su material genético, formado por ADN circular de doble cadena, se encuentra fuera de un núcleo verdadero (Prats, 2005; Tortora *et al.*, 2007; Lizarbe, 2009).

En cuanto a su morfología, el tamaño de las bacterias es muy variable, siendo en promedio de 0.2-2 μm de diámetro y de 2-8 μm de largo, aunque algunas pueden medir hasta 40 o 50 μm . Sus formas son reducidas y se pueden agrupar en tres clases: a) cocos, generalmente esféricos, que pueden dividirse y permanecer solitarios o unidos entre sí, ya sea en pares formando diplococos, en cadenas llamadas estreptococos o en grupos denominados estafilococos; b) bacilos, en forma de bastón, que se unen en pares para formar diplobacilos, en largas cadenas llamadas estreptobacilos o en cadenas de bacilos ovalados conocidas como cocobacilos; y c) espirilos, caracterizados por una o más curvaturas, siendo las de aspecto de “bacilos curvos” llamadas vibriones, las de forma helicoidal llamadas espirilos y otras flexibles de forma helicoidal conocidas como espiroquetas (Prats, 2005; Tortora *et al.*, 2007; Montoya, 2008; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

Para las bacterias, el cuerpo humano es un conjunto de factores que les proporcionan calor, humedad y nutrientes necesarios para su desarrollo y supervivencia. Estas han adquirido diferentes características genéticas que les permiten invadir el ambiente, permanecer en él, acceder a las fuentes de nutrientes y evitar respuestas de protección inmunitarias y no inmunitarias del organismo huésped. Además, algunos de los mecanismos que la bacteria usa para sobrevivir implican daños y problemas en el humano, los cuales se conocen como factores de virulencia, mismos que aumentan la capacidad de las bacterias para producir una infección. A

pesar de esto, no todas las bacterias son capaces de producir una enfermedad pero muchas de ellas la causan después de la infección debido su naturaleza patógena (Romero-Cabello *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2021).

Las bacterias se clasifican de acuerdo con la estructura de su pared, la cual está compuesta por peptidoglicanos, conformados por carbohidratos y proteínas. De acuerdo con esto, las Grampositivas se caracterizan por poseer varias capas de peptidoglicanos, mientras que las Gramnegativas tienen una o pocas capas unidas a una membrana de lipopolisacáridos (Pírez y Mota, 2008; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

2.5.2. Bacterias Grampositivas

Estas bacterias se caracterizan por una pared celular compuesta por varias capas de peptidoglicanos que le confieren una estructura gruesa y rígida de 15-80 nm. La pared contiene ácidos teicoicos, compuestos por un alcohol y un grupo fosfato y se pueden dividir en dos clases: ácido lipoteicoico, que incluye la capa de peptidoglicano y está unida a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, que se une solamente a la capa de peptidoglicano (Figura 11). La carga negativa de los ácidos teicoicos, conferida por los grupos fosfato, determinan su unión a cationes que regulen su movimiento hacia el interior y exterior de las células. Estos compuestos pueden contribuir al desarrollo celular para prevenir la ruptura de la pared y con ello la lisis celular (Tortora *et al.*, 2007; Montoya, 2008).

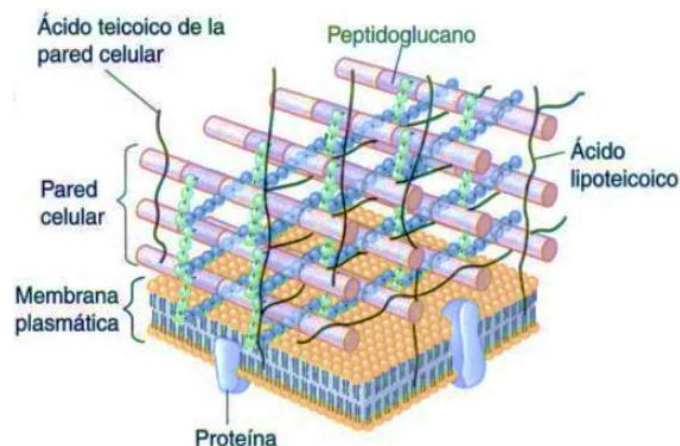


Figura 11. Pared celular de bacterias Grampositivas. Fuente: Tortora *et al.* (2007)

Algunas de las bacterias Grampositivas son causantes de enfermedades en el humano, tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus*

pneumoniae, *S. pyogenes*, *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, entre otras (Zamora-Ramírez y Toro-Huamanchumo, 2021).

2.5.2.1. Género *Bacillus*

Las especies del género *Bacillus* son Grampositivas, forman endosporas y son aerobios estrictos o anaerobios aerotolerantes. La mayoría de aproximadamente 70 especies se encuentran en el suelo y el agua, así como en laboratorios médicos como contaminantes del aire. Los miembros de este género son reconocidos como organismos causantes de intoxicaciones alimentarias al producir enterotoxinas diarreicas, por lo que la ingestión de alimentos contaminados puede representar un riesgo para el desarrollo de brotes (Abdulla y Muyasar, 2012; Nau y Metzgar, 2020).

2.5.2.1.1. *Bacillus subtilis*

Se trata de una procariota Grampositiva de forma bacilar, con un diámetro de 850 nm, generalmente móvil (Figura 12), aerobia y anaerobia facultativa, además de catalasa positiva que degrada el almidón. Su crecimiento óptimo ocurre de 28 a 35° C y tiene la capacidad de formar endosporas. Es ampliamente distribuida en la naturaleza, aislada de una gran variedad de ambientes (Su *et al.*, 2020; González-León *et al.*, 2022).



Figura 12. Morfología de *B. subtilis*. Fuente: NYrture (2025)

Es una bacteria patógena oportunista con características de virulencia bajas. Habita comúnmente en el suelo y con frecuencia puede contaminar alimentos, además de estar ampliamente distribuida en entornos hospitalarios. Su capacidad de formar esporas resistentes le permite soportar condiciones extremas de calor y desecación, lo que favorece su supervivencia en diversos ambientes, generando dificultades para las labores de limpieza y desinfección (Abdulla y Muyassar, 2012).

La transmisión por vía aérea se ha asociado con el desarrollo de un conjunto de síntomas, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, lo que incluye irritación ocular y de los senos paranasales, así como dolor de garganta, dolor de cabeza, fatiga y mareo. Además se han reportado casos de bacteriemia nosocomial en pacientes con enfermedades subyacentes como cáncer y trastornos hematológicos (*Idem*).

2.5.2.2. Género *Staphylococcus*

Se trata de un género de bacterias Grampositivas que incluye al menos a 40 especies y 25 subespecies. Son de forma esférica agrupadas en racimos, no forman esporas ni estructuras para el desplazamiento o adherencia. Algunas especies en muestras clínicas aparecen como células aisladas, en pares o cadenas cortas. La mayoría tienen un diámetro de 0.5-11 μm , pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno y son capaces de crecer en un medio con alta concentración de sales debido a su halotolerancia. Son un importante grupo de patógenos para el ser humano, originando un amplio número de enfermedades sistémicas, infecciones de la piel, partes blandas, huesos, aparato genitourinario e infecciones oportunistas. Las especies de importancia médica son *S. aureus* (Figura 13A) y *S. epidermidis* (Figura 13B), siendo la primera de estas la más importante (Pahissa, 2009; Romero-Cabello *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2021).

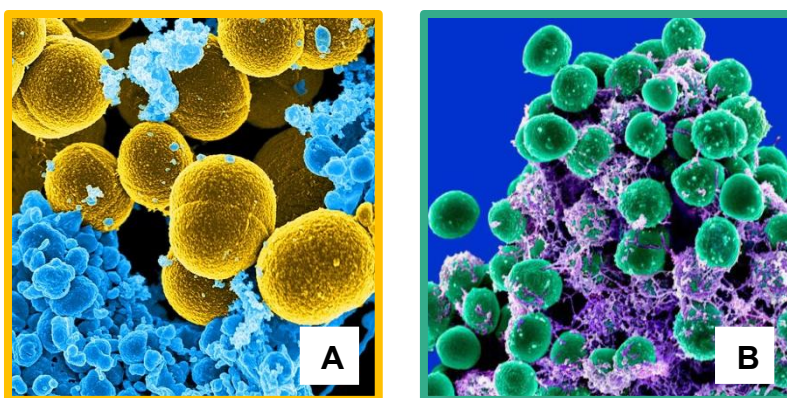


Figura 13. Morfología de bacterias del género *Staphylococcus*. Fuente: Public Health Image Library (2024)

La mayoría de las especies tienen la capacidad de producir catalasa, que es una enzima que permite desdoblar el peróxido de hidrógeno en H_2O y oxígeno libre, característica que es usada para diferenciarlas de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, los cuales no producen esta enzima (Pahissa, 2009).

2.5.2.2.1. *Staphylococcus aureus*

El patógeno más conocido del género es *S. aureus*, caracterizada por ser coagulasa positivo y provisto de una variedad de factores de virulencia con una expresión controlada por la regulación compleja de genes. Mediante la interacción de estos factores y el ambiente, la bacteria puede coordinar la expresión génica para evitar la respuesta inmunológica, ya sea para dañar las células del sistema inmune por medio de toxinas, impedir la opsonización y la fagocitosis, evitar la fijación del complemento y repeler el ataque de proteínas con acción antibiótica (Romero-Cabello *et al.*, 2018; Pasachova *et al.*, 2019).

Es causante de diarrea aguda, acuosa y no complicada a causa de la ingestión de una enterotoxina presente en mayonesas y cremas, implicada también en diarrea postantibiótica. Se dice que una parte de la población es portadora permanente de *S. aureus* en las fosas nasales, aunque también puede colonizar áreas como la piel y el tracto gastrointestinal; cuando se rompe la integridad de las barreras mecánicas, estas bacterias pueden llegar a tejidos más profundos e infectarlos. Esta especie también está implicada en enfermedades cutáneas mediadas por toxinas, artritis séptica, bacteriemia, empiema, endocarditis, osteomielitis y neumonía (Paredes y Roca, 2004; Romero-Cabello *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2021).

De acuerdo con García *et al.* (2003), Pahissa (2009) y Cervantes-García *et al.* (2014), algunas cepas de *S. aureus* producen una capa de polisacáridos llamada biofilm o biopelícula, la cual ayuda a la comunidad bacteriana a adherirse a distintas superficies y colonizar nuevos sitios, además de protegerla de fagocitosis y de antibióticos. Otro componente de esta especie es la cápsula de naturaleza polisacárida implicada en la adherencia de las bacterias a diversas células y en la capacidad antifagocitaria. También produce una serie de enzimas como exoenzimas, proteínas de membrana activas y toxinas involucradas en enfermedades.

Así mismo, es necesario considerar que la meticilina se ha convertido en un indicador de resistencia, ya que cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina también son resistentes a varios antibióticos, por lo que esta cepa se ha convertido en uno de los patógenos causantes de infecciones hospitalarias en el mundo, así como

responsable del surgimiento y diseminación de cepas más virulentas y resistentes de bacterias (Velázquez-Meza, 2005; Cervantes-García *et al.*, 2014; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

Al igual que muchas bacterias, *S. aureus* produce altas concentraciones de β -lactamasas, por lo que el antimicrobiano idóneo para el tratamiento sería aquel resistente a estas enzimas, sin embargo, aquellas cepas resistentes a la meticilina son también resistentes a todos los tipos de betalactámicos, incluyendo a las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, lo que representa emergencia para el combate contra las infecciones por esta bacteria (Miranda, 2011; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

2.5.2.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

Otra de las especies del género es *S. epidermidis*, que a diferencia de *S. aureus* no produce la enzima coagulasa. Esta produce el biofilm a partir del ácido teicoico, lo que le otorga protección contra las defensas del huésped y multirresistencia frente a diversos antimicrobianos, con una alta frecuencia en una patología común como lo es la conjuntivitis bacteriana, así como para colonizar la piel de pacientes hospitalizados y personal de salud. Otra característica de esta bacteria es la susceptibilidad antimicrobiana que tiene, pues ha desarrollado resistencia a la meticilina al igual que *S. aureus* (García *et al.*, 2003; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2005; Ortega-Peña y Franco-Cendejas, 2014).

También está relacionada con padecimientos como bacteriemia, endocarditis, heridas quirúrgicas, infección urinarias e infecciones oportunistas de los catéteres. Se ha comprobado que *S. epidermidis* puede infectar la piel, las mucosas y las heridas, al mismo tiempo que es responsable de infecciones en vías urinarias (Romero-Cabello *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2021).

Dado que *S. epidermidis* es una bacteria de transmisión hospitalaria, tiene una tasa de resistencia alta a múltiples antibióticos como macrólidos, lincosaminas, aminoglicósidos y fluoroquinolonas, mientras que el fármaco con mejor actividad es la vancomicina, no obstante, algunas cepas han disminuido su sensibilidad contra este antibiótico causando un serio problema de salud pública (García *et al.*, 2003).

2.5.3. Bacterias Gramnegativas

La estructura de las bacterias Gramnegativas se base en una o pocas capas de peptidoglucano (de aproximadamente 10-15 nm) y una membrana externa. Al tener una escasa cantidad de peptidoglucano, la pared de estas bacterias es más vulnerable a la ruptura mecánica, así mismo, el peptidoglucano se encuentra unido a lipoproteínas de la membrana externa y está en el periplasma, una sustancia ubicada entre las membranas externa y plasmática, cuyo contenido es una elevada concentración de enzimas degradativas y proteínas de transporte (Figura 14). En cuanto a la membrana externa, esta tiene distintas funciones especializadas, ya que su intensa carga negativa dificulta la fagocitosis y la actividad del complemento, al igual que impide el paso de antibióticos, enzimas digestivas, detergentes, metales pesados, sales biliares y ciertos colorantes (Tortora *et al.*, 2007; Montoya, 2008).

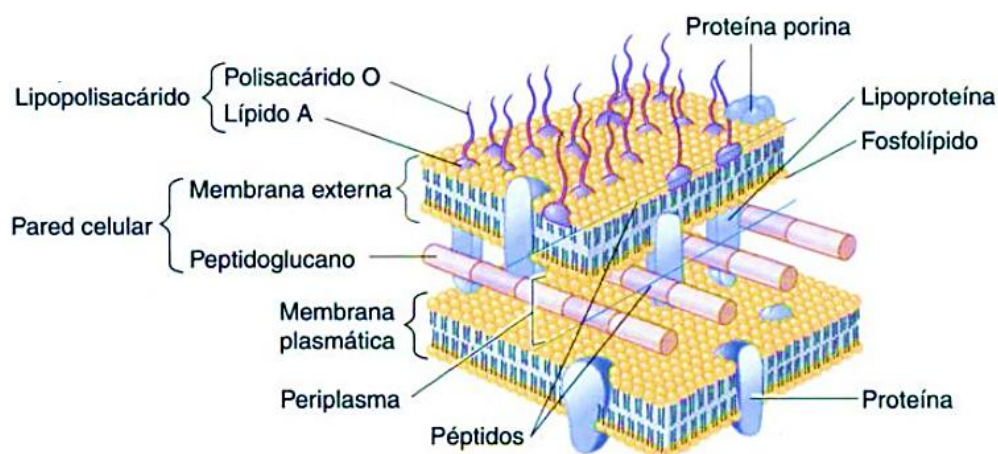


Figura 14. Pared celular de bacterias Gramnegativas. Fuente: Tortora *et al.* (2007)

2.5.3.1. Género *Escherichia*

Es un género de la familia *Enterobacteriaceae* conformado por bacterias Gramnegativas en forma de bacilos, de un tamaño de 2-3 μm , que crecen en medios selectivos. Tienen una cadena de ADN y estructuras móviles como flagelos, fimbrias periféricas en algunas cepas y pili. Son positivo al indol y a la descarboxilasa de lisina, producen manitol y gas a partir de la fermentación de la glucosa, fermentan la lactosa con producción de ácidos y gases, poseen plásmidos responsables de la producción de toxinas y de la resistencia a los antimicrobianos y resisten temperaturas altas que permite diferenciarlas de otros géneros. Además, son saprófitos de la flora aerobia y

anaerobia facultativa del tubo digestivo, su presencia en aguas y alimentos es indicativo de contaminación fecal reciente, por lo que puede crear trastornos gastrointestinales como diarreas debido a la acción de sus antígenos (Prats, 2005; Granados y Villaverde, 1997; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

2.5.3.1.1. *Escherichia coli*

La especie de mayor importancia es *E. coli* (Figura 15), implicada en distintas patologías clínicas. Es considerado parte de la flora normal, sin embargo, hay algunas cepas que pueden ser patógenas y causar daño al colonizar tejidos extraintestinales, produciendo procesos inflamatorios al igual que diferentes cuadros clínicos en los que se incluye la diarrea, bacteriemia e infección del aparato urinario. Además, es la bacteria que más infecciones causa en heridas dentro de los hospitales (Rodríguez-Ángeles, 2002; Romero-Cabello *et al.*, 2018; Murray *et al.*, 2021).

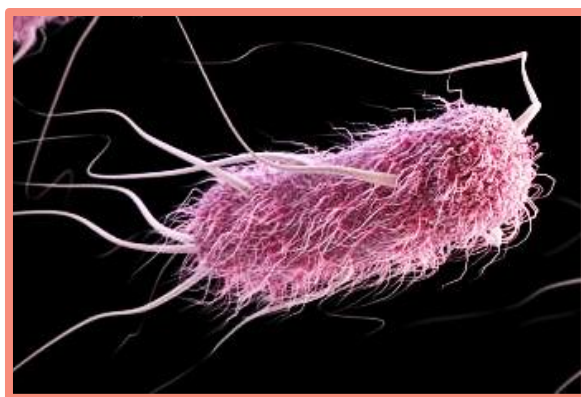


Figura 15. Morfología de *E. coli*. Fuente: Public Health Image Library (2024)

La resistencia de *E. coli* ha aumentado en los últimos años a través de múltiples mecanismos por el uso irracional de antibióticos, tales como los carbapenémicos y betalactámicos. No obstante, en algunos estudios muestra baja resistencia contra cefalexina, gentamicina, kanamicina, ciprofloxacina y nitrofurantoina, así como al cotrimoxazol y ácido nalidíxico en proporciones más bajas (Expósito *et al.*, 2019).

Los patotipos de *E. coli* capaces de producir diarrea son los principales agentes que causan esta afección en niñas y niños. Esta multitud de cepas se debe a la diversidad antigénica de la especie, por tanto, se reconocen seis categorías: *E. coli* enteropatógena típica y atípica (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* enterodifusa (ECDA), *E. coli* enterohemorrágica

(ECEH) y *E. coli* enteroinvasora (ECEI) (Ríos-Muñiz *et al.*, 2019; Martínez-Orgániz *et al.*, 2020; Murray *et al.*, 2021).

2.5.3.2. Género *Salmonella*

El género está conformado por un grupo heterogéneo de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, de forma baciliforme con 2-4 µm de diámetro, no encapsuladas, móviles con flagelos periféricos, fimbrias y pili. Son aerobios o anaerobios facultativos, fermentan glucosa, maltosa y manitol pero no fermentan lactosa ni sacarosa. Se consideran viables en distintas condiciones ambientales, resistiendo tanto bajas como altas temperaturas. La transmisión ocurre por la ruta fecal-oral, directa o indirectamente, o bien a través de alimentos contaminados. Por consiguiente, la infección ocurre por la colonización del intestino humano y de otras especies animales. Algunas de estas bacterias se diseminan fácilmente por la circulación sanguínea, produciendo estados septicémicos graves o el desplazamiento del bacilo hacia otros tejidos u órganos (Barreto *et al.*, 2016; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

La clasificación del género ha sido puesta en discusión ya que algunos estudios de homología del ADN han determinado que el género se conforma por dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*. La primera de estas es la causa más frecuente de diarrea infecciosa en todo el mundo, responsable del 10-50% de las diarreas bacterianas, siendo las aves el reservorio más importante del microorganismo. Estas especies han sido subdivididas en más de 2 500 serovares, como ahora se conocen. El uso de anticuerpos específicos facilita la identificación de los distintos antígenos de la superficie celular bacteriana, lo cual ha permitido distinguir esta variedad de serovares basándose en la inmunorreactividad de dichos antígenos (Paredes y Roca, 2004; Murray *et al.*, 2021; Alfaro-Mora, 2018; Alikhan *et al.*, 2018).

Los serotipos capaces de causar enfermedades pertenecen a *S. enterica* y comparten más del 90% de su ADN, aunque poseen diferencias importantes como el rango de hospederos que infectan y los síntomas clínicos que producen. Algunos serotipos tienen alta especificidad de hospederos y causan enfermedades únicas,

como *S. enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) (Figura 16) que afecta al humano con una enfermedad sistémica llamada fiebre tifoidea (Barreto *et al.*, 2016; Murray *et al.*, 2021).



Figura 16. Morfología de *S. Typhi*. Fuente: Public Health Image Library (2024)

La resistencia de las cepas de *Salmonella* a los antimicrobianos incluye a agentes de primera elección para el tratamiento de las infecciones humanas. Distintos estudios han demostrado que cepas aisladas de humanos son altamente resistentes al ácido nalidíxico, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, doxiciclina, amoxicilina/ácido clavulánico y las sulfas, mientras que esta multirresistencia afecta principalmente a *S. Typhimurium*. Así mismo, otros aislamientos de los serotipos de *Salmonella* fueron resistentes a las cefalosporinas, como la cefotaxima y ceftriaxona (Puig *et al.*, 2011; Kotwitz, 2013; Quesada *et al.*, 2016).

2.5.3.3. Género *Shigella*

Las bacterias del género *Shigella* también forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos Gramnegativos de 1-3 μm de diámetro, inmóviles, no encapsulados ni formadores de esporas. No produce ácido sulfhídrico ni desdobra la urea, reduce los nitratos a nitritos y realiza la fermentación de la glucosa con producción de ácido pero no de gas. Es altamente invasora y habita principalmente en el intestino, siendo el humano su principal reservorio, en especial las niñas y niños de cinco años o menores. La virulencia de las especies es determinada por el antígeno “O” que protege a la bacteria de la acción lítica del complemento y promueve la adherencia y el ingreso de las células al epitelio intestinal. La transmisión es a través de contacto directo o indirecto, con alimentos y líquidos contaminados o heces de personas infectadas (Artieda *et al.*, 2015; Romero-Cabello *et al.*, 2018).

Las especies de este género son los principales agentes patógenos causantes de enfermedad diarreica aguda, que se conoce como shigelosis o disentería bacilar, acompañada de deshidratación y desequilibrio electrolítico. Afecta principalmente a niñas y niños menores, adultos de la tercera edad y personas inmunocomprometidas. La gravedad de la infección y la tasa de mortalidad dependen de distintos factores asociados al hospedero, como la edad, el estado nutricional e inmunológico de la persona, así como del serogrupo y el serotipo de la bacteria (Paredes y Roca, 2004; Bracho *et al.*, 2012; Baca *et al.*, 2014; Vélez *et al.*, 2015).

Se han descrito cuatro especies del género con más de 45 serogrupos basados en el antígeno “O” de la pared celular bacteriana: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. De estas, *S. sonnei* es la principal causa de shigelosis en zonas de mayor urbanización, mientras que *S. flexneri* es frecuente en contextos socioeconómicos más vulnerables. Análisis de ADN han determinado que las cuatro especies son biogrupos de *E. coli* que difieren a nivel serológico, sin embargo, se han conservado sus nombres debido a las diferencias en sus manifestaciones clínicas, la gravedad de la disentería y para evitar confusión (Murray *et al.*, 2021; Guevara *et al.*, 2014; Lopardo *et al.*, 2016).

2.5.3.3.1. *Shigella sonnei*

La especie *S. sonnei* (Figura 17) es la de mayor importancia clínica en el género. Produce infecciones invasivas en el colón y causa una variedad de síntomas, desde diarreas leves hasta la disentería bacilar. Es la causa de un gran número de brotes de gastroenteritis de origen por agua contaminada del suministro público o por contaminación fecal (Godoy *et al.*, 2011; Marcoleta *et al.*, 2013).



Figura 17. Morfología de *S. sonnei*. Fuente: Asociación Catalana de Empresas de Salud Ambiental (2024)

Este bacilo es responsable de la disentería y actualmente se ha incrementado su dominio como agente etiológico de la shigelosis. Algunos estudios han mostrado alta resistencia hacia la ampicilina y al trimetoprima/sulfametoxazol, al igual que al cloranfenicol, tetraciclina y amoxicilina/ácido clavulánico, siendo cada vez más escasas las alternativas terapéuticas. De esta forma, los antibióticos más susceptibles incluyen a la ciprofloxacina y al ácido nalidíxico, aunque este último produce resistencia más rápida y cruzada con fluoroquinolonas. Por otro lado, la ceftazidima (cefalosporina de tercera generación) posee altos niveles de sensibilidad, pero se debe tomar en cuenta que su uso debe ser restringido a infecciones más graves para evitar el incremento de la resistencia a esta generación de antimicrobianos (Baca *et al.*, 2014; Vélez *et al.*, 2015).

2.5.3.4. Género *Pseudomonas*

Este género incluye a microorganismos presentes en materia orgánica en descomposición, vegetación y agua. También se han aislado de ambientes hospitalarios húmedos, como la comida, lavabos, baños, respiradores y equipos de diálisis, incluso en soluciones desinfectantes. Las especies del género son bacilos Gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no productoras de esporas y la mayoría móviles con un flagelo polar o un mechón conformado por 2-3 flagelos, fimbrias y pili. No fermentan azúcares, son oxidasa y catalasa positivo y algunas cepas producen pigmentos hidrosolubles como piocianina (azul), pioverdina (verde), piorrubina (rojo) y piomelanina (negro). Casi todas crecen en agar MacConkey (Romero-Cabello *et al.*, 2018).

Tienen diversos factores estructurales, como enzimas y toxinas, que aumentan su virulencia y las hacen resistentes a los antibióticos. A pesar de su capacidad de proliferar en prácticamente cualquier ambiente y ser fundamentalmente oportunistas, estas bacterias no son microorganismos patógenos frecuentes, sin embargo, la especie *P. aeruginosa* es la de mayor relevancia médica, reportada en infecciones de pacientes inmunodeficientes y asociada con una mortalidad elevada (Pinzón-Junca, 2019; Murray *et al.*, 2021).

2.5.3.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Es un patógeno ubicuo, oportunista y muy persistente en el medio ambiente, principalmente en el agua y suelo, viviendo con necesidades nutricionales mínimas y en diversos medios físicos, así como también en áreas y equipos de hospitales. Cuenta con un flagelo polar que le permite la motilidad (Figura 18). Tiene la capacidad de producir una serie de proteasas y elastasas que son enzimas encargadas de degradar proteínas inmunorreguladoras, el complemento, inmunoglobulinas y péptidos antibacterianos (Lebeque *et al.*, 2006; Paz-Zarza *et al.*, 2019).



Figura 18. Morfología de *P. aeruginosa*. Fuente: Public Health Image Library (2024)

La infección ocurre en distintas etapas: primero la bacteria se adhiere y coloniza, después sucede la invasión y por último la diseminación e infección sistémica. Una vez infectado el organismo, *P. aeruginosa* secreta exotoxinas y enzimas hidrolíticas que al entrar en contacto con los tejidos degrada las membranas celulares y las destruye gradualmente para facilitar su diseminación, la invasión tisular y la necrosis. La gravedad de las infecciones se debe a los factores de virulencia de la especie, asociada a pili o fimbrias, formación de biopelículas y a dichas exotoxinas, proteasas y exoenzimas que dañan el tejido al alterar la estructura del citoesqueleto, por despolimerización de filamentos de actina y por escisión de inmunoglobulinas (Lebeque *et al.*, 2006; Luján, 2014; Espinosa y Esparza, 2021).

Puede alojarse en cualquier tejido u órgano, a través de una herida o quemadura, invadir el oído externo o colonizar las vías urinarias, intestinos, pulmones, endocardio, córnea y huesos. Consecuentemente puede trasladarse al torrente circulatorio y producir septicemias graves e instalarse en otros tejidos, ocasionando

procesos supurativos. Las manifestaciones clínicas también incluyen meningitis, sepsis, bacteriemia, ectima gangrenoso, enterocolitis, neumonía, infecciones cutáneas, otitis, queratitis, entre otras (Romero-Cabello *et al.*, 2018).

Estas bacterias suelen presentar resistencia a los antibióticos, donde la membrana externa juega un papel importante al limitar la penetración de moléculas hidrofílicas pequeñas y excluye a las más grandes, así como por la expresión de bombas de expulsión y mutaciones que modifican el sitio de acción de los antimicrobianos; en casos de resistencia, el paciente al tener las defensas alteradas es incapaz de potenciar la actividad de los fármacos. Algunas cepas sensibles se pueden volver resistentes durante el tratamiento debido a las enzimas que inactivan los antibióticos, como las β -lactamasas, responsables de la resistencia contra penicilina, cefalosporina, cefamicina y aztreonam en algunos casos (Luján, 2014; Murray *et al.*, 2021).

Debido a dicha resistencia que genera *P. aeruginosa* durante el tratamiento con los antibióticos convencionales, se ha propuesto la utilización de fármacos combinados, como penicilinas activas (ticarcilina, mezlocilina, piperacilina) combinadas con un aminoglucósido (gentamicina, tobramicina, amikacina), que actúan de forma sinérgica para combatir con mayor eficacia a la bacteria (Pérez *et al.*, 2006; Bodí y Garnacho, 2007).

2.6. TOXICIDAD

2.6.1. Generalidades

La toxicología es una disciplina que representa una enorme trascendencia en la actualidad debido al amplio número de sustancias químicas que se comercializan y el impacto de estas sobre la salud pública, ya que muchos compuestos bioactivos (como los obtenidos de plantas medicinales) se utilizan para combatir enfermedades. Por tanto, el interés por el uso de estas plantas para obtener nuevos fármacos ha incrementado en respuesta a la variedad y complejidad de sus metabolitos secundarios, los cuales les confieren las propiedades para tratar una amplia gama de afecciones en el organismo, no obstante, es importante considerar la toxicidad que dichos compuestos presentan, ya que así como pueden tener efectos terapéuticos,

también pueden presentar riesgos para la salud si no son utilizados de manera adecuada o en las dosis indicadas (Solari y Ríos, 2009; Ávalos-Soto *et al.*, 2014; Rivas-Morales *et al.*, 2016).

Por tanto, la toxicidad describe los efectos secundarios resultantes de la exposición de un organismo frente a una sustancia que ocasiona daños a nivel celular o molecular. Estos efectos son ocasionados por la interferencia con la estructura, procesos celulares o ambos, como daños a la integridad de la membrana y el citoesqueleto, al metabolismo, a la síntesis y degradación, la regulación iónica e incluso a la división celular, lo cual ocurre en todas las células y es esencial para su funcionamiento, supervivencia y proliferación. Los estudios toxicológicos se basan en la búsqueda de posibles agentes etiológicos implicados en el cuadro clínico de la intoxicación (Solari y Ríos, 2009; Ávalos-Soto *et al.*, 2014; Casado *et al.*, 2016).

Es por ello que conocer la toxicidad que presentan los compuestos químicos resulta relevante, pues un alto porcentaje de la población utiliza las plantas medicinales como recurso primario de salud, y aunque se cree que no producen efectos adversos en el organismo (por ser naturales), algunas de estas sustancias son altamente tóxicas (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

2.6.2. Ensayo con *Artemia salina*

La toxicidad *in vivo* de un organismo animal puede emplearse como un método eficaz para el seguimiento y fraccionamiento en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos. Uno de los métodos ampliamente utilizado es el bioensayo de letalidad con nauplios de crustáceos de *A. salina*, una alternativa poco costosa, sencilla y rápida que genera resultados confiables. Es usado rutinariamente en la investigación fitoquímica, ya que agiliza estudios posteriores que brindan aplicaciones de estos compuestos (Sánchez y Neira, 2005; González *et al.*, 2007).

A. salina es un crustáceo sensible a una amplia variedad de compuestos con actividad biológica y diversas estructuras químicas. Son camarones diminutos de cuerpo blando y transparentes a la luz (Figura 19), distribuidos en todo el mundo en aguas con altas concentraciones de salinidad, creciendo a una temperatura de entre 6-35° C. Se alimentan de algas y bacterias, aunque también son fuente de alimento

para peces, aves e invertebrados. Las hembras producen huevos que en condiciones externas favorables eclosionan en larvas de un tamaño de 1 mm, que al convertirse en adultos después de 6-8 semanas alcanzan en promedio 7 mm de diámetro. Esto ha permitido que se usen en ensayo biológicos, ya que no es necesario mantener la colonia viva permanentemente y las pruebas pueden realizarse en el momento o lugar necesario, además de disponer de un número suficiente de individuos de la misma edad y condiciones fisiológicas (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).



Figura 19. Morfología microscópica de *A. salina*. Fuente: Hillewaert (2010)

El fundamento de este ensayo se basa en la habilidad del extracto o compuesto de ser tóxico contra los nauplios. Inicialmente fue utilizado para la preevaluación de los extractos vegetales, pero sus aplicaciones cada vez han ido incrementando, por lo que ya también es usado para la evaluación preliminar de toxicidad, detección de toxinas fúngicas, metales pesados, pesticidas, ensayo de toxicidad de materiales dentales y recientemente para evaluar fármacos potentes, como los que se aíslan de distintas especies de plantas (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

III. ANTECEDENTES

En el estudio de Zakaria *et al.* (2010) realizado en Malasia, se determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos clorofórmicos, metanólicos y acuosos de hojas de *M. calabura* frente a *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM, ATCC 25923) y *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM, ATCC 33591), así como a las cepas de *Escherichia coli* (35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y hongos de la especie *Candida albicans* (10231) y *Microsporium canis* (ATCC 36299).

Para las pruebas antimicrobianas utilizaron la técnica de microdilución en caldo, iniciando con una concentración de 50 mg/mL, los resultados mostraron que los extractos clorofórmicos y acuosos no presentan efectos inhibitorios significativos sobre ninguna de las cepas, a excepción del extracto clorofórmico sobre SARM, con un valor de 2.5 mg/mL de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM). En cuanto a los extractos metanólicos, estos fueron considerados los más activos, ya que se observó una CIM de 1.25 mg/mL en SASM, mientras que una concentración de 2.5 mg/mL fue eficaz contra SARM.

Por otro lado, la investigación que realizaron Sibi *et al.* (2012) se enfocó en el uso potencial de *M. calabura* contra de patógenos de plantas y de humanos. Para esto se realizaron extractos acuosos y metanólicos usando hojas y cortezas secas, y los análisis fitoquímicos revelaron la presencia de glucósidos y flavonoides como los principales compuestos con actividad biológica. Las pruebas antimicrobianas se realizaron por difusión en agar con extractos diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO, 20%), y se emplearon algunas cepas bacterianas de aislamientos clínicos como *Micrococcus luteus*, *P. aeruginosa* y *Bacillus cereus*, y otras de fitopatógenos como *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp.

Los resultados de la prueba con extractos acuosos de hojas mostraron un diámetro de inhibición de 20 mm para *M. luteus* y 14 mm para *P. aeruginosa*, mientras que con los extractos de las cortezas fueron de 16, 18 y 10 mm para *B. cereus*, *M. luteus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Por otra parte, los extractos metanólicos lograron inhibir a una mayor cantidad de microorganismos, ya que los extractos foliares produjeron una zona de inhibición de 15 mm en *B. cereus*, 25 mm sobre *M. luteus*, 20

mm en *P. aeruginosa*, 13 mm en *A. oryzae*, 30 mm para *Fusarium* sp. y 26 mm frente a *Penicillium* sp., mientras que los extractos de la corteza mostraron halos de 17 mm para *B. cereus*, 22 mm en *M. luteus* y 20 mm para *Fusarium* sp. y para *Penicillium* sp.

Otro estudio fue hecho en Malasia por Sufian *et al.* (2013), quienes analizaron los compuestos antibacterianos de las hojas secas de *M. calabura* extraídos con metanol. La actividad antibacteriana se determinó mediante pruebas de microdilución en caldo para conocer la CIM, iniciando con 50 mg/mL del extracto disuelto en DMSO. Las bacterias utilizadas fueron *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 10536), *S. aureus* sensible a meticilina (SASM, ATCC 25923), *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM, ATCC 33591), *B. cereus* (ATCC 11778) y *B. subtilis* (ATCC 6633). Los resultados indicaron que la actividad antibacteriana de los extractos ocurrió contra SASM y SARM con una CIM de 1.25 y 2.5 mg/mL, respectivamente. En cuanto a las demás bacterias: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* y *B. subtilis*, los valores de la CIM y CBM fueron mayores a 5 mg/mL y no se consideraron resultados significativos.

El perfil de metabolitos bioactivos y actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *M. calabura* también fueron analizados por Cruz *et al.* (2016) realizando extractos de hojas y cortezas de tallos secos con etanol al 95%. Los resultados mostraron abundantes flavonoides y saponinas en los extractos foliares, pero menor abundancia de glucósidos, taninos, esteroides y alcaloides; por su parte, los tallos tuvieron mayor cantidad de saponinas, glucósidos y taninos, mientras que los triterpenos y flavonoides fueron más reducidos. La actividad inhibitoria de cada extracto se evaluó por medio de difusión en disco a una concentración de 10 mg/mL, empleando bacterias como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*, así como el hongo *Candida albicans*. Cabe mencionar que no se especifica la procedencia de las cepas de los microorganismos.

Los extractos foliares mostraron diversos grados de actividad antimicrobiana contra las cinco especies de microorganismos ensayados, con halos de inhibición de 12.3 mm para *E. coli*, de 17 mm para *B. subtilis*, de 18.7 mm sobre *C. albicans*, de 19 mm en *S. typhimurium*, de 20 mm en *P. aeruginosa* y de 37.7 mm en *S. aureus*. Por otro lado, la zona de inhibición con los extractos de tallos fue de 10 mm para *E. coli*,

de 15.7 mm en *P. aeruginosa*, de 16.0 mm sobre *B. subtilis*, de 19 mm en *C. albicans*, de 19 mm en *S. typhimurium* y de 24.7 mm frente a *S. aureus*.

Además, se realizó el ensayo de microdilución en caldo partiendo de una concentración de 10 mg/mL. En bacterias, la CIM fue la misma empleando tanto los extractos de hojas como los de tallos, siendo de 2.5 mg/mL para *P. aeruginosa*, 1.25 mg/mL sobre *S. aureus* y >10 mg/mL para las especies *S. typhimurium* y *B. subtilis*. En el caso de *C. albicans* la CIM fue diferente en ambos casos, puesto que el extracto de hojas inhibió con una concentración ≤ 0.625 mg/mL, mientras que con los tallos fue al emplear 2.5 mg/mL del extracto. Cabe destacar que este ensayo no fue realizado sobre *E. coli* debido a que mostró una actividad mínima en el ensayo de difusión en disco.

Por otra parte, Sekar y Abdul (2017) realizaron un trabajo con extracto de hojas de *M. calabura* y se analizaron sus propiedades antibacterianas para la formulación de una crema. Para ello extrajeron 500 g de hojas maduras maceradas con metanol al 70% durante siete días, investigando la actividad del extracto a concentraciones de 5, 10 y 25 mg/mL contra bacterias Grampositivas (*S. aureus* y *B. cereus*) y Gramnegativas (*E. coli* y *Salmonella enterica*) a través de difusión en agar. No se menciona el origen de las cepas bacterianas empleadas en el estudio.

Los resultados mostraron que un incremento en la concentración del extracto produce una zona de inhibición más significativa. A una concentración de 5 mg/mL se observaron halos de 3.33 mm en *S. aureus*, de 6.03 mm en *B. cereus*, de 9.17 mm en *E. coli* y de 4.07 mm en *S. enterica*. Con 10 mg/mL del extracto, los halos fueron de 4 mm para *S. aureus*, de 12.97 en *B. cereus*, de 14.17 mm en *E. coli* y de 3.67 en *S. enterica*. Por último, a una concentración de 25 mg/mL, los halos fueron de 14.60 mm en *S. aureus*, de 12.5 mm en *B. cereus*, de 14.33 mm en *E. coli* y de 12.53 mm en *S. enterica*. La zona de inhibición del control con vancomicina fue de 16.67-19.57 mm, lo cual permite contrastar los resultados. Además, se realizaron dos formulaciones distintas de la crema, sin embargo, las zonas de inhibición no fueron significativas en comparación con las obtenidas únicamente con el extracto.

El perfil de la actividad antibacteriana de las hojas de *M. calabura* también fue investigado por Desrini *et al.* (2018) en Indonesia. En este estudio, el material vegetal

utilizado se secó al aire, se pulverizó y se realizó la extracción con metanol. Con el extracto obtenido se realizaron pruebas fitoquímicas mediante cromatografía en capa fina, resaltando la presencia de flavonoides, taninos y saponinas. Las pruebas antibacterianas se realizaron sobre *S. aureus* (FNCC 0047), *S. epidermis* (FNCC 0048) y *E. coli* (FNCC 0091), mediante un ensayo de microdilución en caldo con una concentración inicial de 64 mg/mL del extracto diluido en DMSO (10%). Los resultados indicaron que la CIM y CBM en *S. aureus* fue de 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, respectivamente. Para *S. epidermis*, la CIM fue de 1 mg/mL y la CBM fue de 2 mg/mL, mientras que para *E. coli* la CIM fue de 2 mg/mL y la CBM de 4 mg/mL.

Chaudhari *et al.* (2020) realizaron un perfil fitoquímico y antimicrobiano de los extractos de las hojas secas de *M. calabura* obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol, utilizando el equipo Soxhlet y evaporados posteriormente al vacío. El análisis cualitativo identificó en el extracto hexánico a compuestos como flavonoides y terpenos, mientras que en el de acetato de etilo además se encontraron fenoles, no obstante, el extracto metanólico contenía más grupos de compuestos, como alcaloides, flavonoides, fenoles y saponinas. Las pruebas cuantitativas determinaron mayor cantidad de fenoles en el extracto de acetato de etilo, por lo que se seleccionó para la determinación de la actividad antimicrobiana mediante difusión en agar sobre las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli*, además del hongo *C. albicans*. Cabe mencionar que no se indicó la procedencia de las cepas bacterianas utilizadas.

Los resultados mostraron inhibición significativa sobre las tres cepas seleccionadas, a una concentración del extracto de 25, 50 y 100 mg/mL. Para esto, los halos de inhibición con 25 mg/mL del extracto fueron de 10 mm en *K. pneumoniae*, de 9 mm sobre *E. coli* y de 6 mm en *C. albicans*. A una concentración de 50 mg/mL, los halos fueron de 11 mm en *K. pneumoniae*, de 10 mm sobre *E. coli* y de 6 mm sobre *C. albicans*. Finalmente, a una concentración de 100 mg/mL, los halos tenían un diámetro de 12 mm en *K. pneumoniae*, 13 mm en *E. coli* y 8 mm sobre *C. albicans*.

Para comparar los resultados se usaron distintas concentraciones de un control positivo, el cual fue ciprofloxacina para ambas bacterias y fluconazol contra el hongo. La ciprofloxacina a una concentración de 10 µg/mL mostró halos de inhibición de 19

mm en *K. pneumoniae* y de 16 mm en *E. coli*. Empleando 20 µg/mL del antibiótico los halos fueron de 28 mm en *K. pneumoniae* y de 21 mm en *E. coli*. Por último, a una concentración de 30 µg/mL los halos medían 36 mm en *K. pneumoniae* y 28 mm en *E. coli*. Así mismo, *C. albicans* fue inhibida con fluconazol a distintas concentraciones, mostrando halos de 7 mm (10 µg/mL), 19 mm (20 µg/mL) y 13 mm (30 µg/mL).

La investigación de Gurning *et al.* (2021) realizada en Indonesia determinó el perfil fitoquímico y la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de hojas maceradas de *M. calabura*. De acuerdo con las pruebas realizadas, se reportó la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides y terpenoides, además de un contenido total de taninos de 3.275 µg/mL. El extracto obtenido se disolvió en DMSO para obtener concentraciones de 12.5, 25, 50 y 75%, con las cuales se determinó la actividad antibacteriana por difusión en agar contra *E. coli*, *S. typhi* y *Propionibacterium acnes*, usando cloranfenicol como control positivo y DMSO (10%) como negativo. La procedencia de las cepas no fue reportada en el estudio.

Con la concentración de 12.5% se observaron halos de inhibición de 14.18 mm en *E. coli*, de 13.37 mm en *S. typhi* y de 14.13 mm en *P. acnes*. Con el extracto al 25% las zonas de inhibición fueron de 15.53 mm en *E. coli*, de 14.47 mm en *S. typhi* y de 14.60 mm en *P. acnes*. A una concentración del 50% los halos fueron de 15.92 mm para *E. coli*, de 14.97 mm para *S. typhi* y de 15.52 mm en *P. acnes*. Para finalizar, con un porcentaje del 75% del extracto, los halos observados fueron de 16.5 mm en *E. coli*, de 15.5 mm en *S. typhi* y de 16.37 mm en *P. acnes*. De esta forma se demostró que el incremento de la actividad inhibitoria está relacionado con el aumento de la concentración del extracto, por lo que a una concentración del 75% hubo un efecto más eficiente. En cuanto al control positivo con cloranfenicol, se presentaron halos de 30.10 mm sobre *E. coli*, de 25.15 mm en *S. typhi* y de 23.25 mm sobre *P. acnes*.

Un trabajo realizado en Indonesia por Sinaga *et al.* (2022) analizó el contenido de fenoles y flavonoides, así como la actividad antibacteriana del extracto de hojas maceradas con etanol de *M. calabura*. Las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron sobre *E. coli*, *S. aureus* y *S. epidermis* utilizando el método de difusión en agar con el extracto a concentraciones de 12.5, 25, 50 y 75%, así como un control

positivo de cloranfenicol y uno negativo de DMSO (10%). El estudio no proporciona el origen de las cepas bacterianas empleadas.

Los resultados de esta prueba se determinaron de acuerdo con la zona de inhibición observada en las especies inhibidas. Con una concentración del 12.5% se observaron halos de 14.18 mm en *E. coli*, de 12.62 mm en *S. aureus* y de 13.53 mm en *S. epidermidis*; con el 25% del extracto hubo halos de 15.53 mm en *E. coli*, de 13.83 mm en *S. aureus* y de 13.79 mm para *S. epidermidis*; a una concentración del 50% las zonas de inhibición fueron de 15.92 mm para *E. coli*, de 13.87 mm para *S. aureus* y de 14.95 mm en *S. epidermidis*; por último, al 75% los halos fueron de 16.5 mm en *E. coli*, de 14.82 mm en *S. aureus* y de 15.9 mm en *S. epidermidis*. El control positivo con cloranfenicol presentó halos de 31.25 mm en *E. coli*, 33.97 mm sobre *S. aureus* y 30.10 mm sobre *S. epidermidis*, categorizando así a la actividad del extracto como fuerte.

En una investigación en Malasia sobre la fitoquímica y actividad antimicrobiana de *M. calabura* en contra de patógenos, elaborada por Hassan *et al.* (2022), se identificaron los grupos de compuestos químicos de las hojas de la planta, la cual presenta taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides. Así mismo, se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de hojas contra *S. aureus* (ATCC 25923), *S. typhimurium* (ATCC 12228) y *Shigella sonnei* (ATCC 29930) mediante difusión en agar y dilución en caldo, con una concentración inicial de 1 000 mg/mL del extracto en ambos casos. Los resultados marcaron una zona de inhibición media de 14.33 mm en *S. aureus*, seguido de *S. sonnei* con 10.66 mm y sin efecto sobre *S. typhimurium*. En cuanto a los valores de la CIM, se determinó que corresponden a 7.81 y 62.5 mg/mL para *S. aureus* y *S. sonnei*, respectivamente, mientras que los de la CBM fueron de 15.63 y 250 mg/mL, de forma respectiva, inhibiendo completamente a *S. aureus*. Por tanto, la eficacia de las hojas de *M. calabura* al inhibir distintas especies bacterianas ofrece una base para su uso potencial en el desarrollo de productos farmacéuticos con la finalidad de tratar una gran variedad de enfermedades causadas por estos microorganismos.

Finalmente, Chaudhari *et al.* (2022) realizaron una investigación sobre la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos hexánicos, de acetato de etilo

y metanólicos de corteza de *M. calabura* mediante extracción con Soxhlet. El perfil fitoquímico demostró que el extracto hexánico sólo contenía flavonoides, mientras que el de acetato de etilo además presentó alcaloides, fenoles y saponinas, lo que difiere con el metanólico, que contenía flavonoides, terpenos, fenoles y saponinas. El análisis cuantitativo demostró que el mayor contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides se encontraba en el extracto de acetato de etilo, por lo que se empleó para evaluar la actividad antimicrobiana, realizada mediante difusión en agar con concentraciones de 25, 50 y 100 mg/mL de extracto.

Los microorganismos ensayados fueron bacterias Grampositivas de las especies *Streptococcus mutans*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, al igual que bacterias Gramnegativas como *Salmonella bongori*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, y hongos microscópicos de las especies *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Candida albicans*, sin embargo, el estudio no detalla la procedencia de las cepas. La actividad del extracto se presentó únicamente sobre *K. pneumoniae*, *E. coli* y *C. albicans*. Para ello, a una concentración de 25 mg/mL los halos de inhibición fueron de 8 mm para *K. pneumoniae* y *E. coli*, mientras que un diámetro de 6 mm fue para *C. albicans*. Por otro lado, con una concentración de 50 mg/mL los halos fueron de 10 mm en *K. pneumoniae*, 9 mm en *E. coli* y 7 mm para *C. albicans*. Finalmente, con la concentración mayor de 100 mg/mL los halos fueron de 11 mm para *K. pneumoniae* y *E. coli*, y de 8 mm en *C. albicans*, lo que indica una eficiente actividad antibacteriana y antifúngica del extracto.

IV. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

Evaluar la actividad biológica de los grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos con diferente polaridad de *M. calabura*.

4.2. ESPECÍFICOS

- Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos y acuosos de hojas y cortezas de tallos de *M. calabura*.
- Determinar la capacidad inhibitoria de extractos orgánicos y acuosos de hojas y cortezas de tallos de *M. calabura* sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Shigella sonnei* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la toxicidad de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuosos de hojas y cortezas de tallos de *M. calabura* sobre *A. salina*.

V. ZONA DE RECOLECTA

El municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas se encuentra localizado en la región socioeconómica I-Metropolitana a una altura promedio de 610 m.s.n.m., entre las coordenadas 16°46'34" de latitud norte y 93°7'10" de longitud oeste. Cuenta con una extensión territorial de 334.61 km², mientras que la superficie del territorio es de 33 585 hectáreas, de las cuales 14 001 ha están ocupadas por los asentamientos humanos, correspondientes a una población de 604 147 habitantes. Al norte colinda con los municipios de San Fernando, Osumacinta y Chiapa de Corzo; al este con Chiapa de Corzo; al sur con Suchiapa y Ocozocoautla de Espinoza; y al oeste con Ocozocoautla de Espinosa y Berriozábal (Figura 20) (Román-Guillén *et al.*, 2019; H. Ayuntamiento Constitucional de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024, 2022).

La recolecta de las muestras de *M. calabura* se llevó a cabo a las 8:00 am en febrero de 2024, en el estadio de Ciudad Universitaria de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH) ubicada en Libramiento Norte Poniente de la colonia Lajas Maciel en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se seleccionaron ramas con hojas de árboles ubicados en las coordenadas 14°46'34" de latitud norte y 93°7'10" de longitud oeste a 610 m.s.n.m (Figura 20).

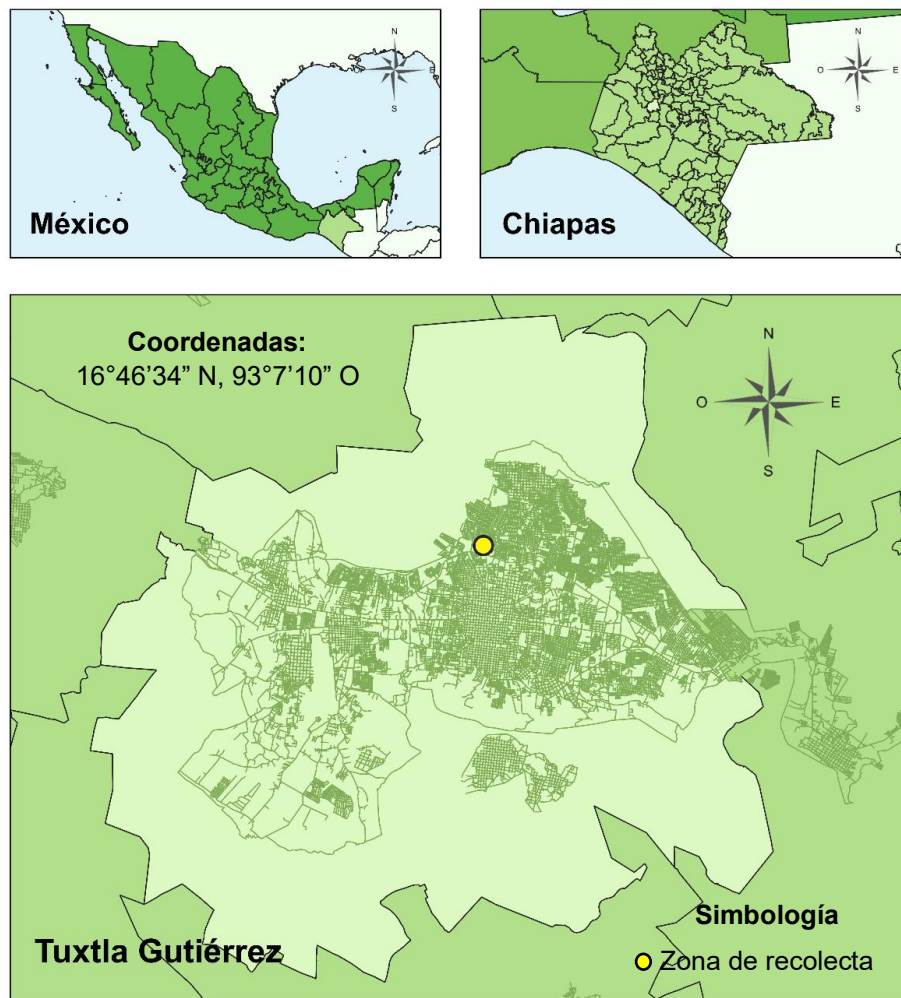


Figura 20. Zona de recolecta de las estructuras vegetales de *M. calabura*. Fuente: Hernández-Aguilando (2024)

5.1. FISIOGRAFÍA

Además, Tuxtla Gutiérrez forma parte de la región fisiográfica llamada Depresión Central y se encuentra entre la de Montañas del Norte y Altos de Chiapas. Las formas presentes en el municipio son: Llanura aluvial con lomerío (34.99%), Sierra alta de laderas tendidas (29.73%), meseta típica (25.16%), Valle de laderas tendidas con lomerío, (4.21%), Lomerío típico (3.85%) y Cañón típico (2.06%) (H. Ayuntamiento Constitucional de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024, 2022).

5.2. EDAFOLOGÍA

Los datos vectoriales edafológicos de la superficie del municipio están compuestos por los suelos: Leptosol (35.37%), Regosol (18.64%), Vertisol (18.31%) y Luvisol (11.38%). Los cuerpos de agua y los asentamientos humanos corresponden al porcentaje restante, equivalente a un 16.3%. En cuanto a los tipos de roca que conforman la corteza terrestre se encuentra: Caliza-Lutita (roca sedimentaria) (37.88%), Caliza (roca sedimentaria) (24.87%), Aluvial (suelo) (20.78%), Limolita-Arenisca (roca sedimentaria) (11.61%) y Lutita-Arenisca (roca sedimentaria) (4.87%) (*Idem*).

5.3. HIDROGRAFÍA

Respecto a la hidrografía, Tuxtla Gutiérrez está situado dentro de la cuenca del río Sabinal, inmersa en la Región Hidrológica No. 30 de Grijalva-Usumacinta. El río Sabinal es su principal caudal, que es un afluente del río Grijalva; así mismo, fluyen los ríos Suchiapa, Yatipak, Terán, San Agustín y Guadalupe. El río Sabinal es considerado el más importante, mientras que sus afluentes son los arroyos San Agustín, La Chacona, Chapultepec, Ojo de Agua, Pomarrosa, Pistimbak, Potinaspak, Totoposte, Bambú, Arroyo Blanco, Lomas del Oriente, Cerro Hueco, Santa Ana, Poc-Poc, San Roque, El Zope, San Pascualito, El Cocal, Romeo Rincón, San Francisco Sabinal y La Laguna (*Idem*).

5.4. CLIMA

El clima del municipio es principalmente cálido-subhúmedo, con lluvias en los meses de verano y semicálido en otoño. La temperatura media anual es de 26° C, con una temporada cálida que comienza desde febrero hasta septiembre, siendo más caluroso entre abril y la segunda semana de mayo. Por otro lado, la temporada fresca varía desde mediados de noviembre hasta inicios de febrero, con un periodo más frío en diciembre, donde la temperatura puede bajar hasta 9° C (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2010; H. Ayuntamiento Constitucional de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024, 2022).

Según las áreas municipales, la precipitación anual es en promedio de 900 mm, con una temporada normal de lluvias que abarca desde mayo hasta la segunda

semana de octubre. Normalmente el mes más lluvioso es junio, mientras que los siguientes meses disminuye la precipitación, la cual se incrementa hasta septiembre, el segundo mes más lluvioso del año (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2010).

5.5. VEGETACIÓN

El municipio de Tuxtla Gutiérrez se caracteriza por una vegetación de selva baja caducifolia, mientras que en otras áreas municipales es la selva alta o mediana subcaducifolia. La cobertura vegetal y el aprovechamiento del suelo se distribuye de la siguiente forma: selva baja caducifolia secundaria (32.28%), agricultura de temporal (29.18%), pastizal inducido (3.52%), pastizal cultivado (1.65%), bosque de encino secundario (1.43%), sin vegetación aparente (1.26%), selva mediana subperennifolia secundaria (0.88%), selva baja caducifolia (0.71%) y lo correspondiente a cuerpos de agua y asentamientos humanos (29.09%) (H. Ayuntamiento Constitucional de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024, 2022).

Para la ciudad, Román-Guillén *et al.* (2019) reportaron un total de 38 familias, 88 géneros y 144 especies de plantas, donde destacan las siguientes familias botánicas: Fabaceae Juss., Moraceae Gaudich., Bignoniaceae Juss., Malvaceae Juss., Meliaceae Juss. y Rutaceae Juss.

Entre las especies se encuentran árboles y arbustos tanto nativos como introducidos: benjamina (*Ficus benjamina* L.), almendro (*Terminalia catappa* L.), laurel de la india (*Ficus nitida* Thunb.), matilisguate (*Tabebuia rosea* DC.), mango (*Mangifera indica* L.), cupapé (*Cordia dodecandra* DC.) y la guaya (*Talisia oliviformis* Radlk.). Otras de las especies que también se encuentran son: caulote (*Guazuma ulmifolia* Lam.), flamboyán (*Delonix regia* [Bojer ex Hook.] Raf.), capulín (*Muntingia calabura* L.), caobilla (*Swietenia humilis* Zucc.), guarumbo (*Cecropia peltata* Vell.), palo mulato (*Bursera simaruba* Sarg.) y flor de mayo (*Plumeria rubra* L.) (*Idem*). Los nombres y descriptores de las familias y especies botánicas mencionadas fueron verificados por medio de The World Flora Online (2024).

5.6. FAUNA

El estado de Chiapas posee una variedad de climas, topografía y vegetación que le confieren una gran diversidad faunística. De acuerdo con el H. Ayuntamiento Constitucional de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024 (2022), la fauna presenta características de la selva baja caducifolia, aunque también habitan especies de selvas secas, como: armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linnaeus, 1758), murciélago frutero (*Carollia perspicillata* [Linnaeus, 1758]), tejón (*Nasua narica* [Linnaeus, 1766]), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus* [Zimmermann, 1780]), jaguarundi (*Herpailerus yagouaroundi* [É.Geoffroy Saint-Hilaire, 1803]), jaguar (*Panthera onca* [Linnaeus, 1758]), guacamaya verde (*Ara militaris* [Linnaeus, 1766]), trogón citrino (*Trogon citreolus* Gould, 1835), cacique mexicano (*Cacicus melanicterus* [Bonaparte, 1825]), iguana verde (*Iguana iguana* [Linnaeus, 1758]), boa (*Boa constrictor* Linnaeus, 1758), entre otros. Mediante Global Biodiversity Information Facility (2024) se corroboraron los nombres y descriptores de dichas especies.

La mayoría de los hábitats de plantas y de animales han sido fuertemente alterados debido a las grandes extensiones de terreno transformadas en fraccionamientos de casas, por lo que ahora sólo se pueden observar vestigios muy aislados de la flora de Tuxtla Gutiérrez, los que posiblemente son utilizados como refugio y alimentación por la escasa fauna presente.

5.7. ÁREAS NATURALES PROTEGIDAS

La ciudad de Tuxtla Gutiérrez y su Zona Metropolitana cuenta con áreas naturales protegidas de diversas categorías que proveen de servicios ambientales a la ciudad, tales como: Área de Protección de Recursos Naturales Villa Allende y Parque Nacional Cañón del Sumidero. Sin embargo, la actual expansión urbana y la introducción de especies invasoras, exóticas o ferales han propiciado graves daños a los ecosistemas terrestres y acuáticos, así como desequilibrios ecológicos entre la poblaciones silvestres, cambiando la estructura trófica, desplazando especies nativas, perdiendo biodiversidad, reduciendo la diversidad genética y una gran variedad de enfermedades e impactos a la salud y economía pública (H. Ayuntamiento Constitucional de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024, 2022).

VI. MÉTODOS

6.1. RECOLECTA Y REGISTRO DEL MATERIAL VEGETAL

Se recolectaron ramas con hojas de *M. calabura* en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, correspondiente a la región fisiográfica de la Depresión Central. Las coordenadas corresponden a 14°46'34" de latitud norte y 93°7'10" de longitud oeste, a 610 m.s.n.m. Las ramas se deshojaron y se extrajo la corteza de tallos, procurando no deteriorar ninguna de las estructuras. Se desecharon las partes maltratadas o enfermas de la planta y después se lavaron para eliminar la suciedad, se escurrieron y colocaron por separado sobre papel de estraza para su deshidratación a temperatura ambiente. Por último, las muestras deshidratadas se fragmentaron y pulverizaron hasta un tamaño de malla de 1 mm.

Posteriormente, un ejemplar botánico con flor fue colectado y se prensó, secó y depositó en el Herbario Eizi Matuda (HEM) del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH con la finalidad de corroborar la identificación de la especie e ingresar un ejemplar a la colección. Dicho ejemplar quedó registrado con el número 046337.

6.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

6.2.1. Extractos orgánicos

Con base en el material deshidratado, se realizó una extracción selectiva con el equipo Soxhlet utilizando disolventes de diferente polaridad: hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH). Este método emplea una cantidad mínima de disolvente, el cual es usado durante todo el proceso debido a su continua purificación y destilación cada que pasa por la matriz en la que se encuentra la materia prima o la estructura vegetal elegida, por lo que asegura extraer compuestos con alta estabilidad térmica en respuesta a la temperatura de ebullición de cada solvente (Naviglio *et al.*, 2019).

Cabe mencionar que comúnmente se utilizan solventes no polares, como el hexano (Hex), para extraer compuestos lipofílicos como grasas o ceras. Después, los solventes de polaridad intermedia, como el acetato de etilo (AcOEt), son empleados para solubilizar una mayor cantidad de compuestos lipofílicos. Por último, los solventes polares como el etanol (EtOH) y el metanol (MeOH), se usan para extraer compuestos hidrofílicos, tales como carbohidratos o azúcares. Dicho esto, cada solvente posee

propiedades particulares que lo hacen ideal para extraer compuestos con polaridad específica (Frías y Rosales, 2023; Kaur *et al.*, 2024).

Para la obtención de los extractos se pesaron 120 g de material vegetal, se colocaron en la cámara de extracción en papel filtro y se agregó el disolvente (Hex, seguido de AcOEt y de MeOH) por tres periodos de ocho horas cada uno. El extracto obtenido se concentró a presión reducida en un rotaevaporador a 120 rpm, utilizando temperaturas de acuerdo con el disolvente empleado. Los extractos concentrados se depositaron en frascos limpios previamente pesados y se dejó evaporar el resto del disolvente a temperatura ambiente. Por último, se determinó el rendimiento (en porcentaje) de cada extracto y se almacenaron a 4° C en oscuridad (Figura 21).

6.2.2. Extractos acuosos

Con relación a los extractos acuosos, se obtuvieron por medio de la decocción de 50 g de muestra vegetal y 200 mL de agua destilada, llevando a ebullición por 15 minutos. El extracto se filtró para eliminar residuos y el sobrenadante se dejó evaporar a sequedad en condiciones de luz y temperatura ambiente para luego ser depositados en frascos previamente pesados. Al finalizar se determinó el rendimiento (en porcentaje) del extracto y se almacenó a 4° C en oscuridad (Figura 21).

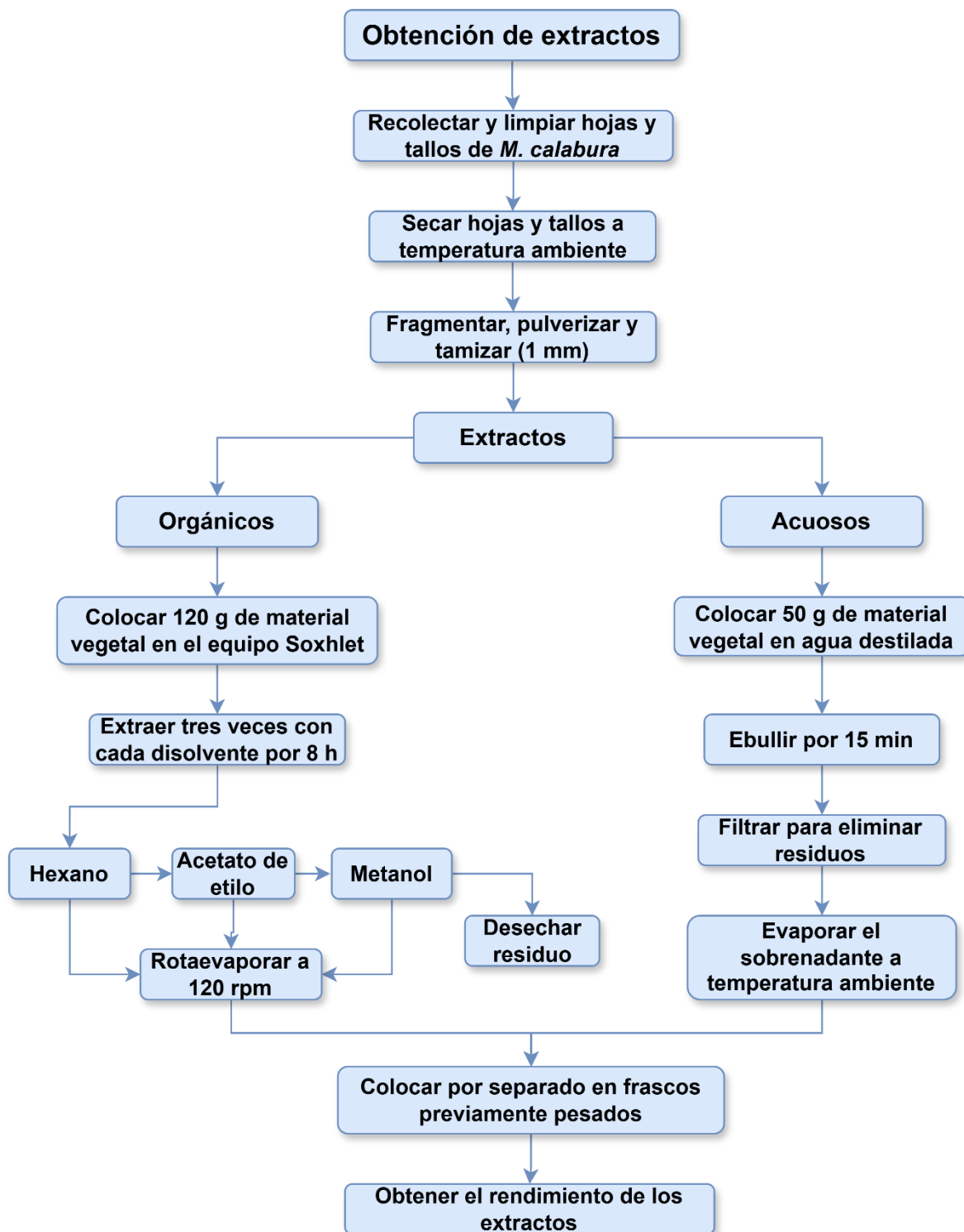


Figura 21. Recolecta de material vegetal y obtención de extractos

6.3. IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Se realizaron pruebas cualitativas para la identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes. Cada una de estas fue realizada por duplicado y los resultados se expresaron mediante un sistema de cruces para especificar su presencia o ausencia, y en su caso la intensidad, de acuerdo con los siguientes criterios: abundante (+++), media (++), ligera (+) y ausente (-). A continuación se describe cada una de las pruebas (Figura 22).

Para ello se preparó una solución madre utilizando 50 mg de cada extracto diluido en 10 mL del disolvente utilizado para su extracción, con una concentración final de 5 mg/mL. Del extracto se distribuyó 1 mL de cada solución a ocho tubos de ensayo y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

6.3.1. Alcaloides: prueba con el reactivo de Dragendorff

En el tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se añadió 1 mL de HCl al 10% y dos gotas del reactivo de Dragendorff. En este caso, un precipitado marrón o anaranjado-marrón indicó la presencia de este tipo de metabolito. Si existe opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) o precipitado (+++) (Espinoza-Olaya, 2014).

6.3.2. Fenoles: prueba de Cloruro férrico

A un tubo de ensayo con extracto seco se le adicionó 1 mL de etanol y tres gotas de cloruro férrico al 1% en etanol. La aparición de una coloración verdosa o azul-verdosa indicó una reacción positiva (Domínguez, 1973).

6.3.3. Flavonoides: prueba de Shinoda

En el tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se añadió 1 mL de etanol y posteriormente se le adicionaron tres trozos pequeños de magnesio junto a dos gotas de HCl concentrado. Para esta prueba, una coloración naranja indica la presencia de flavonas; rojo para flavononas; rojo-azulado para flavonoles y violeta para xantinas (Domínguez, 1973).

6.3.4. Glucósidos: prueba de Molish

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le añadió 1 mL de etanol, dos gotas de alfa-naftol al 5% en etanol y 1 mL de ácido sulfúrico por gotas, resbalando sobre las paredes del tubo. La formación de un anillo de color violeta en la interfase indicó una reacción positiva (Plumer, 1981).

6.3.5. Lactonas sesquiterpénicas: prueba de Baljet

En el tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se colocó 1 mL de etanol, se agitó y se añadió 1 mL de reactivo de Baljet. La presencia de una coloración roja (++) o de un precipitado del mismo color (+++) indicó una prueba positiva (Miranda-Martínez, 2002).

6.3.6. Quinonas: ensayo de Borntrager

En el tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se añadió 1 mL de cloroformo y, por separado, se añadió 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxido de amonio al 5% en agua. Se agitó mezclando las fases y se dejó reposando hasta su separación. La coloración de la fase acuosa alcalina (superior) en tono rosado o rojo indica un resultado positivo (Miranda-Martínez, 2002).

6.3.7. Saponinas: prueba de espuma

A un tubo de ensayo con extracto seco se añadió 1 mL de agua destilada, se tapó y agitó vigorosamente durante 30 segundos. La formación de espuma durante 2 minutos indicó la presencia de saponinas (Domínguez, 1973).

6.3.8. Taninos: prueba para taninos hidrolizables y condensados

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le agregó 1 mL de agua destilada y dos gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 2%. Una coloración azul indica la presencia de taninos hidrolizables, mientras que una coloración verde es para taninos condensados (Salem *et al.*, 2013).

6.3.9. Terpenos-esteroides: prueba de Liebermann-Buchard

A un tubo de ensayo con 5 mg de extracto seco se le añadió 1 mL de cloroformo y 1 mL de reactivo de Liebermann-Buchard. La reacción fue positiva para esteroides al presentarse una coloración azul o azul-verdosa. Por su parte, la coloración rojo, rosa o violeta fue para los terpenos (Domínguez, 1973).

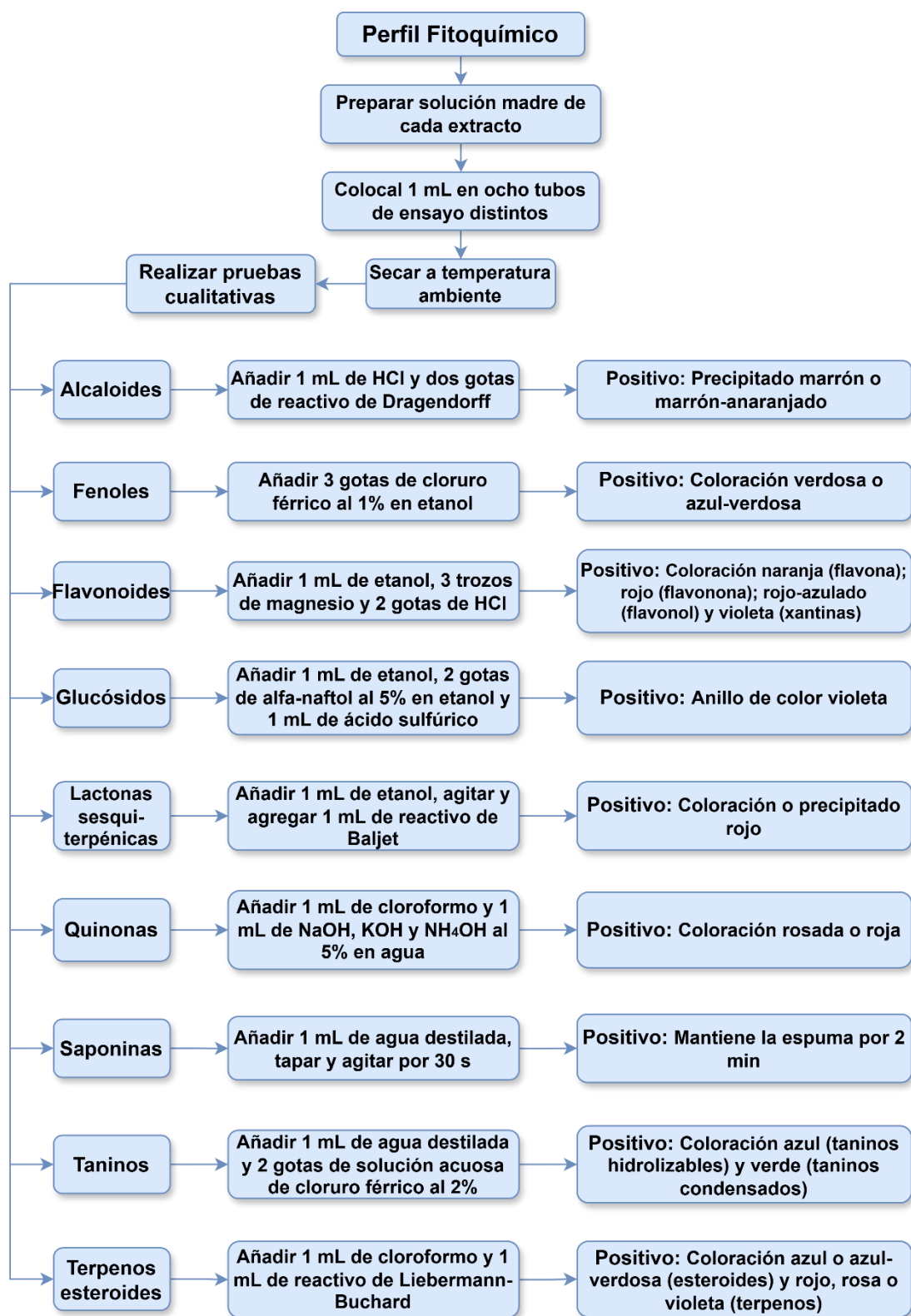


Figura 22. Pruebas de identificación de grupos de metabolitos secundarios

6.4. ENSAYOS BACTERIANOS

Las bacterias Grampositivas evaluadas fueron *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). Por otro lado, las bacterias Gramnegativas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Salmonella Typhi* (ATCC 6539), *Shigella sonnei* (ATCC 25931) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todas se tomaron del cepario del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH. Las cepas de colección ATCC provienen de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional y del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Chiapas.

Además, se ensayaron cepas provenientes de aislamientos clínicos, tales como *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, para lo cual se siguieron las normas expuestas en la declaración de Helsinki, respetando la confidencialidad del paciente.

6.4.1. Preparación del inóculo microbiano

Los microorganismos se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron a 36° C $\pm$ 1 durante 24 horas. Se realizó la tinción de Gram para corroborar la identidad de la cepa, se revisó la morfología colonial, se realizaron pruebas bioquímicas con el sistema API 20E y finalmente se mantuvieron en agar soya tripticaseína (Cona, 2002; Andrews y Howe, 2011).

Para la realización del inóculo de cada cepa se tomaron colonias aisladas provenientes de un cultivo de 24 h, las cuales se depositaron en caldo soya tripticaseína e incubaron a 36° C $\pm$ 1 de 3 a 6 h. La turbidez de la suspensión se ajustó a 0.5 de la escala McFarland, que contiene cerca de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, cuya densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro; al presentarse concentraciones mayores se utilizó caldo soya tripticaseína estéril para diluir (Figura 23) (*Idem*).

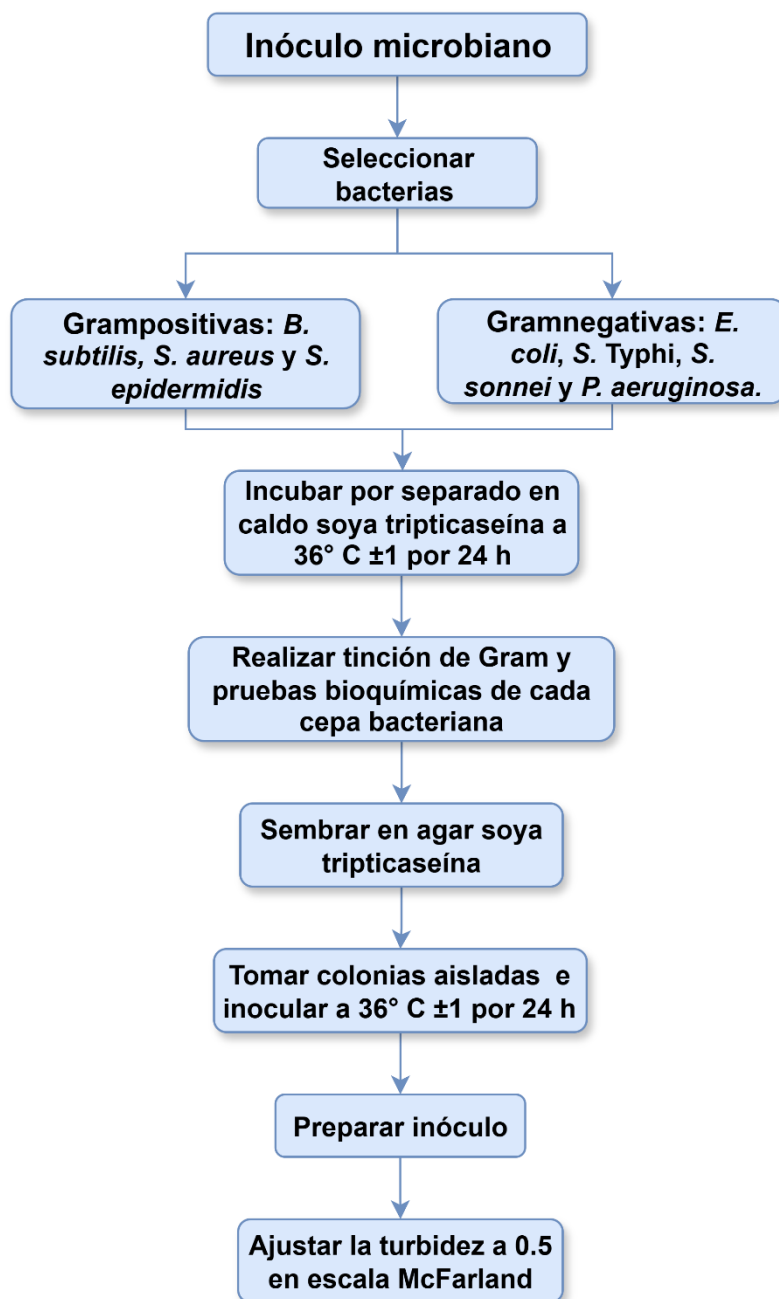


Figura 23. Preparación del inóculo microbiano de las bacterias a ensayar

6.4.2. Difusión en agar

Se realizó un ensayo de difusión en agar, que es un método empleado para evaluar la eficacia de un agente químico, ampliamente usado de rutina en laboratorios clínicos y de investigación. La técnica consiste en impregnar un disco de papel filtro con una sustancia química, se coloca sobre una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo de prueba y se incuba bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo. Si la sustancia es eficaz, después de la incubación se puede observar una zona clara que representa la inhibición del crecimiento alrededor del disco, en donde un halo más grande indica mayor sensibilidad del microorganismo a la sustancia, mientras que la ausencia de estos sugiere resistencia (Tortora *et al.*, 2007; Araya *et al.*, 2015).

Para estos ensayos, se preparó una solución madre de cada extracto disuelto en 1 mL de agua destilada estéril, de la cual se realizaron diluciones seriadas para obtener concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL. En una campana de flujo laminar, se impregnaron los discos de papel filtro estériles con cada una de las tres concentraciones antes mencionadas. Posteriormente se realizó una siembra masiva de cada bacteria en placas de agar Müller-Hinton, para lo cual se utilizó un hisopo estéril, asegurando la distribución homogénea en la superficie de la placa. Después se colocaron los discos impregnados con cada una de las concentraciones del extracto así como el control, cuidando que los posibles halos de inhibición no se superpusieran (Figura 24) (Bauer *et al.*, 1966; Cona, 2002; Andrews y Howe, 2011).

Las placas se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18 horas. Transcurrido el tiempo se observó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano. Al observar ausencia de bacterias se midieron los halos de inhibición con un vernier. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Figura 24) (*Idem*).

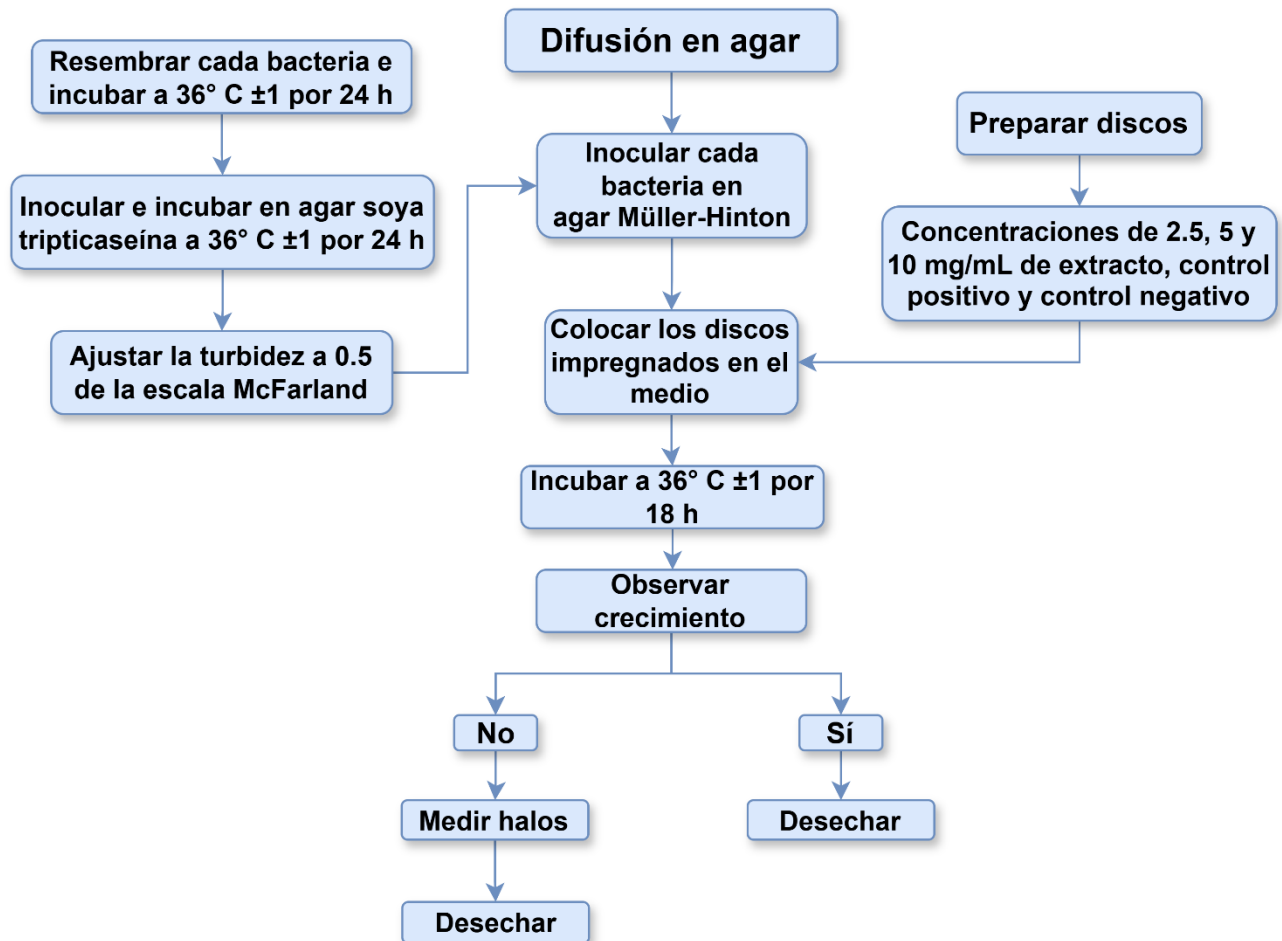


Figura 24. Prueba de difusión en disco de las bacterias a evaluar

6.4.3. Porcentaje de inhibición relativa (PIR)

Para el caso de los extractos que provocaron halos de inhibición, se calculó el porcentaje de inhibición relativa (PIR) respecto al control positivo usando gentamicina, mediante la fórmula de Rivero *et al.* (1997):

$$PIR = \frac{\text{Promedio de halos de inhibición del extracto}}{\text{Promedio de halos de inhibición del control positivo}} \times 100$$

6.4.4. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Para determinar la menor cantidad de extracto que impida el crecimiento bacteriano de las cepas ensayadas se realizó el método de microdilución seriada en medio líquido. Para ello, se pesaron y disolvieron 40 mg del extracto a evaluar, obteniendo una solución madre. Además, se preparó resazurina en agua destilada estéril (Sarker *et al.*, 2007).

Las disoluciones seriadas de los extractos se prepararon en placas estériles de 96 pocillos en una campana de flujo laminar. Para ello, en todos los pocillos se depositaron 100 µL de caldo Müller-Hinton y en el primer pocillo 100 µL de la solución madre, de la cual se realizaron transferencias para obtener diluciones en diferentes gradientes de concentración. El último pocillo quedó con 200 µL por lo que se desecharon 100 µL, de tal forma que todos tengan el mismo volumen. Finalmente, se añadieron 10 µL del inóculo estandarizado a cada pocillo, así como 10 µL de la solución de resazurina. Las concentraciones finales de cada extracto fueron de 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078, 0.039 y 0.019 mg/mL. En cada ensayo se realizaron cuatro controles: control de crecimiento (caldo Müller-Hinton, inóculo y resazurina), control de esterilidad (extracto, caldo Müller-Hinton y resazurina), control positivo (gentamicina, caldo Müller-Hinton, inóculo y resazurina) y control negativo (inóculo sin extracto) (Figura 25) (*Idem*).

Las placas se incubaron aeróbicamente a 36° C ±1 por 18 horas. Al finalizar el periodo de incubación, se examinaron visualmente y se observó la coloración de cada pozo: una coloración rosa indicó crecimiento bacteriano, mientras que el color azul indicó la inhibición del crecimiento. De esta forma se determinó el valor de la CIM, la

cual es definida como la menor concentración del agente capaz de inhibir el crecimiento microbiano. Cada prueba se realizó por duplicado (*Idem*).

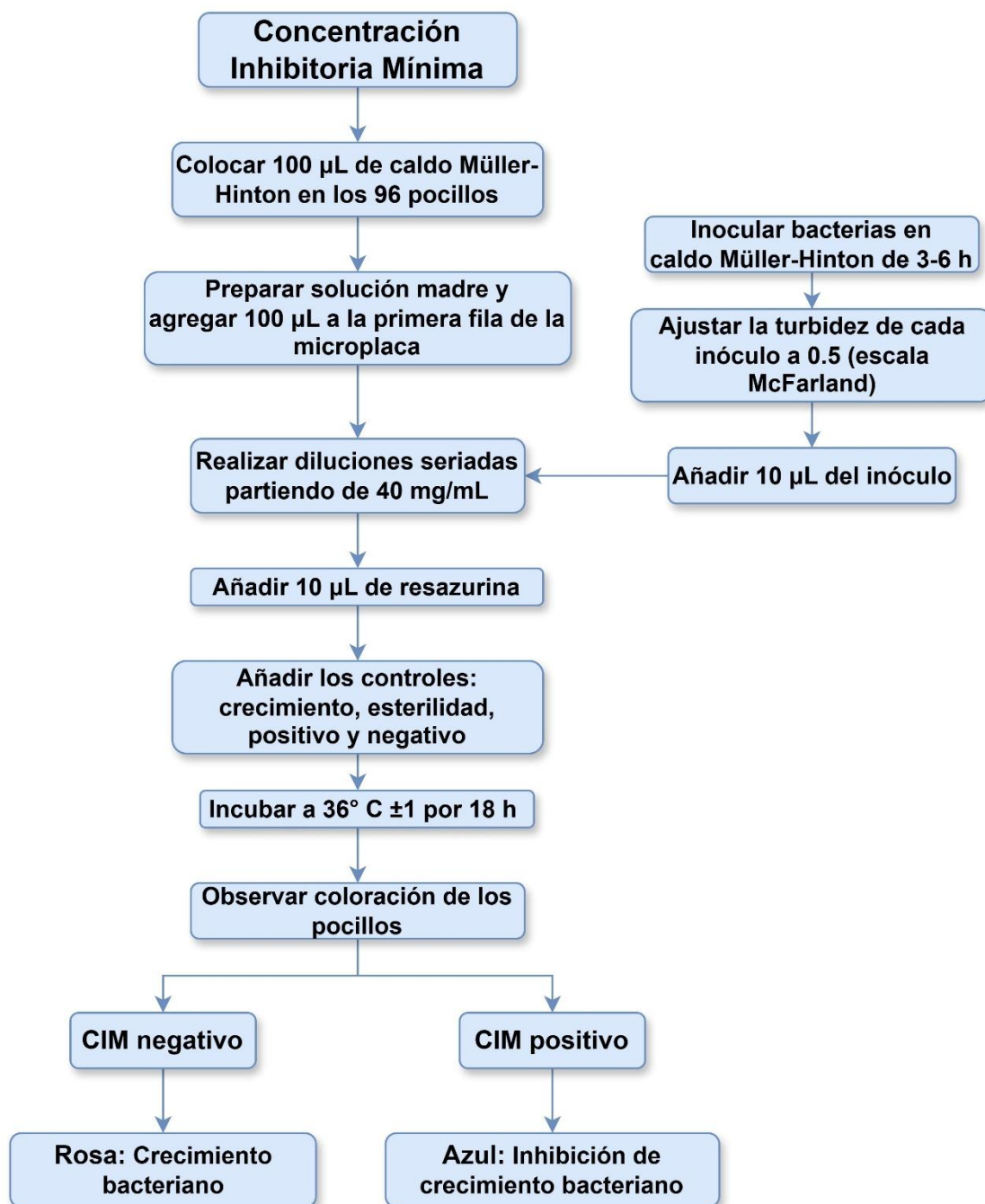


Figura 25. Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM)

6.5. TOXICIDAD SOBRE *Artemia salina*

Se realizaron pruebas de toxicidad, cuyo procedimiento consistió en exponer nauplios de *A. salina* frente a los extractos de *M. calabura* para determinar su concentración letal media (CL₅₀) expresada en g/mL. Para ello se construyó una pecera con agua salina para que eclosionen los huevecillos, cuyo recipiente se dividió en una parte oscura y otra descubierta, con oxigenación constante e iluminada. Los huevecillos se depositaron en la parte oscura y se esperó a que eclosionen (McLaughlin *et al.*, 1998).

Se prepararon disoluciones con 10 mg de extracto en 1 mL de etanol y se transfirieron 5, 50 y 500 µL a tubos de ensayo, evaporando el disolvente a temperatura ambiente; las concentraciones finales fueron de 10, 100 y 1 000 µg/mL en cada tubo, equivalentes a 10, 100 y 1 000 ppm. Una vez teniendo nauplios de *A. salina*, y después de haberse evaporado el disolvente en los tubos, se añadieron 5 mL de agua salina y se depositaron 10 larvas del crustáceo en cada uno de ellos y se dejaron durante 24 h. Por último, se realizó el conteo de larvas sobrevivientes a las 24 h, realizando cada evaluación por quintuplicado. Se evaluó un control positivo con agua salina y larvas del crustáceo, así como un control negativo con dicromato de potasio. En caso de que existan muertes en el testigo, los valores de las concentraciones se deben corregir mediante la fórmula de Abbot's (Figura 26) (*Idem*).

$$\% = \frac{T - C}{10} \times 100$$

Donde:

- **C** es el número de muertes por testigo
- **T** es el número de muertes en el tratamiento

La toxicidad se calculó con el programa PROBIT, donde los resultados se expresan mediante la concentración letal media (CL₅₀) que provoca la muerte del 50% de los individuos ensayados. El criterio para evaluar la toxicidad del extracto indica que la CL₅₀ puede ser: extremadamente tóxico (<10 µg/mL), muy tóxico (10-100 µg/mL), moderadamente tóxico (100-1 000 µg/mL) y no tóxico (>1 000 µg/mL) (*Idem*).

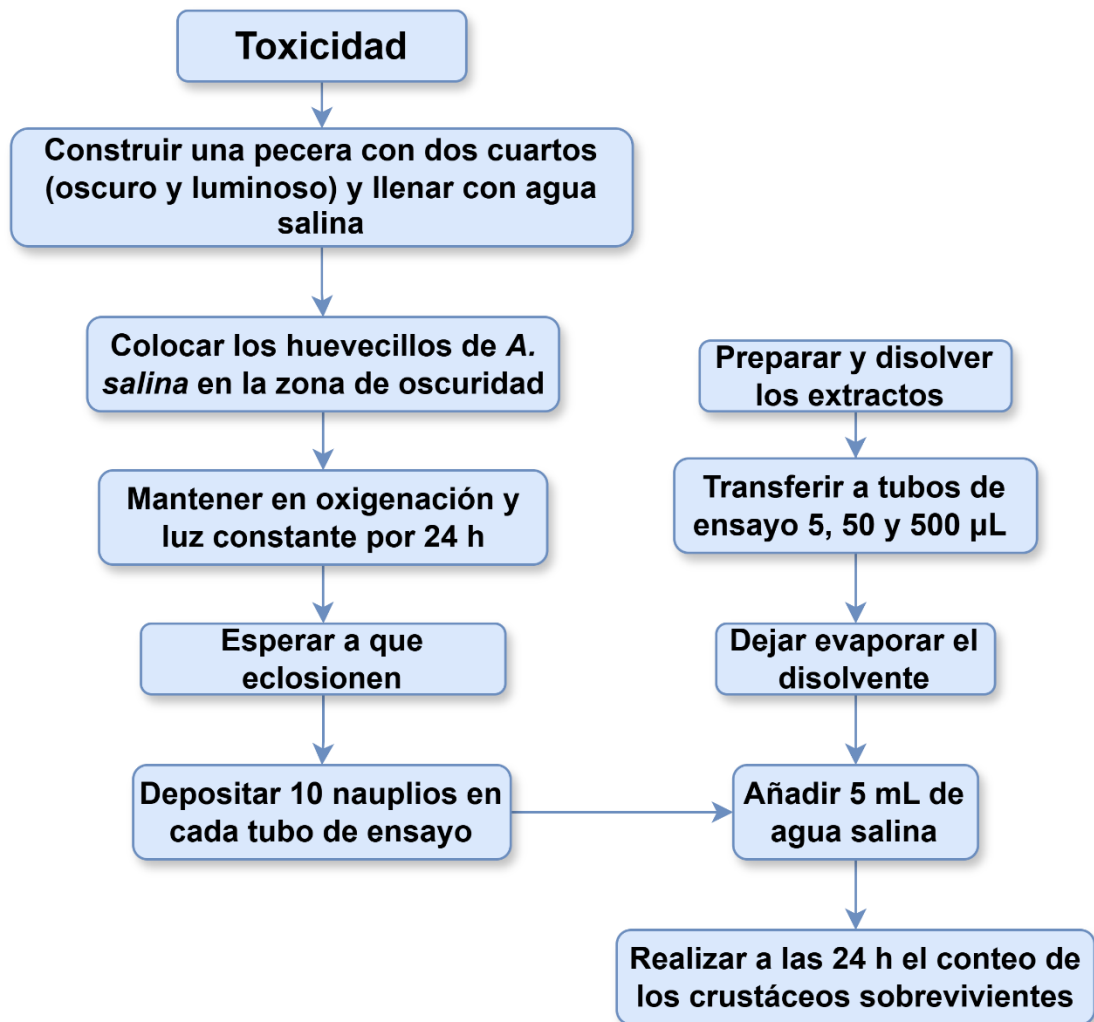


Figura 26. Prueba de toxicidad con *A. salina*

6.6. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las pruebas de difusión en agar se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente mediante la prueba de ANOVA en el programa RStudio versión 4.4.3 (R Core Team, 2022). Para ello, se realizó una base de datos considerando la estructura vegetal, el solvente y la concentración del extracto en función de la bacteria y el diámetro de inhibición producido.

Para el análisis se utilizaron los Modelos Lineales Generalizados (GLM, por sus siglas en inglés), se ajustaron y compararon las distribuciones con modelos conocidos, como gausse o binomial negativa, con base en diferentes criterios estadísticos de la bondad de ajuste como: Kolmogórov-Smirnov, Cramér-von Mises y Anderson-Darling, así como también el criterio de Akaike, que se basa en indicar que la mejor distribución se ajusta con relación a una menor pérdida de datos (Akaike, 1987). A partir de la selección de la distribución con el mejor modelo de la bondad de ajuste, se empleó ese tipo de distribución y se realizó el análisis, por lo que se obtuvieron tablas de coeficientes con las que se evaluó la significancia ($p=0.05$) de los factores considerados y se generaron gráficos de caja y bigote para visualizar si existían diferencias o no entre los grupos, con sus respectivas desviaciones estándar.

A continuación, se realizaron los siguiente análisis en función del objetivo de estudio de este trabajo:

1. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para identificar qué bacterias presentaron inhibición.
2. Posteriormente, se descartaron aquellas que no mostraron actividad inhibitoria y con las especies sensibles se aplicó un segundo ANOVA de un factor, considerando el tipo de extracto y su efecto sobre las bacterias, con el propósito de determinar el o los extractos que establecen diferencias significativas en función del efecto inhibitorio entre las bacterias evaluadas.
3. Finalmente, se realizó un GLM para evaluar el efecto combinado de la estructura vegetal y la concentración del extracto sobre cada una de las bacterias inhibidas. Además, se aplicó la prueba pareada o por pares post-hoc de Tukey para identificar qué combinaciones de estructura (hoja o

corteza de tallos) y concentración (2.5, 5 o 10 mg/mL) generaron un mayor efecto inhibitorio en cada bacteria, así como para determinar si hubo efecto dosis-dependiente.

Por otra parte, la prueba de CIM fue realizada únicamente por duplicado, mientras que para el ensayo de toxicidad se realizaron cinco repeticiones, evaluando sus resultados por medio del algoritmo logic del programa estadístico PROBIT, en donde se utilizó una base de datos por cada extracto, considerando el número de individuos vivos y muertos después de las 24 h de exposición. Los resultados de este análisis refieren a la concentración letal media (CL_{50}) de cada extracto, lo que permitió determinar el grado de toxicidad.

VII. RESULTADOS

7.1. EXTRACTOS Y SUS RENDIMIENTOS

Los extractos de hojas y cortezas de tallos de *M. calabura* obtenidos con tres disolventes orgánicos de distinta polaridad (hexano [Hex], acetato de etilo [AcOEt] y metanol [MeOH]), presentaron rendimientos de 0.76 a 9.56%, en donde el extracto metanólico fue el de mayor rendimiento con ambas estructuras botánicas, obteniendo 9.56% con hojas y 7.32% con cortezas de tallos, mientras que los preparados con agua (acuoso [A]) alcanzaron valores de hasta 12.57% al emplear hojas y 9.29% usando cortezas de tallos (Figura 27; Anexo 1).

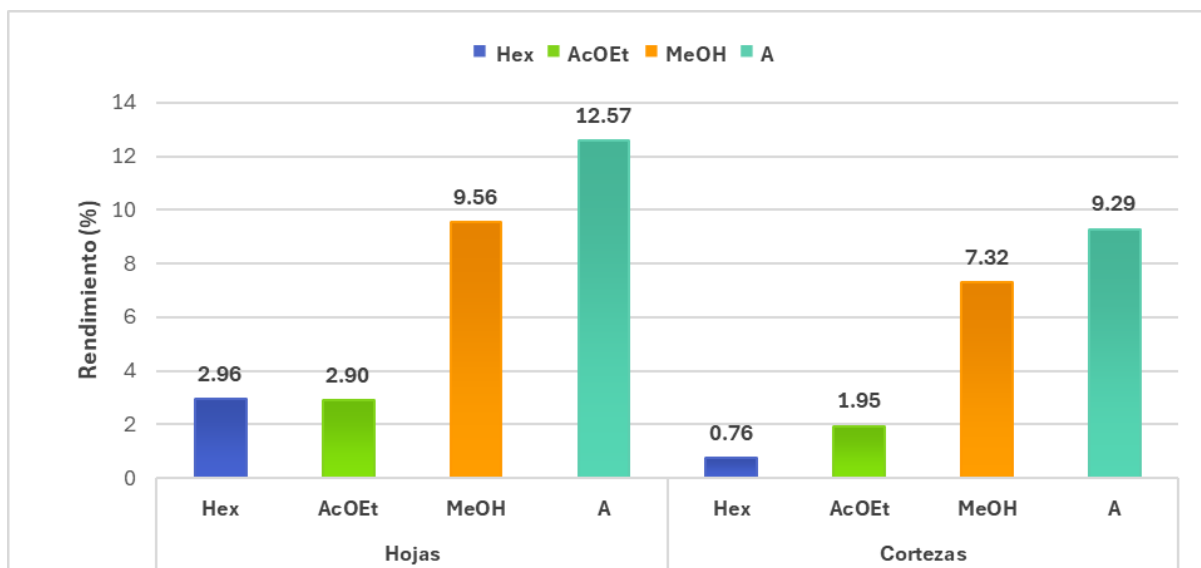


Figura 27. Rendimiento de los extractos de *M. calabura*. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso

Los sólidos presentes en estos extractos son importantes debido a que permiten conocer el rendimiento de los principios activos de *M. calabura*.

7.2. GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Las hojas y cortezas de tallos de *M. calabura* presentaron en común siete grupos de metabolitos secundarios: alcaloides, fenoles, flavonas, glucósidos, lactonas sesquiterpénicas, saponinas y esteroides. De manera particular, las hojas presentaron taninos condensados, mientras que en las cortezas de tallos se encontraron taninos hidrolizables (Anexos 2-3).

7.2.1. Extractos de hojas

En los extractos hexánicos se presentaron fenoles con intensidad baja y lactonas sesquiterpénicas (LS) con alta, en los de acetato de etilo únicamente se encontraron fenoles con intensidad media, el metanólico presentó el mayor número de grupos con alta intensidad, como alcaloides, fenoles, glucósidos, saponinas y taninos condensados, mientras que con intensidad media se encontraron esteroides y LS. Finalmente, los extractos acuosos mostraron intensidad alta de fenoles y glucósidos, además de intensidad baja para flavonas y saponinas (Figura 28).

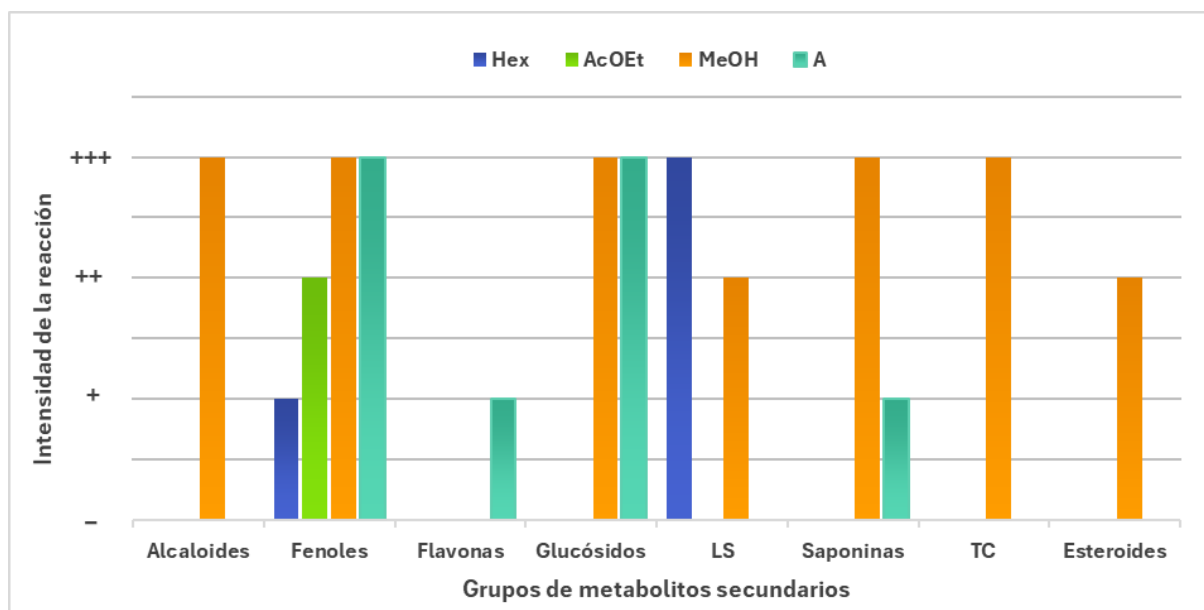


Figura 28. Grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de hojas de *M. calabura*. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. LS: lactonas sesquiterpénicas; TC: taninos condensados. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++) y abundante (+++)

7.2.2. Extractos de cortezas de tallos

En los extractos hexánicos se identificaron fenoles, glucósidos y LS con intensidad baja, y esteroides con intensidad media. En el de acetato de etilo se observaron alcaloides, esteroides y LS con intensidad baja, glucósidos con intensidad media, así como fenoles y taninos hidrolizables con intensidad alta. En el metanólico se encontraron fenoles, glucósidos, LS, saponinas y taninos hidrolizables con intensidad alta. Por último, los acuosos presentaron con intensidad alta a los alcaloides, glucósidos y saponinas, mientras que con intensidad media a los fenoles y flavonas (Figura 29).

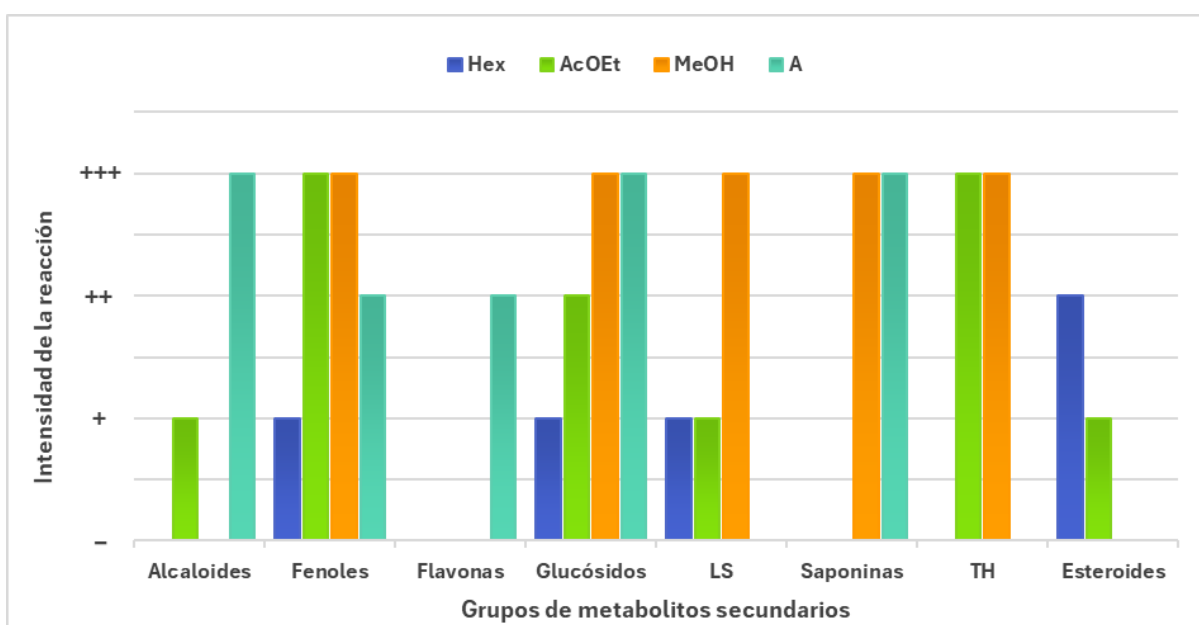


Figura 29. Grupos de metabolitos secundarios presentes en extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso.

LS: lactonas sesquiterpénicas; TC: taninos condensados. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++) y abundante (+++)

7.3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

7.3.1. Ensayo de difusión en disco

7.3.1.1. Bacterias Grampositivas

De las cuatro bacterias Grampositivas ensayadas, sólo se presentó inhibición sobre las especies *B. subtilis* ATCC y *S. aureus* de aislamiento clínico (AC), siendo activos

los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso. Los gráficos corresponden a la media de tres repeticiones (Anexo 4, 5 y 6).

7.3.1.1.1. Extractos de hojas

Los extractos de hojas que presentaron inhibición sobre *B. subtilis* ATCC fueron el de acetato de etilo, con halos de 8.3, 9 y 9.7 mm al emplear concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente. Así mismo, el extracto metanólico presentó menor inhibición, con diámetros de 7.3, 7.7 y 8.3 mm con concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente (Figura 30).

Por otra parte, *S. aureus* AC presentó inhibición frente a los extractos de acetato de etilo, metanol y acuosos. Los diámetros con el extracto de acetato de etilo fueron de 10.3, 13.3 y 15.7 mm a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente. Con los extractos metanólicos se presentaron halos de 9.3, 9.3 y 12.3 mm a concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente. Finalmente, los extractos acuosos únicamente mostraron actividad con concentraciones altas, con diámetros de 10 y 14 mm a concentraciones de 5 y 10 mg/mL, respectivamente (Figura 30).

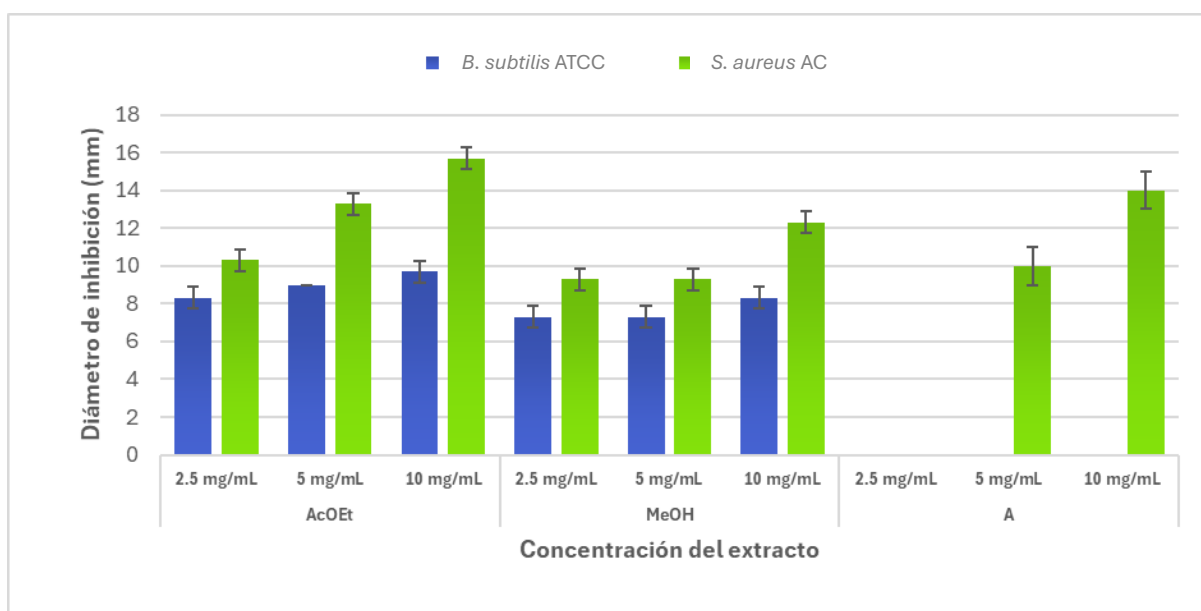


Figura 30. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas de *M. calabura* frente a bacterias Grampositivas. AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuosos. Las líneas en las barras indican la desviación estándar

7.3.1.1.2. Extractos de cortezas de tallos

Los extractos de cortezas de tallos con efectos sobre *B. subtilis* ATCC fueron el de acetato de etilo, metanol y acuoso. Con acetato de etilo los halos tuvieron un diámetro de 9 mm, mientras que con los extractos metanólicos y acuosos fueron de 8 mm, empleando en los tres casos la concentración de 10 mg/mL (Figura 31).

Por otro lado, frente a *S. aureus* AC se presentó actividad con el extracto metanólico, cuyo diámetro fue de 11 mm a una concentración de 10 mg/mL. Así mismo, con el acuoso hubo mayor inhibición, observando halos de 7.7, 9.3 y 14.7 mm con concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente (Figura 31).

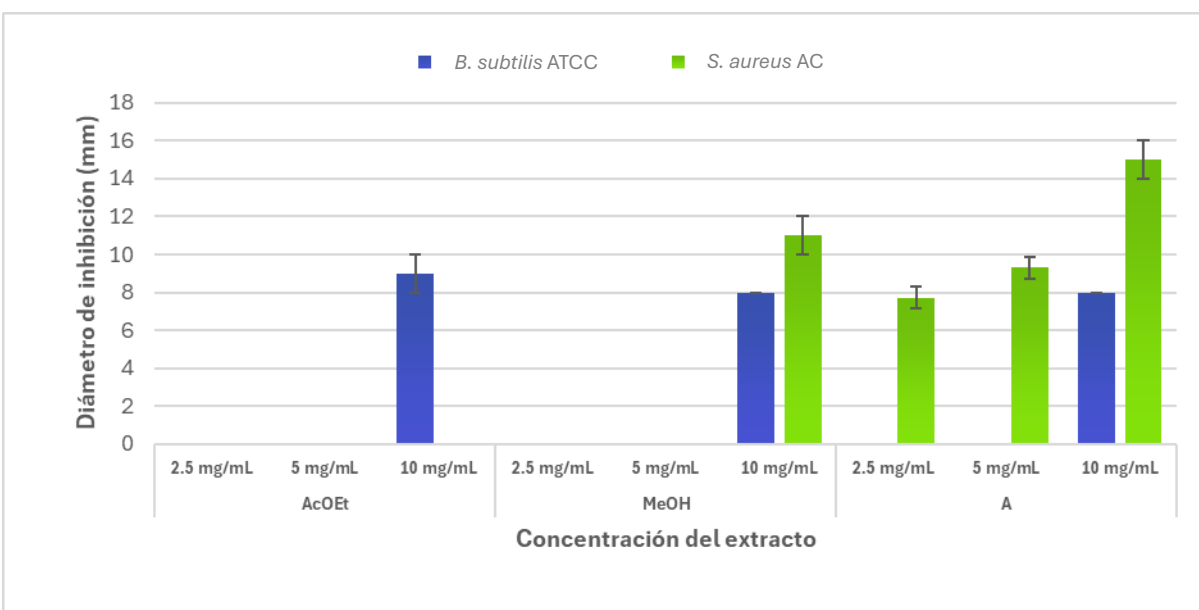


Figura 31. Actividad antibacteriana de los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* frente a bacterias Grampositivas. AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuosos. Las líneas en las barras indican la desviación estándar

7.3.1.2. Bacterias Gramnegativas

Se ensayaron un total de seis bacterias Gramnegativas, de las cuales sólo frente a *E. coli* ATCC, *S. Typhi* ATCC y *S. sonnei* ATCC se presentó inhibición con los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso. Los resultados corresponden a la media de tres repeticiones (Anexo 4, 5 y 7).

7.3.1.2.1. Extractos de hojas

Con los extractos de hojas únicamente se mostró actividad con el extracto metanólico. Para el caso de *E. coli* ATCC, el extracto logró inhibir con halos de 7.7, 8.3 y 11 mm a una concentración de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente. En el caso de *S. Typhi* ATCC, los resultados fueron similares, ya que se presentaron halos de 7.7, 8.3 y 10 mm con 2.5, 5 y 10 mg/mL del extracto. Finalmente, frente a *S. sonnei* ATCC los halos fueron más pequeños, con un diámetro de 7, 7.7 y 9 mm con las concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL (Figura 32).

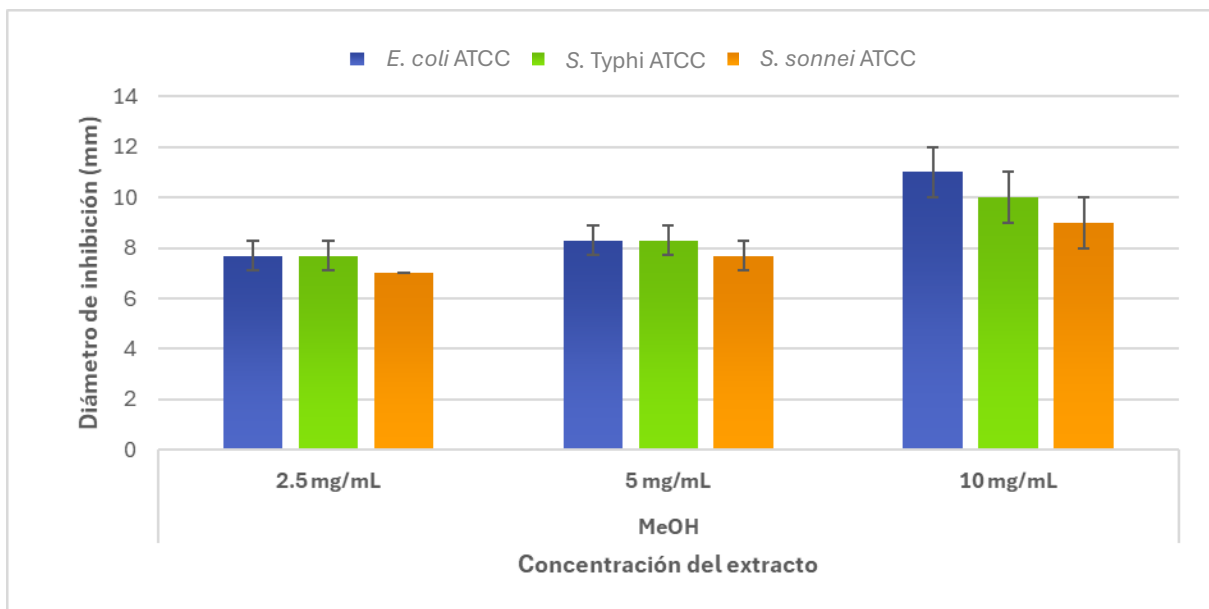


Figura 32. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas de *M. calabura* frente a bacterias Gramnegativas. MeOH: metanol. Las líneas en las barras indican la desviación estándar

7.3.1.2.2. Extractos de cortezas de tallos

Los extractos de cortezas de tallos con acetato de etilo y metanol presentaron actividad sobre las tres bacterias, mientras que los acuosos únicamente para *S. sonnei* ATCC. Frente a *E. coli* ATCC, el extracto de acetato de etilo mostró un halo de 10 mm con la concentración más alta de 10 mg/mL, mientras que con el metanólico los halos fueron de 8.3, 8.7 y 10.3 mm con 2.5, 5 y 10 mg/mL del extracto, respectivamente. En el caso de *S. Typhi* ATCC, el extracto de acetato de etilo tuvo actividad con un halo de 9.3 mm empleando 10 mg/mL, y el metanólico mostró halos de 8.3, 8.7 y 10.7 mm con las concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente (Figura 33).

Frente a *S. sonnei* ATCC con el extracto de acetato de etilo se presentaron halos de 7.7., 8.7 y 10 mm con 2.5, 5 y 10 mg/mL del extracto. Con el metanólico, los halos fueron de 7.7, 8.3 y 8.7 mm, con las concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente. Por último, con el extracto acuoso los halos tuvieron un diámetro de 6.7, 7 y 8 mm con 2.5, 5 y 10 mg/mL, respectivamente (Figura 33).

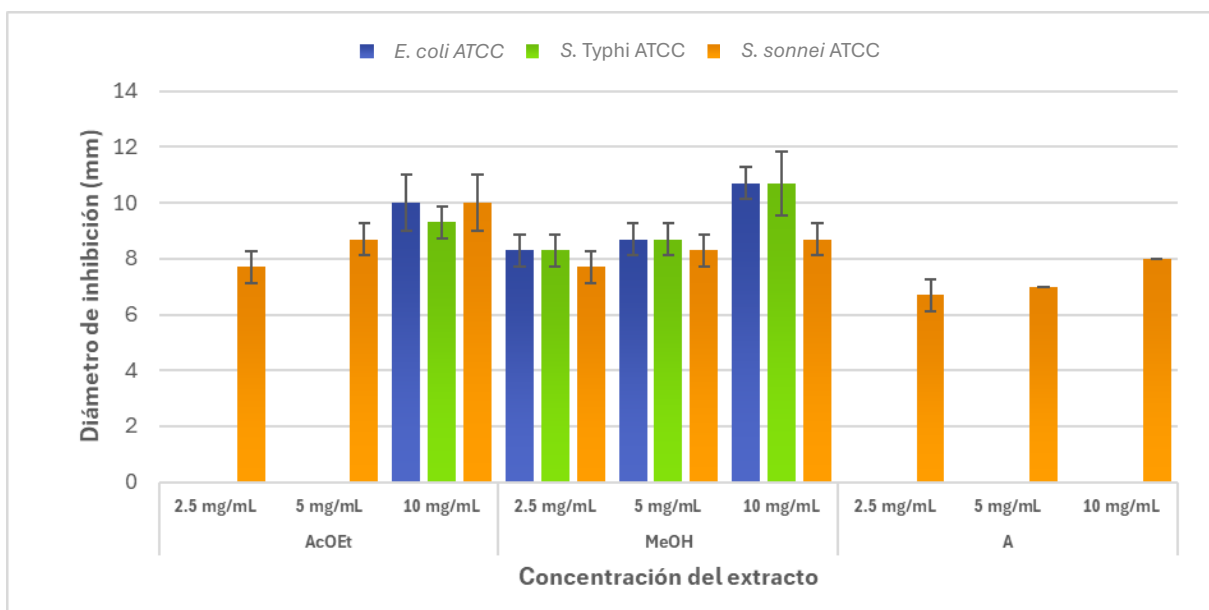


Figura 33. Actividad antibacteriana de los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* frente a bacterias Gramnegativas. AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuosos. Las líneas en las barras indican la desviación estándar

7.3.1.3. Respuesta de las bacterias ensayadas frente a *M. calabura*

De acuerdo con la actividad producida por los extractos de *M. calabura* sobre las bacterias ensayadas, los resultados indican que sólo cinco bacterias fueron inhibidas, las cuales fueron *B. subtilis* ATCC, *S. aureus* AC, *E. coli* ATCC, *S. Typhi* ATCC y *S. sonnei* ATCC, en donde *S. aureus* AC mostró los halos de inhibición más grandes (Figura 34). La inhibición de sobre estas bacterias fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Anexo 8).

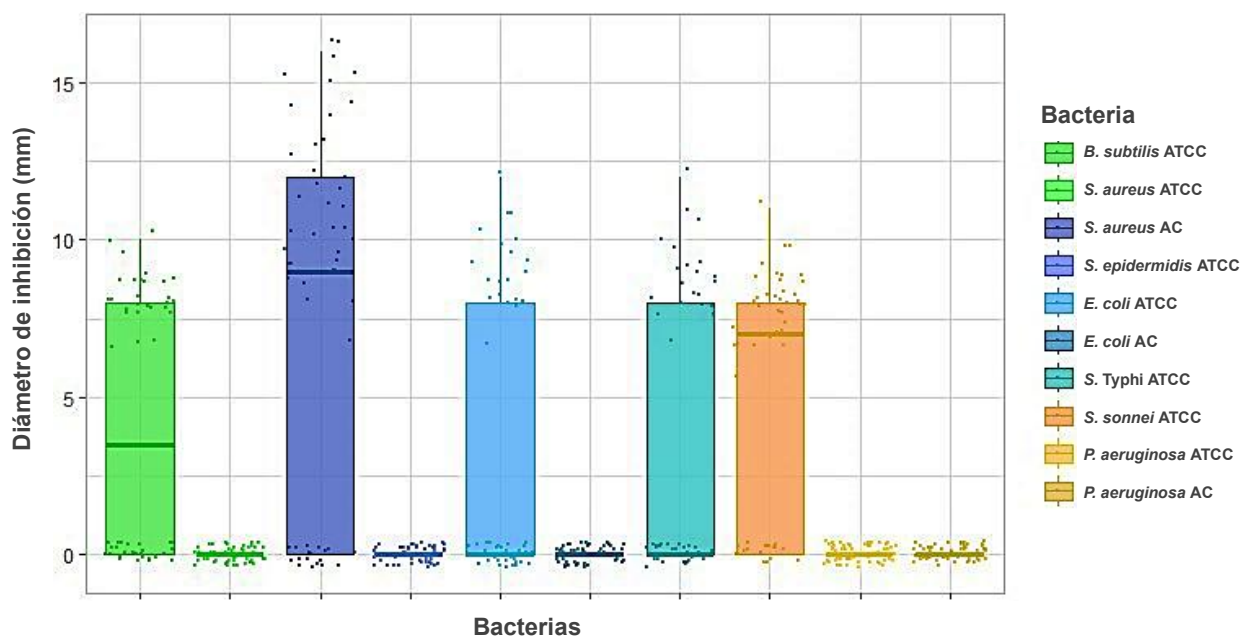


Figura 34. Actividad antibacteriana de *M. calabura* sobre las bacterias ensayadas

Por otra parte, se realizó un análisis para determinar qué extractos presentaron mayor efecto sobre las bacterias inhibidas, considerando únicamente aquellos datos con los que se presentó inhibición. La prueba de ANOVA factorial comparó el resultado obtenido del primer extracto con los otros dos (Figura 35). Se visualizó que el primer extracto, que corresponde al de acetato de etilo, tuvo una diferenciada actividad inhibitoria entre las especies bacterianas, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$), mientras que con el metanólico la inhibición sobre las bacterias fue marginalmente significativa ($p = 0.059$) y el acuoso no mostró diferencias ($p = 0.304$) (Anexo 9).

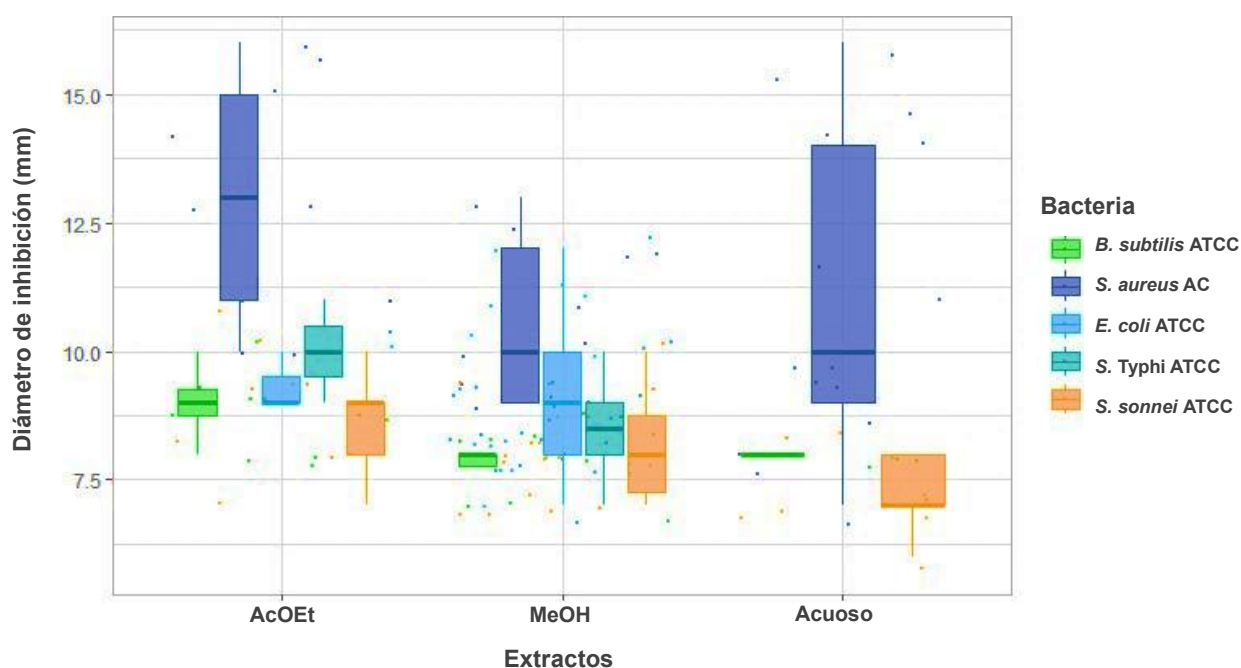


Figura 35. Actividad de los extractos activos de *M. calabura* sobre las bacterias inhibidas

7.3.1.4. Efecto combinado de la estructura vegetal y la concentración de los extractos

Para conocer la actividad específica de cada extracto, se realizó un análisis por bacteria con base en la inhibición producida, considerando la estructura vegetal y concentración del extracto. Para ello se usó una ANOVA factorial y una prueba pareada post-hoc de Tukey (Anexo 10).

7.3.1.4.1. Bacterias Grampositivas

La actividad sobre *B. subtilis* ATCC con extractos de acetato de etilo y metanol fue más potente al emplear hojas, ya que las tres concentraciones mostraron inhibición, mientras que con las cortezas de tallos sólo hubo efecto con la más alta. Los acuosos no mostraron actividad con hojas, sin embargo, con cortezas de tallos hubo efecto al emplear el extracto con la concentración más alta (Figura 36; Anexo 10).

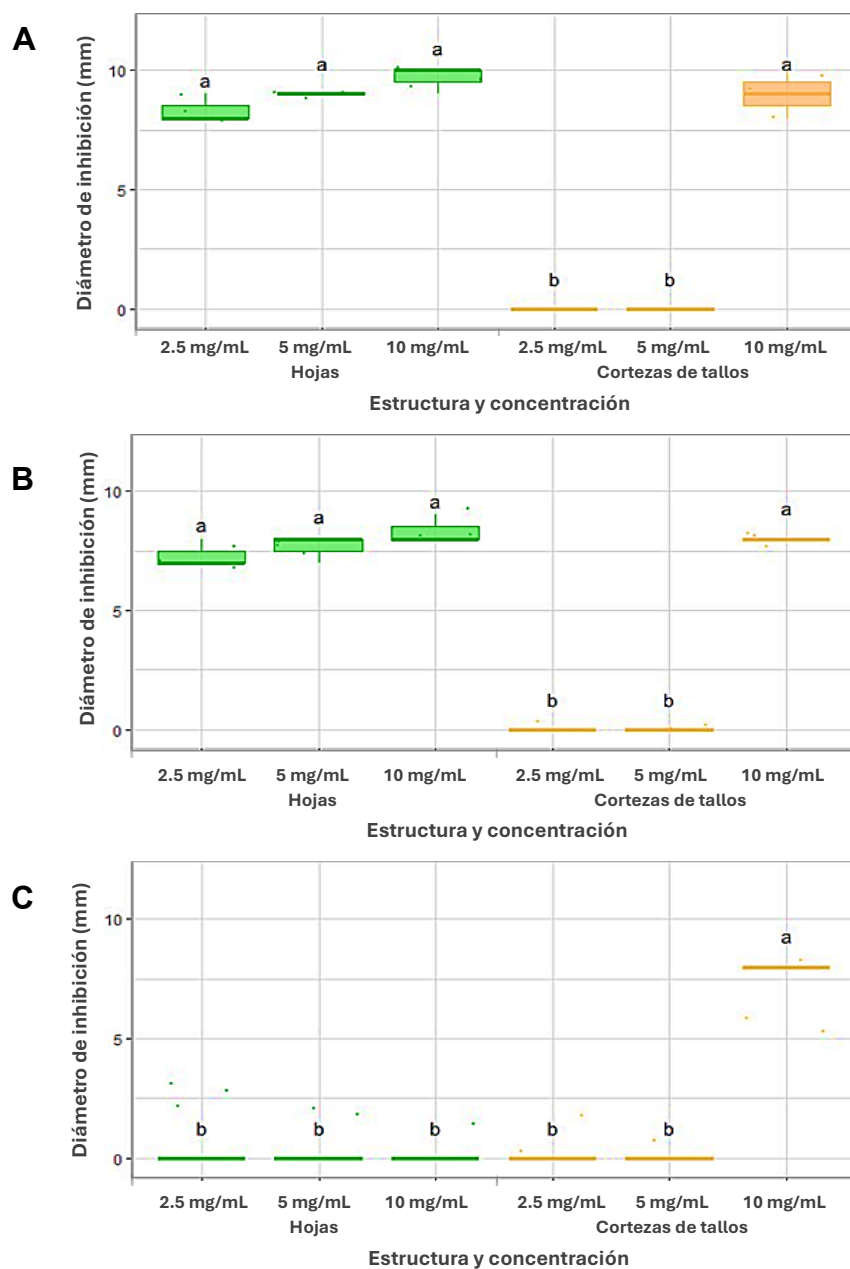


Figura 36. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de *M. calabura* sobre *B. subtilis* ATCC. A) AcOEt, B) MeOH y C) Acuoso. Las letras iguales señalan que no existen diferencias significativas entre las concentraciones, las letras distintas señalan que sí existen. Las líneas corresponden a la desviación estándar

En el caso de *S. aureus* AC, los extractos de acetato de etilo sólo inhibieron con hojas, empleando las tres concentraciones. Por su parte, los metanólicos tuvieron actividad con hojas usando las tres concentraciones y con cortezas sólo con la más alta. Finalmente, los acuosos mostraron más actividad, ya que con hojas inhibieron con 5 y 10 mg/mL, mientras que con cortezas ocurrió con las tres concentraciones. De acuerdo con la prueba pareada post-hoc de Tukey, el efecto del extracto de hojas con acetato de etilo y acuoso marcó dosis-dependencia (Figura 37; Anexo 10).

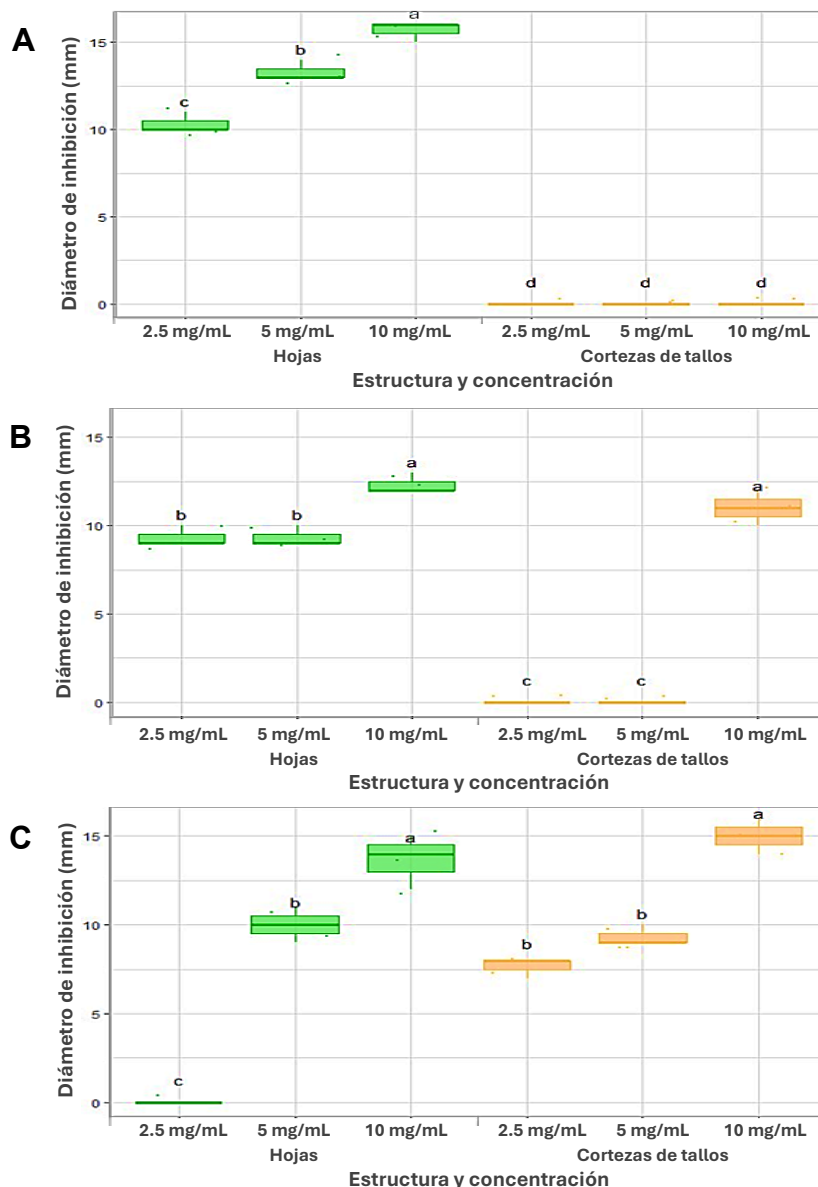


Figura 37. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de *M. calabura* sobre *S. aureus* AC.

A) AcOEt, B) MeOH y C) Acuoso. Las letras iguales señalan que no existen diferencias significativas entre las concentraciones, las letras distintas señalan que sí existen. Las líneas corresponden a la desviación estándar

7.3.1.4.2. Bacterias Gramnegativas

En el caso de *E. coli* ATCC, los extractos de acetato de etilo no tuvieron actividad con hojas, pero, con cortezas de tallos mostraron inhibición al usar una concentración de 10 mg/mL. Los metanólicos tuvieron más actividad, ya que ambas estructuras lograron inhibirla con las tres concentraciones. Con los acuosos, ninguno de los extractos tuvo actividad sobre la bacteria (Figura 38; Anexo 10).

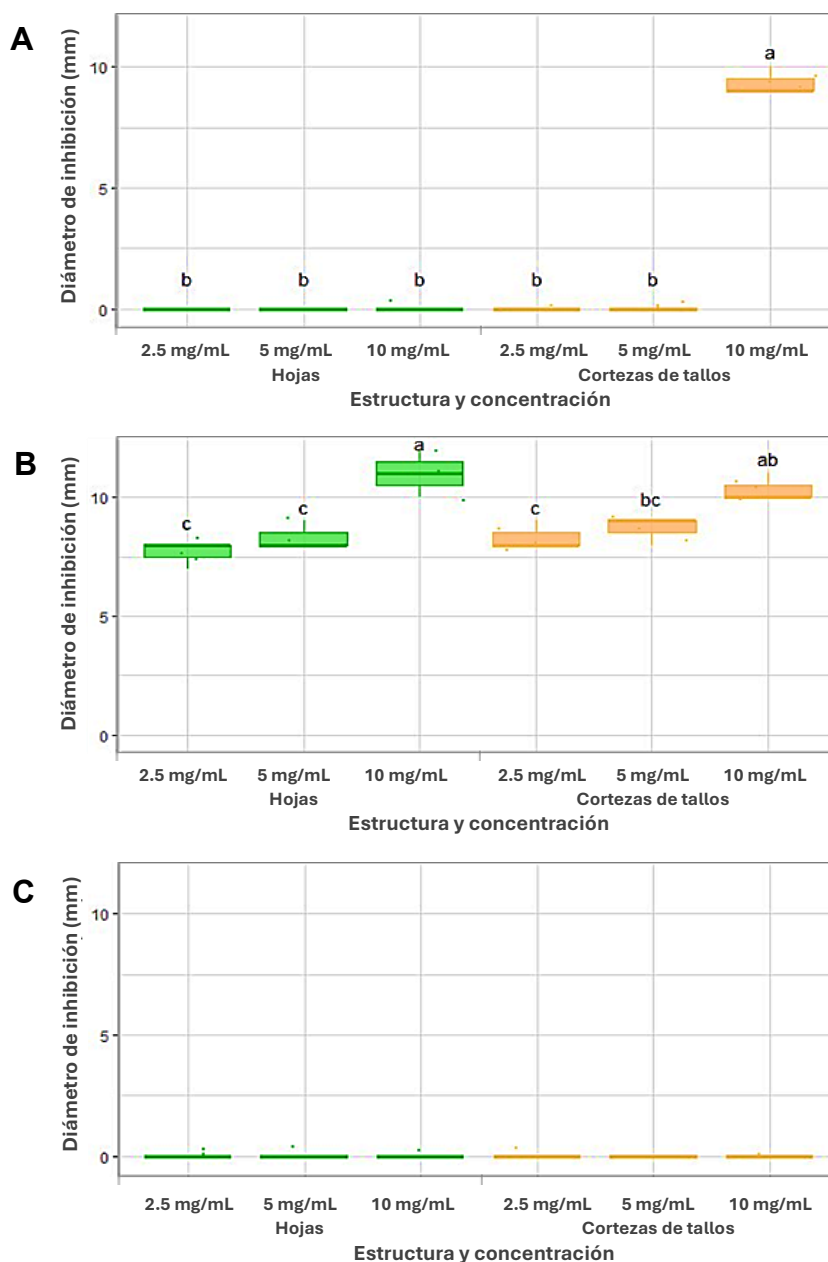


Figura 38. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de *M. calabura* sobre *E. coli* ATCC. A) AcOEt, B) MeOH y C) Acuoso. Las letras iguales señalan que no existen diferencias significativas entre las concentraciones, las letras distintas señalan que sí existen. Las líneas corresponden a la desviación estándar

La actividad sobre *S. Typhi* ATCC con extractos de acetato de etilo fue muy baja, ya que con hojas no se presentó inhibición y con cortezas de tallos sólo con la concentración más alta del extracto. Los metanólicos fueron más efectivos contra esta bacteria, ya que con ambas estructuras mostraron inhibición al emplear las tres concentraciones. Los acuosos no tuvieron actividad (Figura 39; Anexo 10).

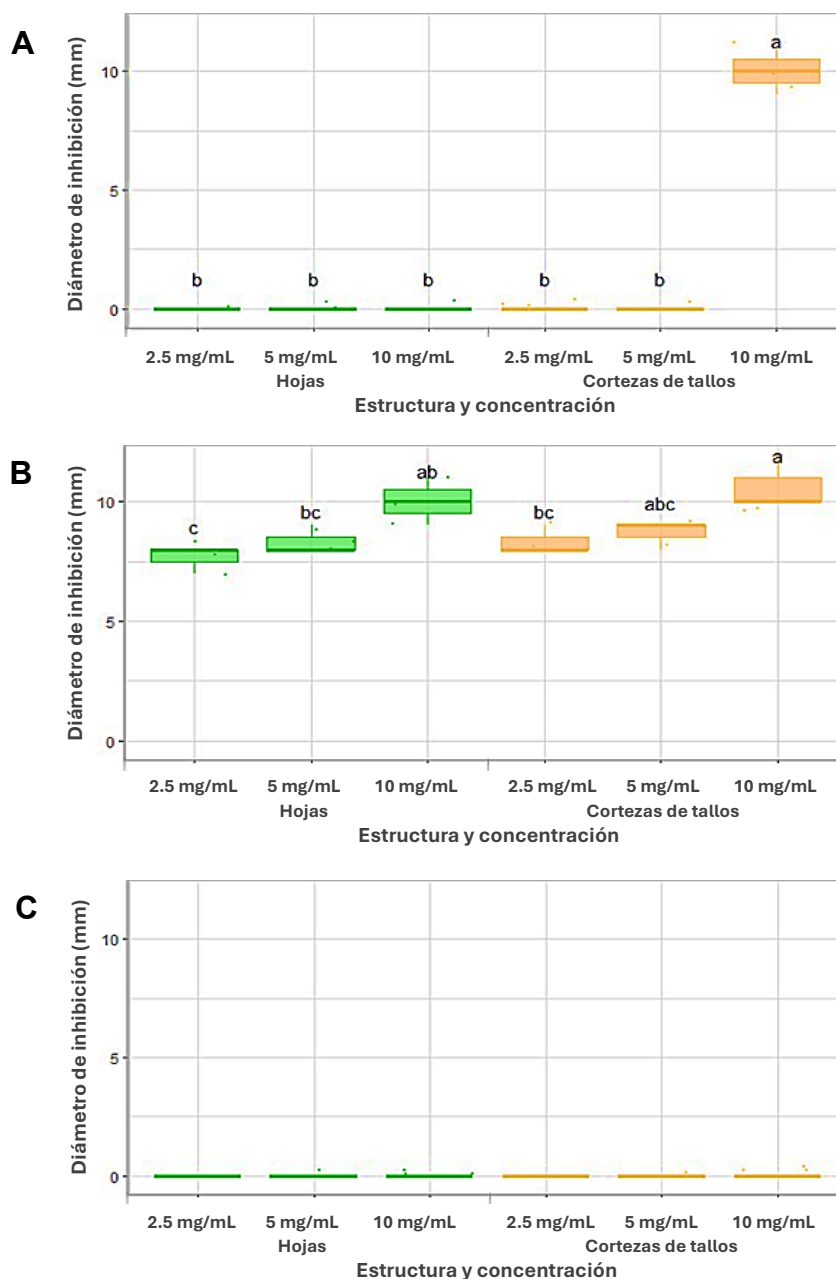


Figura 39. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de *M. calabura* sobre *S. Typhi* ATCC.

A) AcOEt, B) MeOH y C) Acuoso. Las letras iguales señalan que no existen diferencias significativas entre las concentraciones, las letras distintas señalan que sí existen. Las líneas corresponden a la desviación estándar

Finalmente, sobre *S. sonnei* ATCC el extracto de acetato de etilo y el acuoso con hojas no tuvieron actividad, mientras que los de cortezas de tallos fueron efectivos con las tres concentraciones. Por el contrario, con los metanólicos de hojas hubo inhibición con las tres concentraciones, al igual que con cortezas de tallos (Figura 40; Anexo 10).

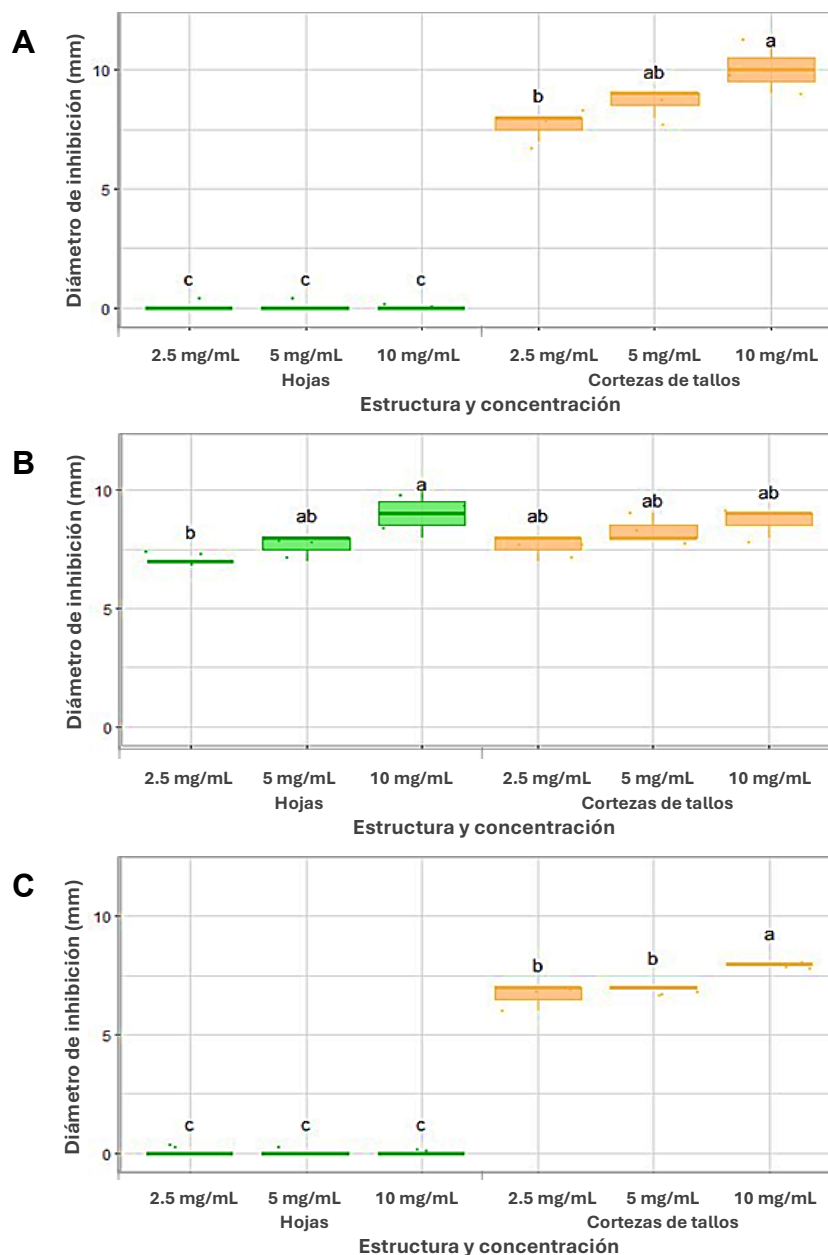


Figura 40. Actividad de los extractos de hojas y cortezas de *M. calabura* sobre *S. sonnei* ATCC.

A) AcOEt, B) MeOH y C) Acuoso. Las letras iguales señalan que no existen diferencias significativas entre las concentraciones, las letras distintas señalan que sí existen. Las líneas corresponden a la desviación estándar

7.3.2. Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR)

La eficacia de los extractos ensayados se comprobó con relación a la gentamicina en concentraciones de 2.5, 5 y 10 mg/mL, considerando que el máximo efecto sobre las cepas es el producido por el antibiótico, es decir, el 100% de inhibición.

7.3.2.1. Extractos de hojas

El PIR de los extractos de hojas fue mayor sobre *S. aureus* AC empleando los extractos activos con las tres concentraciones propuestas. Con acetato de etilo el PIR varía de 35.6 a 49.5%, mientras que con el metanólico fue de 32.2 a 39% y con el acuoso de 34 a 44% (Cuadro 3; Anexo 11).

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición relativa producido por los extractos de hojas de *M. calabura* sobre las bacterias evaluadas

Bacteria	PIR (%)		
	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
AcOEt			
<i>B. subtilis</i> ATCC	23.1	24.3	26.1
<i>S. aureus</i> AC	33.7	46.0	49.5
MeOH			
<i>B. subtilis</i> ATCC	20.4	20	23
<i>S. aureus</i> AC	30.4	32	39
<i>E. coli</i> ATCC	25.9	27	35
<i>S. Typhi</i> ATCC	22.5	24	29
<i>S. sonnei</i> ATCC	23.3	24	29
Acuoso			
<i>S. aureus</i> AC	0	34	44

PIR (%): porcentaje de inhibición relativa; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; ATCC: American Type Culture Collection; AC: aislamiento clínico.

7.3.2.2. Extractos de cortezas de tallos

Con los extractos de cortezas, el PIR con el extracto de acetato de etilo fue mayor sobre *S. sonnei* ATCC con las tres concentraciones, variando de 25.6 a 31.9%. Con el extracto de metanol, *S. aureus* AC mostró el PIR más alto de 34.7%, empleando 10

mg/mL. Por último, con el extracto acuoso el PIR más alto fue con *S. aureus* AC con las tres concentraciones, de 25.0 a 47.4% (Cuadro 4; Anexo 12).

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición relativa producido por los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* sobre las bacterias evaluadas

Bacteria	PIR (%)		
	2.5 mg/mL	5 mg/mL	10 mg/mL
AcOEt			
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	24.3
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	31.6
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	26.7
<i>S. sonnei</i> ATCC	25.6	27.7	31.9
MeOH			
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	21.6
<i>S. aureus</i> AC	0	0	34.7
<i>E. coli</i> ATCC	28.2	28.0	32.6
<i>S. Typhi</i> ATCC	24.5	24.8	30.5
<i>S. sonnei</i> ATCC	25.6	26.6	27.7
Acuoso			
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	21.6
<i>S. aureus</i> AC	25.0	32.2	47.4
<i>S. sonnei</i> ATCC	22.2	22.4	25.6

PIR (%): porcentaje de inhibición relativa; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; ATCC: American Type Culture Collection; AC: aislamiento clínico.

7.3.3. Ensayo de concentración inhibitoria mínima (CIM)

7.3.3.1. Extractos de hojas

Se evaluó la actividad de los extractos foliares de acetato de etilo, metanol y acuoso sobre las bacterias inhibidas mediante el ensayo de difusión en disco, correspondiente a especies Grampositivas como *S. aureus* AC y *B. subtilis* ATCC, así como en bacterias Gramnegativas, que fueron *E. coli* ATCC, *S. Typhi* ATCC y *S. sonnei* ATCC (Anexo 13).

En cuanto a las bacterias Grampositivas, la actividad inhibitoria del extracto de acetato de etilo presentó mayor potencia sobre *B. subtilis* ATCC con una CIM de 2.5

mg/mL, mientras que en *S. aureus* AC el efecto fue con 40 mg/mL. El extracto metanólico presentó mayor actividad, ya que frente a *B. subtilis* ATCC la CIM fue de 10 mg/mL, mientras que con *S. aureus* AC fue de 1.25 mg/mL. Finalmente, el acuoso también presentó una actividad alta sobre *S. aureus* AC, con una CIM de 1.25 mg/mL (Cuadro 5).

Por otro lado, las bacterias Gramnegativas sólo tuvieron inhibición con el extracto metanólico. Este extracto presentó mayor potencia sobre *S. sonnei* ATCC, cuya CIM fue de 5 mg/mL, mientras que en *E. coli* fue de 10 mg/mL y en *S. Typhi* de 40 mg/mL (Cuadro 5).

Cuadro 5. Valores de CIM producidos por los extractos de hojas sobre las bacterias evaluadas

Extracto	Bacteria	CIM (mg/mL)
AcOEt	<i>B. subtilis</i> ATCC	2.5
	<i>S. aureus</i> AC	40
MeOH	<i>B. subtilis</i> ATCC	10
	<i>S. aureus</i> AC	1.25
	<i>E. coli</i> ATCC	10
	<i>S. Typhi</i> ATCC	40
	<i>S. sonnei</i> ATCC	5
Acuoso	<i>S. aureus</i> AC	1.25

AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; ATCC: American Type Culture Collection; AC: aislamiento clínico.

7.3.3.2. Extractos de cortezas de tallos

El efecto de los extractos de cortezas de tallos se probó sobre las mismas especies bacterianas, tanto Grampositivas como Gramnegativas (Anexo 14).

De las bacterias Grampositivas, con el extracto de acetato de etilo sólo se reporta actividad sobre *B. subtilis* ATCC con una CIM de 2.5 mg/mL. Con el metanólico, el efecto inhibitorio ocurrió en *B. subtilis* ATCC con una concentración de 5 mg/mL, mientras que sobre *S. aureus* AC hubo mayor susceptibilidad con una CIM de 0.313

mg/mL. Por último, con el extracto acuoso probado sobre *B. subtilis* ATCC la CIM fue de 5 mg/mL y en *S. aureus* AC correspondió a 20 mg/mL (Cuadro 6).

Por otra parte, las bacterias Gramnegativas tuvieron inhibición con los tres extractos. El de acetato de etilo tuvo mayor efecto sobre *S. Typhi*, cuya CIM fue de 1.25 mg/mL, mientras que para *E. coli* ATCC fue de 2.5 mg/mL y para *S. sonnei* ATCC de 10 mg/mL. Con el extracto metanólico, la CIM sobre *E. coli* fue de 5 mg/mL, en *S. Typhi* de 2.5 mg/mL y en *S. sonnei* de 10 mg/mL. Con el acuoso únicamente se mostró efecto sobre *S. sonnei* ATCC, con una CIM de 10 mg/mL (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores de CIM producidos por los extractos de cortezas de tallos sobre las bacterias evaluadas

Extracto	Bacteria	CIM (mg/mL)
AcOEt	<i>B. subtilis</i> ATCC	2.5
	<i>E. coli</i> ATCC	2.5
	<i>S. Typhi</i> ATCC	1.25
	<i>S. sonnei</i> ATCC	10
MeOH	<i>B. subtilis</i> ATCC	5
	<i>S. aureus</i> AC	0.313
	<i>E. coli</i> ATCC	5
	<i>S. Typhi</i> ATCC	2.5
	<i>S. sonnei</i> ATCC	10
Acuoso	<i>B. subtilis</i> ATCC	5
	<i>S. aureus</i> AC	20
	<i>S. sonnei</i> ATCC	10

AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; ATCC: American Type Culture Collection; AC: aislamiento clínico.

7.4. EFECTOS DE LOS EXTRACTOS SOBRE *A. salina*

Mediante el ensayo de toxicidad se determinó la concentración letal media (CL_{50}) producida por los ocho extractos de *M. calabura*, cuyo nivel de confianza fue del 95% (Anexo 15).

7.4.1. Extractos de hojas

De acuerdo con McLaughlin *et al.* (1998), la toxicidad de los extractos de hojas con hexano fue de $CL_{50}=1\,211.5\ \mu\text{g/mL}$ y con acetato de etilo de $CL_{50}=1\,479.5\ \mu\text{g/mL}$, los cuales se clasificaron como no tóxicos, mientras que los metanólicos con valores de $CL_{50}=892.01\ \mu\text{g/mL}$ y los acuosos con una $CL_{50}=509.45\ \mu\text{g/mL}$ se consideraron moderadamente tóxicos (Figura 41).

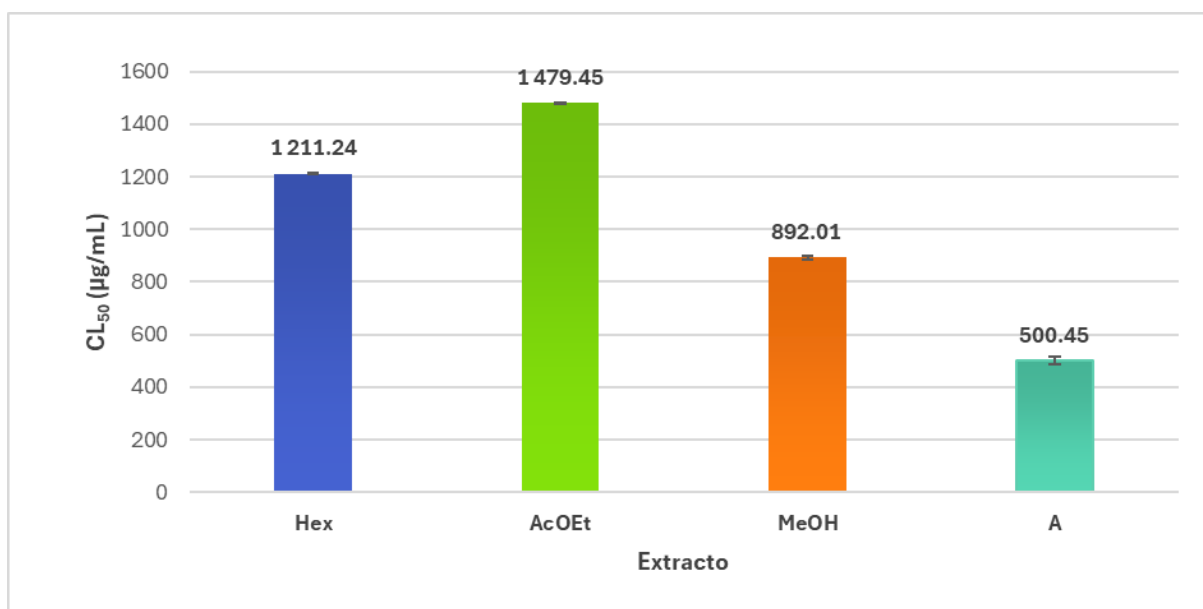


Figura 41. Concentración letal media (CL_{50}) de los extractos de hojas de *M. calabura*. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. Las líneas en las barras indican la desviación estándar

7.4.2. Extractos de cortezas de tallos

Por otro lado, los extractos de cortezas presentaron resultados similares, ya que el extracto hexánico con una $CL_{50}=5\ 086.45\ \mu\text{g/mL}$ se consideró no tóxico, mientras que el de acetato de etilo presentó una $CL_{50}=427.85\ \mu\text{g/mL}$, el metanólico con $CL_{50}=113.85\ \mu\text{g/mL}$ y el acuoso con $CL_{50}=529.97\ \mu\text{g/mL}$, que fueron clasificados como moderadamente tóxicos (Figura 42).

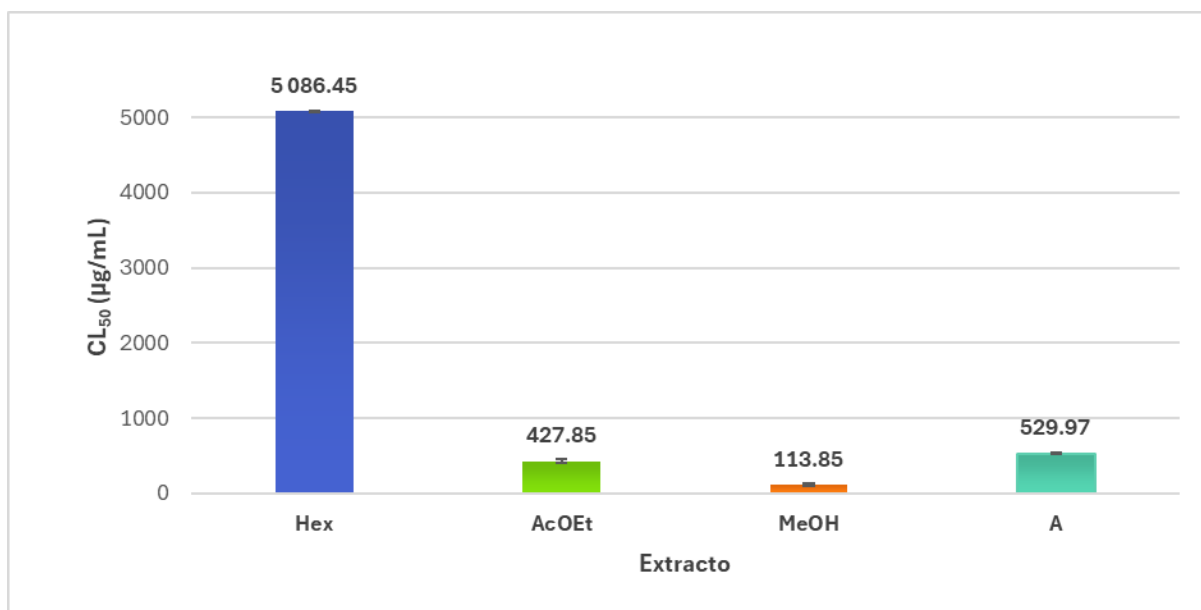


Figura 42. Concentración letal media (CL_{50}) de los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. Las líneas en las barras indican la desviación estándar

VIII. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales son el principal recurso para la extracción de compuestos naturales, con extractos que contienen sólidos que permiten conocer el rendimiento, la calidad y los principios activos de la especie utilizada para emplearlos en la determinación de la actividad biológica *in vitro* y la elaboración de productos de interés en la industria farmacéutica (Naviglio *et al.*, 2019; Popova y Bankova, 2023).

Se obtuvieron ocho extractos orgánicos de las hojas de *M. calabura*, con rendimientos de 2.96% con hexano, 2.90% con acetato de etilo y 9.56% con metanol (Figura 26; Anexo 1). Estudios como el de Nilamsari *et al.* (2023) no coinciden con los resultados de este estudio, al reportar 7.05% con el extracto hexánico de la misma especie y estructura, utilizando 130 g más del material vegetal que en este estudio, extraído por maceración. Estas diferencias pueden deberse al método de extracción usado, ya que la maceración no emplea calor, lo que permite una extracción más eficiente de compuestos termosensibles, incrementando la cantidad de sólidos en cada uno de los extractos (Sankeshwari *et al.*, 2018; Naviglio *et al.*, 2019).

En cuanto a los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*, los rendimientos alcanzados fueron de 0.76% con hexano, 1.95% con acetato de etilo y 7.32% con metanol, siendo menores a los obtenidos con las hojas (Figura 26; Anexo 1). Con relación a esta estructura, Chaudhari *et al.* (2022) realizaron, utilizando un Soxhlet, extractos orgánicos de cortezas de *M. calabura* empleando 52.8 g de material vegetal, obteniendo rendimientos mayores con hexano (2.36%) y con acetato de etilo (5.21%), mientras que con metanol su rendimiento fue de 6.45%, el cual es menor al registrado en esta investigación.

En los extractos de ambas estructuras se observa que entre más polar es el solvente empleado, existe un mayor rendimiento en la extracción, sin embargo, las diferencias entre los rendimientos de cada solvente siguen siendo amplias, lo cual se puede atribuir a otros factores como la relación sólido-solvente o las características ambientales del lugar de recolección, que influyen en la cantidad de compuestos químicos sintetizados. Además, dichas investigaciones no indican la etapa fenológica de la planta al momento de la colecta del material vegetal, lo que es importante de

considerar debido a que cada una presenta características bioquímicas distintas, lo que altera la composición de los compuestos activos en la planta (Herrera, 2018).

Por otra parte, los extractos acuosos fueron los de mayor rendimiento en comparación con cada uno de los orgánicos, las hojas con un total de 12.57% y 9.29% con cortezas (Figura 26; Anexo 1), lo que sugiere una alta proporción de compuestos polares debido a la capacidad del agua para romper los enlaces de hidrógeno en compuestos hidrofílicos y solubilizarlos, contribuyendo a un mayor rendimiento de extracción (Voet y Voet, 2006). Además, la extracción se realizó mediante la técnica de decocción, que de acuerdo con Naviglio *et al.* (2019) permite extraer compuestos con alta eficiencia y buena calidad, aumentando el rendimiento del extracto.

En cuanto al perfil fitoquímico, en este estudio se han identificado siete grupos de MS en los extractos foliares de *M. calabura* (Figura 27; Anexo 2 y 3). En el hexánico de hojas se encontraron fenoles y LS, lo cual difiere con lo reportado por Chaudhari *et al.* (2020), quienes reportaron flavonoides y terpenos en extractos del mismo tipo. Por otro lado, con acetato de etilo únicamente se encontraron fenoles, lo cual coincide con la investigación de dichos autores.

En el extracto metanólico de hojas se encontró la mayor cantidad de compuestos químicos, como son alcaloides, esteroides, fenoles, glucósidos, LS, saponinas y taninos condensados. En el estudio realizado por Sibi *et al.* (2012) se registraron glucósidos en extractos metanólicos de *M. calabura*, lo que coincide con lo reportado en este estudio. Los fenoles también fueron reportados por Chaudhari *et al.* (2020), al igual que los alcaloides y saponinas, que también fueron identificados por Desrini *et al.* (2018) y Hassan *et al.* (2020). Por otro lado, los extractos acuosos de hojas indicaron la presencia de fenoles, flavonas, glucósidos y saponinas, lo que coincide con el reporte publicado por Sibi *et al.* (2012), quienes encontraron glucósidos en extractos del mismo tipo, pero difiere con lo mencionado por Fatimah y Santoso (2020), ya que en su estudio encontraron alcaloides, flavonoides y taninos.

En cuanto a las cortezas de tallos, en esta investigación se determinaron ocho grupos de MS (Figura 28; Anexo 2 y 3). En el extracto hexánico se encontraron fenoles, esteroides, glucósidos y LS, lo que no coincide con lo reportado por Chaudhari *et al.*

(2022), cuyo perfil fitoquímico del extracto hexánico indicó la presencia de flavonoides. Por otro lado, con acetato de etilo se reportó la mayor cantidad de compuestos en cortezas, incluyendo alcaloides, esteroides, fenoles, glucósidos, LS y taninos hidrolizables, lo que concuerda con el estudio de Chaudhari *et al.* (2022), quienes indicaron la presencia de alcaloides y fenoles.

En el extracto metanólico de cortezas de tallos se encontraron fenoles, glucósidos, LS, saponinas y taninos hidrolizables, lo cual es similar al reporte de Sibi *et al.* (2012), ya que reportaron compuestos como glucósidos y taninos en extractos metanólicos de la misma especie y estructura. Estos resultados también coinciden con los de Chaudhari *et al.* (2022), puesto que indican la presencia de fenoles y saponinas. En cuanto a los acuosos de cortezas, en este trabajo hubo presencia de alcaloides, fenoles, flavonas, glucósidos y saponinas, mientras que el reporte de Sibi *et al.* (2012) sólo coincide con la presencia de glucósidos. Cabe señalar que hasta el momento no hay más reportes del perfil fitoquímico de extractos acuosos realizados con hojas.

Los resultados del análisis fitoquímico revelan que la composición de cada extracto tiene diferencias, lo que no es extraño ya que la solubilidad de los compuestos varía según la naturaleza de cada solvente (Chaudhari *et al.*, 2022). Dicho esto, es valioso resaltar que en los extractos de polaridad más alta de *M. calabura*, como en el metanólico y el acuoso, se identificaron mayor cantidad de grupos de MS, lo que sugiere una abundante presencia de compuestos polares producidos por la planta.

Además, las diferencias entre los grupos de MS identificados en cada extracto pueden deberse a las actividades fisiológicas y biosintéticas de la planta, las cuales son responsables de la presencia o no de ciertos compuestos químicos en órganos vegetales específicos (Sibi *et al.*, 2012). Por ello es importante reconocer el papel de los factores ambientales que influyen en el tipo y en la cantidad de los fitocompuestos, ya que como mencionan Osorio (2009) y Cruz *et al.* (2016), el crecimiento y desarrollo vegetal, así como la naturaleza y cantidad de los compuestos de las plantas, dependen de factores como la hora, temperatura, precipitación, niveles de dióxido de carbono, orientación geográfica, duración del día, altitud y presencia de herbívoros o patógenos. Aunado a esto, la época de recolección de las muestras vegetales es crucial, pues el

tipo y la cantidad de los compuestos químicos fluctúan a lo largo del año, lo que podría explicar las diferencias observadas en los resultados en comparación con las investigaciones mencionadas.

La actividad antibacteriana primero se evaluó mediante ensayos de difusión en disco, el cual es un método para evaluar el potencial de un agente químico sobre distintos microorganismos (Araya *et al.*, 2015). El efecto global de los extractos de *M. calabura* ocurrió significativamente sobre cinco bacterias ($p < 0.05$), tanto Grampositivas como Gramnegativas, siendo activos los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso.

En el caso de las Grampositivas, los extractos foliares de acetato de etilo inhibieron a *B. subtilis* ATCC y *S. aureus* de aislamiento clínico (AC), produciendo halos de 9.7 y 15.7 mm, respectivamente, al emplear una concentración de 10 mg/mL del extracto (Anexo 4). Estudios similares no han reportado la actividad de estos extractos sobre dichas bacterias, sin embargo, algunos trabajos como el de Sibi *et al.* (2012) han demostrado que los MS presentes en extractos de acetato de etilo de *M. calabura* poseen capacidad antibacteriana sobre distintos aislamientos clínicos, incluidas algunas especies de bacterias Grampositivas.

Los extractos metanólicos de hojas fueron más eficaces en este estudio, con actividad sobre *B. subtilis* ATCC (8.3 mm) y *S. aureus* AC (12.3 mm), empleando una concentración de 10 mg/mL del extracto. Sekar y Abdul (2017) también probaron extractos metanólicos de hojas de esta especie sobre *S. aureus*, sin embargo, el diámetro de los halos es menor, con tan sólo 4 mm con la misma concentración. Por su parte, Hassan *et al.* (2022) también analizaron a *S. aureus* ATCC con este mismo tipo de extracto y sus halos de inhibición de 14.33 mm de inhibición fueron más grandes, aunque emplearon una concentración mayor del extracto de 1 000 mg/mL.

Los extractos acuosos de hojas únicamente inhibieron a *S. aureus* AC, con halos más grandes que tuvieron un diámetro de 14 mm con 10 mg/mL del extracto. En investigaciones realizadas con esta planta no han empleado el extracto acuoso de *M. calabura* frente a bacterias del género *Staphylococcus*, por lo que se trata de evidencia

nueva de la capacidad antibacteriana de estos extractos contra este género de bacterias.

Contra las cepas Gramnegativas, los extractos metanólicos de hojas fueron los únicos con actividad inhibitoria. El efecto sobre *E. coli* ATCC fue de hasta 11 mm de inhibición, mientras que en *S. Typhi* fue de 10 mm y en *S. sonnei* ATCC de 9 mm, empleando 10 mg/mL del extracto en los tres casos. Sekar y Abdul (2017) realizaron extractos metanólicos con hojas de la misma planta y los probaron sobre *E. coli* mediante difusión en agar pero encontraron resultados diferentes, ya que reportan halos de 14.17 mm, usando la misma concentración. Hassan *et al.* (2017) lo realizaron sobre *S. sonnei* ATCC, sin embargo, los resultados fueron mayores, ya que reportaron halos de 10.66 mm usando una concentración más alta de 1 000 mg/mL.

Por otra parte, la actividad de las cortezas sobre bacterias Grampositivas con extractos de acetato de etilo ocurrió únicamente sobre *B. subtilis* ATCC, los halos medían 9 mm al emplear 10 mg/mL del extracto. Los extractos metanólicos fueron más efectivos, ya que frente a *B. subtilis* ATCC se observaron halos de 8 mm y frente a *S. aureus* AC de 11 mm, usando en ambos casos la concentración más alta. Finalmente, los extractos acuosos también inhibieron a ambas bacterias, sin embargo, los halos más grandes sobre *B. subtilis* ATCC medían 8 mm, mientras que en *S. aureus* AC alcanzaron 14.7 mm, usando en ambos casos la concentración de 10 mg/mL. Estudios como el de Sibi *et al.* (2012) y Chaudhari *et al.* (2022) han reportado el uso de extractos de acetato de etilo, metanol y acuosos con cortezas de *M. calabura*, probándolos sobre distintos microorganismos, sin embargo, ninguno de los trabajos menciona la evaluación de estos sobre las especies de bacterias que fueron sensibles en esta investigación.

En cuanto a las Gramnegativas, el extracto de cortezas con acetato de etilo inhibió a *E. coli* ATCC con un diámetro de 10 mm, a *S. Typhi* ATCC con 9.3 mm y a *S. sonnei* ATCC con 10 mm, empleando 10 mg/mL del extracto. Esto es similar a lo reportado por Chaudhari *et al.* (2022), quienes realizaron pruebas usando extractos de cortezas de *M. calabura* con acetato de etilo pero únicamente frente a *E. coli*,

encontrando halos de 9 y 11 mm con concentraciones de 50 y 100 mg/mL del extracto, respectivamente.

Por otro lado, con los extractos metanólicos de cortezas se reportó actividad sobre *E. coli* ATCC con halos de inhibición de 10.3 mm, en *S. Typhi* de 10.7 mm y en *S. sonnei* ATCC de 8.7 mm, usando 10 mg/mL del extracto. Mientras tanto, con los acuosos sólo se presentó actividad frente a *S. sonnei* ATCC, con halos de hasta 8 mm con la mayor concentración del extracto. En ambos casos, sólo la investigación de Sibi *et al.* (2012) menciona el uso de este tipo de extractos de *M. calabura* sobre distintas bacterias, sin embargo, no reportan el efecto sobre las especies ensayadas en esta investigación. Lo anterior resalta la importancia de evaluar la eficacia de los extractos acuosos sobre bacterias asociadas a enfermedades infecciosas, ya que reflejan las prácticas de la medicina tradicional y permiten comprender sus mecanismos de acción, optimizar su uso y su aplicación en el desarrollo de alternativas terapéuticas.

La comparación realizada de los extractos de hojas y cortezas de tallos a distintas concentraciones demostró que las cortezas poseen más actividad frente a las bacterias, lo cual no es de extrañar ya que estos tuvieron mayor número de grupos de MS (Anexo 2), por lo que su potencial antibacteriano se ve incrementado. En el caso de *S. aureus* AC frente a los extractos foliares de acetato de etilo y acuoso, se observó que existe un efecto dosis-dependiente, ya que al incrementar la concentración se produce más inhibición en el crecimiento de las bacterias, lo cual se interpretó mediante la prueba pareada post-hoc de Tukey. Para ello, Abdel-Rahman y Kauffman (2004) mencionan que el efecto de una sustancia sobre su blanco de acción depende de la concentración, mientras que Peper (2009) demostró que las variaciones en las dosis de los fármacos pueden causar efectos grandes en los organismos donde se administra, lo cual pudo haber ocurrido en el ensayo realizado sobre dicha bacteria.

Para complementar el análisis de los resultados, se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición relativa (PIR) (Cuadros 3 y 4), el cual permite comparar la eficacia antimicrobiana de los extractos vegetales activos frente a un control positivo, usando la gentamicina. De acuerdo con Santa-María *et al.* (2023), este valor es útil para estimar la potencia relativa de los extractos independientemente del tipo de

bacteria evaluada, expresándose como el porcentaje del diámetro de inhibición del extracto respecto al antibiótico de referencia. En este estudio, el porcentaje mayor con extractos de hojas fue de 49.5% sobre *S. aureus* AC, usando el extracto de acetato de etilo a una concentración de 10 mg/mL, mientras que con cortezas de tallos fue de 47.5% con el extracto acuoso sobre la misma bacteria y concentración. Dicho lo anterior, todos los extractos activos tuvieron un porcentaje menor al 50%, lo que indica una eficacia baja de estos, sugiriendo que a pesar de que los extractos mostraron actividad antimicrobiana, su potencia es menor que la del antibiótico comercial.

Se realizaron ensayos en placas de micropocillos para determinar la concentración inhibitoria mínima de cada extracto sobre las bacterias (Cuadros 5 y 6). Con los extractos de hojas probados en bacterias Grampositivas, la CIM sobre *B. subtilis* ATCC fue de 2.5 mg/mL, empleando el extracto de acetato de etilo, mientras que para *S. aureus* AC fue de 1.25 mg/mL con el metanólico. Estos resultados coinciden con Zakaria *et al.* (2010) y Sufian *et al.* (2013), quienes probaron extractos metanólicos de hojas contra cepas de colección de *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM, ATCC), la cual fue igual de 1.25 mg/mL, mientras que para *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM, ATCC) reportaron una CIM de 2.5 mg/mL. Hassan *et al.* (2022) también probaron este extracto sobre *S. aureus* ATCC pero sus resultados difieren, ya que reportan una CIM más alta de 7.81 mg/mL.

Los extractos foliares también fueron probados sobre bacterias Gramnegativas, en donde las CIM para *E. coli* ATCC, *S. Typhi* ATCC y *S. sonnei* ATCC fueron de 10, 40 y 5 mg/mL, respectivamente. Zakaria *et al.* (2010) y Sufian *et al.* (2013) reportaron el uso de extractos metanólicos de hojas de *M. calabura* contra *E. coli* ATCC, y los resultados fueron diferentes al observar una CIM de 5 mg/mL en ambos estudios. Por otra parte, Hassan *et al.* (2022) probaron el mismo extracto frente a *S. sonnei* ATCC, en donde el resultado también difiere, ya que inhibieron a la bacteria con 62.5 mg/mL del extracto.

Con los extractos de cortezas sobre bacterias Grampositivas, la CIM sobre *B. subtilis* ATCC fue de 2.5 mg/mL al emplear el extracto de acetato de etilo, mientras que contra *S. aureus* fue de 0.313 mg/mL con el metanólico. Con relación a las

Gramnegativas, *E. coli* ATCC presentó una CIM de 2.5 mg/mL y *S. Typhi* ATCC de 2.5 mg/mL, ambas con el extracto de acetato de etilo, mientras que para *S. sonnei* ATCC la CIM fue de 10 mg/mL, pero en este caso usando los tres extractos activos.

Para esto, no se ha reportado la actividad de ningún extracto de cortezas sobre las bacterias evaluadas mediante el ensayo de CIM, a excepción de Cruiz *et al.* (2016) quienes probaron el extracto metanólico de cortezas sobre *E. coli*, sin embargo, no encontraron actividad inhibitoria. Por tanto, estos resultados abren paso a nuevas investigaciones para comparar la actividad antibacteriana mediante este ensayo con dicha estructura.

De acuerdo con lo anterior, el potencial antibacteriano que presentaron los extractos de *M. calabura* se debe a la variedad de MS encontrados, los cuales ejercen su acción mediante diferentes mecanismos contra las bacterias. Todos los extractos activos indicaron la presencia de fenoles, compuestos conocidos por su potente actividad antibacteriana. Según Abud-Blanco *et al.* (2015), los fenoles tienen actividad bacteriostática o bactericida al destruir la pared, alterar la membrana celular y desactivar los sistemas enzimáticos esenciales para el metabolismo bacteriano, siendo más efectivos sobre bacterias Grampositivas debido a la estructura accesible de su pared celular, aunque también muestran efectos sobre Gramnegativas.

Las LS son otros compuestos con alta actividad antibacteriana, las cuales estuvieron presentes en los extractos hexánicos y metanólicos de hojas, así como en los de acetato de etilo y metanol de cortezas de tallos. Estos compuestos poseen un grupo α -metileno- γ -lactona que reacciona con proteínas esenciales del metabolismo bacteriano, causando alquilación irreversible, ya que se unen a grupos sulfhidrilo de proteínas, enzimas y factores de transcripción bacteriano, lo que impide su función y desorganiza procesos metabólicos clave como la síntesis de proteínas y la replicación celular (Amorim *et al.*, 2013).

Extractos como el metanólico de hojas, y el de acetato de etilo y metanol de cortezas, contenían compuestos fenólicos conocidos como taninos, que inhiben diversas enzimas microbianas extracelulares, interfieren en la fosforilación oxidativa

implicada en la generación de energía celular y alteran la permeabilidad de la membrana celular, convirtiéndolos en tóxicos para las bacterias (Hassan *et al.*, 2022).

Los alcaloides son otro grupo de compuestos altamente efectivos contra bacterias, encontrados en los extractos foliares con metanol, así como en los de cortezas con acetato de etilo y acuosos. Estos compuestos son capaces de inhibir la síntesis de ácidos nucleicos de las bacterias al bloquear las enzimas claves en el proceso de replicación celular, como la dihidrofolato reductasa y la topoisomerasa, esenciales para la síntesis de ADN y replicación celular (Gurning *et al.*, 2021).

Otros grupos de MS, como los glucósidos, fueron abundantes en todos los extractos de ambas estructuras botánicas, a excepción del extracto foliar con acetato de etilo. Estas moléculas tienen la capacidad de alterar la pared o membrana celular de las bacterias, interfiriendo directamente en su crecimiento y provocando su debilitamiento o muerte (Arauz, 1998).

Finalmente, las saponinas también han demostrado ser eficaces en la eliminación de microorganismos, incluidas las bacterias, y fueron identificados en los extractos metanólicos y acuosos de ambas estructuras vegetales. Su acción ocurre mediante la degradación de la pared celular, seguida de la disrupción de la membrana citoplasmática, provocando la expulsión del contenido celular. Además, se ha reportado que forman complejos con esteroides en las membranas celulares, creando poros que alteran la permeabilidad de la membrana y provocan la lisis celular (Díaz, 2009; Hassan *et al.*, 2022).

Cabe destacar que las diferencias respecto a la actividad antibacteriana observadas en este estudio pueden deberse a factores que involucran tanto el origen de las cepas como los tipos de extractos y los compuestos presentes. Es importante distinguir que las cepas de colección, como las bacterias provenientes de la American Type Culture Collection (ATCC), son aquellas que se obtienen a partir de sistemas de preservación para mantener organismos puros y viables en el tiempo, asegurando su estabilidad genética, sus características fenotípicas originales y sirviendo de referencia en el ámbito científico (Castro, 2020). Al ser cepas de referencia y no estar expuestas

a ambientes clínicos o antibióticos, la resistencia natural que presentan es menor, lo que explicaría una mayor susceptibilidad de estas frente a los extractos de *M. calabura*.

Por otro lado, las cepas de aislamiento clínico se obtienen de muestras biológicas de pacientes, como sangre, orina o esputo, durante una infección. A diferencia de las ATCC, los aislamientos pueden presentar variabilidad genética, tener mutaciones o incluso resistencia a antibióticos, por lo que suelen usarse para estudiar el comportamiento bacteriano en un contexto clínico real, entender mejor las infecciones humanas y desarrollar nuevos tratamientos. Usualmente su resistencia es mayor, ya que han estado expuestas a múltiples tratamientos antibióticos, sin embargo, Akram *et al.* (2022) menciona que existen casos en los que algunos genes de resistencia en bacterias aisladas no forman un complejo estable con los plásmidos asociadas a dicha resistencia, por lo que tienden a perderse en subcultivos *in vitro*, lo cual hace que la cepa se vuelva sensible a ciertos compuestos antibacterianos, lo cual pudo ocurrir con la cepa de *S. aureus* obtenida por aislamiento clínico.

Estas diferencias también pueden suceder en respuesta a la variabilidad en la composición química del extracto por la procedencia de las plantas, así como a las condiciones y métodos de extracción empleados. Como se mencionó anteriormente, las condiciones ambientales de la zona de colecta influyen en la naturaleza de los compuestos químicos producidos, lo que podría señalar las diferencias en la actividad antibacteriana observadas en este estudio con los de otras investigaciones (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022)

Cabe mencionar que en algunos casos la eficacia antibacteriana no depende sólo de los compuestos bioactivos sino también de la interacción entre ellos, pues existen interacciones sinérgicas entre los componentes de los extractos de plantas que potencian su acción al combinarse, por lo que el extracto puede ser más efectivo, pero en otros casos puede ocurrir antagonismo, en donde dos sustancias se combinan y se pierde el efecto de dicho compuesto (Casanova y Costa, 2017; Ritter *et al.*, 2024).

El ensayo de toxicidad se realizó empleando nauplios de *A. salina* expuestos a diferentes concentraciones de los extractos orgánicos y acuosos de hojas y cortezas de tallos de *M. calabura* (Anexo 15). De acuerdo con la escala de toxicidad de

McLaughlin *et al.* (1998), los extractos foliares de hexano y de acetato de etilo fueron no tóxicos, mientras que los metanólicos ($CL_{50}=892.01 \mu\text{g/mL}$) y acuosos ($CL_{50}=500.45 \mu\text{g/mL}$) se interpretaron como moderadamente tóxicos (Figura 33). En el estudio realizado por Fatimah y Santoso (2020) se obtuvo un extracto acuoso de hojas de *M. calabura* que contenía alcaloides, flavonoides y taninos, y se probó sobre *A. salina*. Los resultados coinciden con los de este estudio, al obtener una $CL_{50}= 621.25 \mu\text{g/mL}$, valor que también se clasifica como moderadamente tóxico, no obstante, el perfil fitoquímico no coincide con el reportado en la presente investigación, el cual señala la presencia de fenoles, glucósidos y saponinas.

Dicho lo anterior, los alcaloides identificados por Fatimah y Santoso (2020), presentan acciones fisiológicas marcadas en organismos animales, incluyendo la toxicidad, así como algunos efectos hepatotóxicos y cancerígenos. Sin embargo, en el extracto acuoso obtenido en esta investigación se encontraron saponinas, las cuales tienen la capacidad de inducir la muerte celular mediante rutas programadas o no programadas, lo cual está mediado por la concentración en la que se encuentren (Frías y Rosales, 2023). Por tanto, aunque el perfil fitoquímico difiere en ambos estudios, la presencia de compuestos asociados a la actividad tóxica podría explicar la similitud en los niveles de toxicidad observados.

Por otra parte, el extracto hexánico de cortezas resultó no tóxico, mientras que el de acetato de etilo ($CL_{50}=427.85 \mu\text{g/mL}$), metanol ($CL_{50}=113.85 \mu\text{g/mL}$) y acuoso ($CL_{50}=529.97 \mu\text{g/mL}$) se consideraron moderadamente tóxicos (Figura 34). En este caso, no se han realizado estudios empleando esta estructura para evaluar la toxicidad sobre *A. salina*, lo que resalta la importancia de estos hallazgos como una contribución inicial al conocimiento de los posibles efectos adversos de la planta.

IX. CONCLUSIONES

- La estructura vegetal de *M. calabura* con mayor rendimiento fue la hoja, con un total de 27.99%, mientras que la corteza de tallos alcanzó un 19.32%.
- El rendimiento de los extractos metanólicos fue el mayor de los orgánicos, sin embargo, los acuosos los superaron por un 3.01% en hojas y 1.97% en cortezas de tallos.
- Tanto en los extractos de hojas como en los de cortezas de tallos se identificaron un total de ocho grupos de MS, siendo comunes los alcaloides, esteroides, fenoles, flavonas, glucósidos, lactonas sesquiterpénicas y saponinas.
- El grupo de metabolitos secundarios correspondientes a los fenoles estuvieron presentes en los ocho extractos realizados.
- Los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso de ambas estructuras fueron los que presentaron actividad inhibitoria sobre cinco bacterias: las Grampositivas que fueron *B. subtilis* ATCC y *S. aureus* AC, y las Gramnegativas correspondientes a *E. coli* ATCC, *S. Typhi* ATCC y *S. sonnei* ATCC.
- Los extractos metanólicos de ambas estructuras fueron capaces de inhibir a las cinco bacterias.
- Las cortezas de tallos tuvieron mayor actividad, ya que cada uno de los extractos probados (AcOEt, MeOH y acuoso) inhibieron a más bacterias que los obtenidos a partir de hojas con los mismos solventes.
- La bacteria más sensible fue *S. aureus* AC, observando halos de 7.7 a 15.7 mm, mientras que *S. sonnei* tuvo los halos más pequeños de tan sólo 7 a 10 mm.
- Los extractos foliares de acetato de etilo y acuoso mostraron dosis-dependencia frente a *S. aureus* AC.

- Con relación a la inhibición producida por el extracto, comparado con la gentamicina sobre las bacterias ensayadas, el extracto de hojas de acetato de etilo mostró el porcentaje de inhibición relativa más alto de 49.5% sobre *S. aureus* AC.
- Las CIM más bajas se presentaron al emplear los extractos metanólicos sobre *S. aureus* AC, siendo de 1.25 mg/mL con hojas y de 0.313 mg/mL con cortezas de tallos.
- Los extractos hexánico y de acetato de etilo con hojas, así como el hexánico de cortezas de tallos, fueron considerados no tóxicos.
- La presente investigación respalda de forma experimental el potencial antibacteriano de *M. calabura*, especie empleada en la medicina tradicional de la república mexicana. Así mismo, reconoce el papel de los grupos de MS presentes en hojas y cortezas de tallos como compuestos químicos con efectos biológicos.

X. RECOMENDACIONES

- Implementar pruebas cuantitativas para los MS presentes en la especie y así poder relacionar la concentración de estos con la actividad biológica.
- Realizar más repeticiones en la prueba de difusión en agar para fortalecer la validez estadística.
- Llevar a cabo pruebas antibacterianas sobre microorganismos que se encuentren asociados a otras enfermedades de tipo infeccioso.
- Realizar pruebas de toxicidad sobre líneas celulares o con modelos animales *in vivo* para complementar este estudio.
- Difundir el conocimiento obtenido en esta investigación acerca de *M. calabura* para reconocer el saber tradicional de los pueblos originarios y comunidades mestizas a fin de lograr un mejor aprovechamiento de las propiedades de la planta.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abarca-Vargas, R. y Petricevich, V. L. 2019. Importancia biológica de los compuestos fenólicos. *Inventio*. 14 (34): 33-38.
- Abdel-Rahman, S. M. & Kauffmann, R. E. 2004. The Integration of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Understanding Dose-Response. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 44: 111-136.
- Abdulla, N. & Muyassar, A. 2012. Incidence and Resistotyping Profiles of *Bacillus subtilis* Isolated from Azadi Teaching Hospital in Duhok City, Iraq. *Materia Socia Medica*. 24 (3): 194-197.
- Abud-Blanco, K., Bustos-Blanco, L., Covo-Morales, E. y Fang-Mercado, L. C. 2015. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos sulfonados en el sistema de conductos radiculares: revisión sistemática. *Revista Ciencia y Salud Virtual*. 7 (2): 53-60.
- Acero, N., González-Rosende, M. E. y Muñoz-Mingarro, D. 2021. Principios activos de las drogas vegetales. Metabolitos secundarios. Propiedades. En: Castillo, E. y Martínez, I. (Eds). Manual de fitoterapia. Elsevier. Barcelona, España.
- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D. y Benítez, R. 2016. Saponinas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 45 (3): 438-469.
- Akaike, H. 1987. Factor Analysis and AIC. *Psychometrika*. 52: 317-332.
- Akram, H., Shahid, S., Bukhari, H., Qurat-UI-Ain., Iqbal, K. & Asid, M. 2022. Impact of antibiotic withdrawal and starvation conditions on plasmid elimination and consequent loss of resistance. *Journal of the Pakistan Medical Association*. 72 (6): 1053-1056.
- Alcázar, E. M. 2016. Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y *salmiana*, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Jalisco, México.

- Alfaro-Mora, R. 2018. Aspectos relevantes sobre *Salmonella* sp en humanos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 34 (3): 110-122.
- Alikhan, N. F., Zhou, Z., Sergeant, M. J. y Achtman, M. 2018. A genomic overview of the population structure of *Salmonella*. *PLOS Genetis*. 14 (4): 1-13.
- Alós, J. I. 2014. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33 (10): 692-699.
- Alpuche-Aranda, C.M. y Echániz-Avilez, G. 2024. Resistencia antimicrobiana y su impacto en enfermedades infecciosas en la edad pediátrica. *Acta Pediátrica Mexicana*. 45 (3): 240-251.
- Amorim H. R., Gil, R. M., Lopes, C. y Bastos, M. M. 2013. Sesquiterpene lactones: adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology*. 43: 559-79.
- Andrews, J. M. y Howe, A. R. 2011. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66: 2726-2757.
- Arauz, L. F. 1998. Fitopatología, un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 544 pp.
- Araya, I., Prat, S. y Ramírez, V. 2015. Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión por disco. Instituto de Salud Pública de Chile. Chile. 17 pp.
- Artieda, J., Monterola, J. M., Tolosa, E., Moreno, B., Alustiza, J., Astigarraga, U., Botello, R., Arostegui, N. y Basterrechea, M. 2015. Brote de *Shigella sonnei* en un centro escolar de Gipuzkoa. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33 (3): 145-148.
- Asociación Catalana de Empresas de Salud Ambiental. 2024. ¿Cómo prevenir infecciones por *Shigella*? <https://adepap.cat/es/como-prevenir-infecciones-por-shigella/>. Consultado el 22 de agosto de 2024.

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. 2024. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/index.html>.
Consultado el 26 de febrero del 2024.

Ávalos-García, A. y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3): 119-145.

Ávalos-Soto, J., Treviño-Neávez, J. F., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Morán-Martínez, J., Serrano-Gallardo, L. B. y Morales-Rubio, M. E. 2014. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 45 (3): 39-44.

Ávila-Urbe, M. M., García-Zárate, S. N., Sepúlveda-Barrera, A. S. y Godínez-Rodríguez, M. A. 2016. Plantas medicinales en dos poblados del municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México. *Polibotánica*. 42: 215-245.

Baca, C., Yupanqui, L., Canales, J., Zamudio, M. L., Quispe, M. C. y Tamariz, J. H. 2014. Serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* aisladas en un instituto de salud pediátrico de Lima, Perú entre enero y julio 2013. *Revista Médica Herediana*. 25: 73-79.

Barreto, M., Castillo-Ruiz, M. y Retamal, P. 2016. *Salmonella enterica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 33 (5): 547-557.

Bauer, V. A., Kirby, W. M., Sherris, J. C. y Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal Clinical Pathology*. 45: 493-496.

Bayer, C., Chase, M. W. y Fay, M. F. 1998. Muntingiaceae, a new family of dicotyledons with malvacean affinities. *Taxon*. 47: 37-42.

- Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A. y Velázquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 30 (8): 453-459.
- Bodí, M. y Garnacho, J. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamiento combinado frente a monoterapia. *Medicina Intensiva*. 31 (2): 83-87.
- Bracho, M. G., Muñoz, M. A., Gómez, M. C., Márquez, A., Ávila, A. G. y Castillo, E. M. 2012. Prevalencia de *Salmonella* y *Shigella* en manipuladores de alimentos. *Multiciencias*. 12: 295-299.
- Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R. y Stashenko, E. 2009. Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*. 41 (3): 231-235.
- Calderón, G. 2002. Muntingiaceae. Instituto de Ecología; Centro Regional del Bajío. Michoacán, México. Pp. 1-11.
- Candelaria, B. y Flota, C. 2018. *Muntingia calabura* L. En: Palma, J. M. y González-Rebeles, C. (Eds). Recursos arbóreos y arbustivos tropicales para una ganadería bovina sustentable. Universidad de Colima. Colima, México. Pp. 83-86.
- Carvajal, S. y Acosta, L. L. 2010. Flora de Jalisco y áreas colindantes: Muntingiaceae. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. Pp. 1-14.
- Casado, I., Mora, N., Ferrer, g., Fernández, S. y Pino, D. 2016. Citotoxicidad *in vitro* y potencialidades de los compuestos quinoides como agentes antitumorales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 32 (1): 30-42.
- Casanova, L. M. & Costa, S. S. 2017. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. *Revista Virtual de Química*. 9 (2): 575-595.
- Castro, J. F. 2020. Introducción a las colecciones de cultivos microbianos. *Boletín INIA. Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. 428: 15-23.

- Cebrián, J. 2016. Diccionario de plantas medicinales. RBA Libros. Barcelona, España.
- Cervantes-García, E., García-González, R. y Salazar-Schettino, P .M. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 61: 28-40.
- Chacón-Jiménez, L. y Rojas-Jiménez, K. 2020. Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta Médica Costarricense*. 62: 7-12.
- Chaudhari, R. N., Jain, A. K. y Chatap, V. K. 2020. Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial potential of leaves extract of *Muntingia calabura*. *Journal of Advanced Scientific Research*. 11 (4): 218-224.
- Chaudhari, R. N., Kumar, A. & Chatap, V. K. 2022. Investigation of antioxidant and antimicrobial activity of bark extract of *Muntingia calabura*. *Journal of Medical Pharmaceutical and Allied Science*. 11: 4214-4217.
- Cona, T. E. 2002. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*. 19 (2): 77-81.
- Consolini, A. E. 2023. Plantas medicinales para afecciones gastrointestinales. En: Consolini, A. E., Ragone, M. I. y Colareda, G. A. (Eds). *Fitoterapia: Farmacología experimental y clínica de plantas medicinales*. Editorial de la Universidad de La Plata. Argentina. Pp. 21-63.
- Contreras-Omaña, R., Escorcia-Saucedo, A. E. y Velarde, Ruíz, J. A. 2021. Prevalencia e impacto de resistencias a antimicrobianos en infecciones gastrointestinales: una revisión. *Revista de Gastroenterología de México*. 86 (2021): 265-275.
- Cruiz, W. P., Orejudos, R., Lim, D. y Martin-Puzon, J. J. 2016. Bioactive metabolite profiles and antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Muntingia calabura* L. leaves and stems. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6 (8): 682-685.

- Cuca, L. E., Coy, C. A., Coy, E. D. y Lozano, J. M. 2011. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia*. 45 (2): 275-282.
- Desrini, S., Mashita, A. I., Rosary, A. N., Hidayah, U. N. y Fitria, A. 2018. Antibacterial activity screening of *Muntingia calabura* L. leaves methanol extract on three bacterial pathogens. *Pharmacology On Line*. 2: 1-10.
- Díaz, L. N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*. 1 (2): 32-55.
- Díaz, M., Álvarez, P. y Martínez, M. 2017. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de lactonas sesquiterpénicas germacranólidas contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias. *Ciencia ergo-sum*. 2: 104-108.
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Especializada en Quimioterapia*. 16 (4): 385-393.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. Pp. 229.
- Doughari, J. H. 2012. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. En: Rao, V. (Ed). *Phytochemicals: a global perspective of their role in nutrition and health*. Intech Open. Rijeka, Croatia. Pp. 1-32.
- Drago, M. E. 2007. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias farmacéuticas*. 38 (4): 42-47.
- Dueñas, J. C. 2009. Extracción y caracterización de principios activos de estructura fenólica con propiedades antioxidantes y antibacterianas, a partir de residuos del procesamiento de alcachofas. Tesis de licenciatura. Departamento de Ciencias de la Vida. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador.

- Escamilla, C. I., Cuevas, E. Y. y Guevara, J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 52 (2): 73-75.
- Espinosa, E., Gámez, A. J., Dorantes, J. R. A., Ávila, M. A., Castro, I., Núñez, C. A., Hernández, R. E. y Gámez, F. P. 2012. Bioquímica y Genética de las Antocianinas del Grano de Maíz. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; Centro de Investigación Regional Centro; Campo Experimental Bajío. México. Pp. 6-74.
- Espinoza, D. I. y Esparza, G. F. 2021. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Revista Chilena de Infectología*. 38: 69-80.
- Espinoza-Olaya, J. K. 2014. Determinación cuantitativa de alcaloides en doce plantas medicinales y su actividad expectorante. Tesis de pregrado. Unidad Académica de Ciencias Química y de la Salud. Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador.
- Expósito, L. M., Bermellón, S., Lescaille, L., Delgado, L. y Aliaga, I. 2019. Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en pacientes con infección del tracto urinario. *Revista Información Científica*. 98 (6): 755-764.
- Fatimah, R. & Santoso, B. S. A. 2020. Toxicity test Kersen (*Muntingia calabura* L.) leaf decoction using BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *Pharmacy Medical Journal*. 3 (2): 1-8.
- Ferrer, P. P. y Laguna, E. 2013. *Muntingia calabura* L. (Muntingiaceae), nueva especie exótica para la flora europea, introducida a través de sustratos de cultivo hortícola. *Bouteloua*. 15: 88-92.
- Fonnegra, R. 2023. Plantas medicinales y otros recursos naturales aprobados en Colombia con fines terapéuticos. Universidad de Antioquia. Colombia. 982 pp.

- Forbes, B. A., Sahm, D. F., y Weissfeld, A. S. 2009. Bailey y Scott: Diagnóstico microbiológico. 12a ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1160 pp.
- Frías, M. E. y Rosales, M. 2023. Farmacognosia. Principios básicos. Universidad Juárez del Estado de Durango. Durango, Durango. 350 pp.
- Gallegos-Zurita, M. 2016. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*. 77 (4): 327-332.
- García, C., Pardo, J. y Ramos, S. 2003. Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: reporte de un caso. *Revista Médica Herediana*. 14 (4): 221-223.
- García-Palomo, J. D., Agüero-Balbín, J., Parra-Blanco, J. A. y Santos-Benito, M. F. 2010. Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine*. 10 (49): 3251-3264.
- Global Biodiversity Information Facility. 2024. GBIF. Global Biodiversity Information Facility Organization. <https://www.gbif.org/>. Consultado el 14 de marzo de 2024.
- Godebo, Y., Ayele, A., Nasser, I., Husen, A. y Jumar, R. 2023. Medicinal plant-based metabolites in nanoparticles synthesis and their cutting-edge applications. An overview. En: Kumar, R. y Bachheti, A. Secondary metabolites from medicinal plants: nanoparticles synthesis and their applications. Exploring medicinal plants. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton, Florida. 332 pp.
- Godoy, P., Bartolomé, R., Torres, J., Espinet, L., Escobar, A., Nuin, C. y Domínguez, Á. 2011. Brote de gastroenteritis por el consumo de agua de suministro público causado por *Shigella sonnei*. *Gaceta Sanitaria*. 25 (5): 363-367.

- González, A. M., Presa, M., Latorre, M. G. y Lurá, M. C. 2007. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 24: 59-61.
- González-Chavarro, C. F., Cebazas, M., Pulido, V. C. y Celis, X. M. 2020. Amaryllidaceae: fuente potencial de alcaloides. Actividades biológicas y farmacológicas. *Ciencia y Agricultura*. 17 (3): 78-94.
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A. y Mercado-Flores, Y. 2022. *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 25: 1-14.
- Granados, R. y Villaverde, C. 1997. Microbiología. Tomo 1. Paraninfo. Madrid, España. 352 pp.
- Grande-Tovar, C. D., Aranaga-Arias, C. A., Flórez-López, E., Araujo-Pabón, L. M. 2021. Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Informador técnico*. 85: 64-82.
- Guarnizo, A. y Martínez, P. N. 2009. Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Elizcom. Armenia, Quindío, Colombia. 220 pp.
- Guevara, J. M., Cipriani, R., Giraldo, D., Mezarina, E., Sánchez, I., Villagómez, Z., Antezana, A., Alagón, R. y Carranza, R. 2014. *Shigella sonnei*: ¿Está ocurriendo un cambio en nuestro medio? *Anales de la Facultad de Medicina*. 75 (2): 189-191.
- Gurning, K., Simanjuntak, H. A., Purba, H., Situmorang, R. F. R., Barus, L. y Silaban, S. 2021. Determination of total tannins and antibacterial activities ethanol extraction Seri (*Muntingia calabura* L.) leaves. *Journal of Physics: Conference Series*. 1811 (2021): 1-5.
- Guzmán, S. H., Díaz, R. S. y González, M. M. 2017. Plantas medicinales. La realidad de una tradición ancestral. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo

- Rural, Pesca y Alimentación; Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Celaya, Guanajuato, México. 32 pp.
- H. Ayuntamiento Municipal de Tuxtla Gutiérrez 2021-2024. 2022. Plan Municipal de Desarrollo 2021-2024. <https://tuxtla.gob.mx/pg/muni/archivos/Plan-Municipal-de-Desarrollo-2021-2024.pdf>. Consulta el 11 de marzo de 2024.
- Hassan, N. D., Mustaqim, M. y Yusof, H. 2022. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Muntingia calabura* L. against selected pathogens. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 18 (15): 301-307.
- Hernández-Rodríguez, P., Quinter, G., Mesa-Lautero, D., Molano-Rodríguez, L. y Hurtado-Rodríguez, P. 2005. Prevalencia de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* en pacientes con conjuntivitis. *Universitas Scientiarum*. 10 (2): 47-54.
- Herrera, V. N. 2018. Efecto de etapa fenológica y ecotipo sobre el contenido de taninos totales, taninos condensados y digestibilidad in vitro en hojas de 9 ecotipos de *Leucaena leucocephala*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Hillewaert, H. 2010. *Artemia salina*. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Artemia_salina_3.jpg. Consultado el 22 de agosto de 2024.
- Humar, M., García-Piñeres, A. J., Castro, V. y Merfort, I. 2003. Effect of sesquiterpene lactones on the expression of the activation marker CD69 and of IL-2 in T-lymphocytes in whole blood. *Biochemical Pharmacology*. 65 (9): 1551-1563.
- Janick, J. y Paull, R. E. 2008. The encyclopedia of fruit y nuts. Centre for Agricultural and Biosciences International. London, UK. Pp. 346-348.
- Jaszczak-Wilke, E., Polkowska, Z., Koprowski, M., Owsianik, K., Mitchell, A. E. & Balczewski, P. 2021. Amygdalin: toxicity, anticancer activity and analytical procedures for its determination in plant seeds. *Molecules*. 26 (2253): 1-16.

- Jawerth, N. 2020. Enfermedades infecciosas y cómo pueden ayudar las ciencias nucleares. *Boletín del Organismo Internacional de Energía Atómica*. 61 (2): 4-5.
- Kaur, S., Singh, V., Chopra, H. K. & Panesar, P. S. 2024. Extraction and characterization of phenolic compounds from mandarin peels using conventional and green techniques: a comparative study. *Discover Food*. 4 (60): 1-10.
- Kottwitz, L. B., Leão, J. A., Back, A., Rodrigues, D. P., Magnani, M. y Oliveira, T. C. 2013. Commercially laid eggs vs. discarded hatching eggs: contamination by *Salmonella* spp. *Brazil Journal of Microbiology*. 44 (2):367-70.
- Lara-Reimers, E. A., Hernández-Robledo, C. O., Preciado-Rangel, P. y Sariñana-Aldaco, O. 2023. Estudio de plantas medicinales utilizadas en San José Iturbide, Guanajuato, México. *Polibotánica*. 56: 265-286.
- Lebeque, Y., Morris, H. J. y Calás, N. 2006. Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Medicina*. 45 (1).
- Lizarbe, I. A. 2009. Bacterias y virus ¿Cómo nos defendemos? *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 103: 115- 172.
- Lopardo, H. A., Predari, S. y Vay, C. 2016. Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología: enterobacterias. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. 212 pp.
- López, M. T. 2008. Plantas medicinales: interacciones con medicamentos y con otros fármacos vegetales. *Offarm: farmacia y sociedad*. 27 (4): 82-87.
- López-Sánchez, C., González-Martínez, C. Y., Méndez-López, M. D. y Palma-Cruz, F. J. 2022. Las saponinas y su uso farmacéutico. *Revista del Centro de Graduados e Investigación. Instituto Tecnológico de Mérida*. 37 (96): 120-126.
- Losa, J. E. 2021. Enfermedades infecciosas emergentes: una realidad asistencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 44 (2): 147-151.
- Luján, D. A. 2014. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 48 (4): 465-474.

- Marcoleta, A., Toro, C., Prado, V., Serrano, M., Fernández, P., Benadof, D., Camponovo, R., Campos, V., Porte, L., Zamorano, J., Ortega, C., Urqueta, B. y Ulloa, M. T. 2013. Patrones de susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Shigella sonnei* aisladas durante tres períodos diferentes en la Región Metropolitana, Chile. *Revista Chilena de Infectología*. 30 (6): 616-621.
- Martínez, C. Y., Soto, F., Almeida, M., Hermosilla, R. y Martínez, O. 2012. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17 (4): 320-329.
- Martínez, M. A., Evangelista, V., Mendoza, M., Morales, G., Toledo, G. y Wong, A. 2001. Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF. 303 pp.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 17 (6): 271-278.
- Martínez-Orgániz, A., Garza-Ramos, U., González-González, J., Nava-Faustino, G. y Toribio-Jiménez, J. 2020. Patotipos y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en agua residual. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 36 (4): 957-966.
- Martino, V. S. y Sülsen, V. P. 2019. Lactonas sesquiterpénicas: promisorio grupo de compuestos naturales bioactivos. *Revista Farmacológica*. 161: 24-37.
- McLaughlin, J. L., Rogers, L. L. y Anderson, J. E. 1998. The uses of biological assays to evaluate botanicals. *Drugs Information Journal*. 32: 513-524.
- Medina-Morales, D. A., Machado-Duque, M. E. y Machado-Alba, J. E. 2015. Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Revista Médica de Risaralda*. 21: 74.
- Méndez, M. E., Durán, R., Campos, S. M. y Dorantes, A. 2010. Flora medicinal. En: Durán, R. y Méndez, M. E. (Eds). Biodiversidad y desarrollo humano en

- Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Programa de Pequeñas Donaciones-Fondo para el Medio Ambiente Mundial, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Secretaría de Desarrollo Urbano y Medio Ambiente. Yucatán, México. Pp. 349-352.
- Miranda, M. G. 2011. Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 68 (4): 262-270.
- Miranda-Martínez, M. 2002. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. Pp. 68.
- Modak, B., Arrieta, A., Torres, R. y Urzua, A. 2002. Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: efecto del tipo de estructura. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 47 (1): 19-23.
- MolView. 2024. MolView. <https://molview.org/>. Consultado el 17 de abril del 2024.
- Montoya, H. H. 2008. Microbiología básica para el área de la salud y afines. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 282 pp.
- Morey-León, G., Zambrano-Bonilla, R., González-González, M., Rodríguez, Erazo, L., Andino-Rodríguez, F. y Vega, P. 2020. Infecciones oportunistas en pacientes con VIH/SIDA atendidos en el Hospital de Infectología, Guayaquil, Ecuador. *Facultad de Salud y Ciencias Sociales de la Universidad Estatal del Milagro*. 4 (7): 37-42.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. y Pfaller, M. A. 2021. Microbiología médica. 9ª ed. Elsevier. Barcelona, España. 927 pp.
- Nau, C. y Metzgar, M. 2020. Microbiología. 4ª ed. Wolters Kluwer. Barcelona, España. 898 pp.
- Naviglio, D., Scarano, P., Ciaravolo, M & Gallo, M. 2019. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): a powerful and greener alternative to the latest solid-liquid extraction techniques. *Foods*. 8 (245): 1-22.

- Niembro, A. 1990. Árboles y arbustos útiles de México. Naturales e introducidos. Limusa. México, D.F. 206 pp.
- Nilamsari, E. I. Hartanto, L. & Sukirno, S. 2023. Bioactive compound profile of *Muntingia calabura* leaf extract with different polarity solvent. Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia. 8 (10): 6035-6046.
- NYrture. 2025. WFO. NYrture. New York Natto. <https://www.nyrture.com/blog/2015/5/23/the-subtle-beauty-of-bacillus-subtilis-part-ii>. Consultado el 20 de junio de 2025.
- Organización Mundial de la Salud. 2023. Medicina tradicional. <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/traditional-medicine>. Consultado el 20 de agosto de 2024.
- Ortega-Peña, S. y Franco-Cendejas, R. 2014. Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las infecciones de prótesis articular. *Investigación en Discapacidad*. 3 (3): 106-113.
- Osorio, E. J. 2009. Aspectos básicos de farmacognosia. Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia.
- Pabón, L. C., Rodríguez, M. F. y Hernández-Rodríguez, P. 2017. Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 16 (6): 529-546.
- Paduch, R., Kandefer-Szersen, M., Trytek, M. y Fiedurek, J. 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 55: 315-327.
- Pahissa, A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Marge Medica Books. Barcelona, España. 208 pp.
- Paredes, F. y Roca, J. J. 2004. Infecciones gastrointestinales. Tipos, diagnóstico y tratamiento. *Offarm*. 23 (5): 100-106.

- Pasachova, J., Ramírez, S. y Muñoz-Molina, L. 2019. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*. 17 (32): 25-38.
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G. y Vázquez-López, R. 2019. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*. 36 (2): 180-189.
- Peña, D. H. 2011. Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de *Siparuna sessiliflora*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Peper, A. 2009. Aspects of the Relationship between Drug Dose and Drug Effect. *International Dose-Response Society*. 7: 172-192.
- Pérez, M. F., Batlle, M. C., Verdera, J. y Llop, A. 2006. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 58 (3): 207-211.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*. 11 (4): 195-211.
- Pérez-Ibáñez, N. M. 2014. Compuestos fenólicos. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Venezuela. <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/7968/1/8.%20COMPUESTOS%20FENOLICOS%202013-2014.pdf>. Consultado el 24 de agosto de 2024.
- Pino-Pérez, O. y Jorge-Lazo, F. J. 2010. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicas de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 22 (1): 34-43.
- Pinzón-Junca, A. 2019. *Pseudomonas*. *Acta Médica Colombiana*. 44 (1): 52.
- Piñol, M. T., Palazón, J. y Cusidó, R. M. 2013. Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón-Bieto y Talón, M. (Eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw Hill-Interamericana de España. Madrid, España. Pp. 323-348.

- Pérez, M. C. y Mota, M. I. 2008. Morfología y estructura bacteriana. En: Departamento de Bacteriología y Virología (Ed). Temas de bacteriología y virología médica. 3ª ed. Montevideo, Uruguay. Pp. 25-45.
- Plummer, D. T. 1981. An introduction to practical biochemistry. 2ª ed. Editorial McGraw Hill Latinoamericana. Bogotá, Colombia. Pp. 345.
- Popova, M. & Bankova, V. 2023. Contemporary methods for the extraction and isolation of natural products. *BMC Chemistry*. 17 (68): 1-2.
- Porras-Loaiza, A. P. y López-Malo, A. 2009. Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 3: 121-134.
- Prats, G. 2005. Microbiología clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina; Madrid, España. 360 pp.
- Public Health Image Library. 2024. Public Health Image Library (PHIL). <https://phil.cdc.gov/>. Consultado el 22 de agosto de 2024.
- Puig, Y., Espino, M. y Leyva, V. 2011. Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*. 6: 30-38.
- Quesada, A., Reginatto, G. A., Ruiz, A., Colantonio, L. D. y Burrone, M. S. 2016. Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 33: 32-44.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>. Consultado el 15 de junio de 2025.
- Ríos-Muñiz, D., Cerna-Cortés, J. F., Morán-García, N., Meza-Segura, M. y Estrada-García, T. 2019. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta Médica de México*. 155 (4): 410-416.

- Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., Kong, Y., MacEwan, D., Robinson, E. y Fullerton, J. 2024. Rang y Dale. Farmacología. 10^a. ed. *Elsevier*. Barcelona, España. 872 pp.
- Rivas, S. C. y Giraldo, C. I. 2021. Manual práctico de microbiología básica. Universidad de Cauca. Popayán, Colombia. 180 pp.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A. y Verde-Star, M. J. 2016. Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScience. Nuevo León, México. 436 pp.
- Rivero, L. M., Álvarez, G. M., López, A.T. y González, J. 1997. Actividad antifúngica *in vitro* de *Pinus carabeae* (pino macho). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 21: 25-29.
- Rodríguez-Ángeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*. 44 (5): 464-475.
- Román-Guillén, L. M., Orantes-García, C., Del Carpio-Penagos, C. U., Sánchez-Cortés, M. S., Ballinas-Aquino, M. L. y Farrera-Sarmiento, O. 2019. Diagnóstico del arbolado de alineación de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. *Madera y Bosques*. 35: 1-13.
- Romero-Cabello, R., Romero-Feregrino, R. y Romero-Feregrino, R. 2018. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológica de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 4^a ed. Médica Panamericana. Ciudad de México, México. 1723 pp.
- Salem, M. Z. M., Gohar, Y. M., Camacho, L. M., El-Shanhorey, N. A. y Salem A. Z. M. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (5): 418-426.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. 2000. Fisiología de las plantas. Paraninfo, Thomson Learning. Barcelona, España. 759 pp.

- Sánchez, L. y Neira, A. 2005. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense* Sw. *Cultura Científica*. 3: 40-45.
- Sankeshwari, R. M., Ankola, A. V., Bhat, K. & Hullatti, K. 2018. Soxhlet versus cold maceration: which method gives better antimicrobial activity to licorice extract against *Streptococcus mutans*? *Journal of Scientific Society*. 45 (2): 67-71.
- Santa-María, S. L., Valle, M. A., Chávez, S. H. y Surco, F. A. 2023. *Caulerpa filiformis* (Suhr) Hering una nueva opción antibacteriana. *Revista Cubana de Farmacia*. 56 (2): 1-18.
- Sarker, S. D., Latif, Z. y Gray, A. I. 2006. Natural products isolation. Humana Press. Totowa, New Jersey. 529 pp.
- Sarker, S., Nahar, L. y Kumarasamy, Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Métodos*. 4 (42): 321-324.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2022. Manuales prácticos para la elaboración de bioinsumos. Elaboración de extractos vegetales. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Pp. 32.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2010. Manifiesto de impacto ambiental modalidad particular para el cambio de uso de suelo del fraccionamiento “Jardines en la montaña” al sur poniente de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Solución Productiva S. A. de C. V. Pp. 32.
- Sekar, M. y Abdul, N. S. 2017. Formulation and evaluation of novel antibacterial and anti-inflammatory cream containing *Muntingia calabura* leaves extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10 (12): 376-379.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa, M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (3): 355-363.

- Sibi, G., Naveen, R., Dhananjaya, K., Ravikumar, K. R. y Mallesha, H. 2012. Potential use of *Muntingia calabura* L. extracts against human and plant pathogens. *Pharmacognosy Journal*. 4 (34): 44-47.
- Simões, M., Bennett, R. N. y Rosa, E. A. S. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Product Reports*. 26: 746-757.
- Sinaga, S. P., Lumbangaol, D. A., Iksen., Situmorang, R. F. R. y Gurning, K. 2022. Determination of phenolic, flavonoid content, antioxidant and antibacterial activities of Seri (*Muntingia calabura* L.) leaves ethanol extract from North Sumatera, Indonesia. *Rasayan Journal Chemistry*. 15 (2): 1534-1538.
- Solari, S. y Ríos, J. C. 2009. ¿Cuál es la utilidad clínica de un estudio toxicológico? *Revista Médica de Chile*. 137 (10): 1395-1399.
- Soto, M. R. 2014. Actividad antinociceptiva y antibacteriana de los alcaloides totales de dos especies de la familia Solanaceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 14 (4): 361-373.
- Su, Y., Liu, C., Fan, H. & Zhang, D. 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*. 19 (173): 1-12.
- Sufian, A. S., Ramasamy, K., Ahmat, N., Zakaria, Z. A. y Yusof, M. I. M. 2013. Isolation and identification of antibacterial and cytotoxic compounds from the leaves of *Muntingia calabura* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 146: 198-204.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. España. 656 pp.
- The World Flora Online. 2024. WFO. The World Flora Online. <https://www.worldfloraonline.org/>. Consultado el 14 de marzo de 2024.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. 2007. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Pearson Education. Madrid, España. 959 pp.

- Vázquez, C., Batis, A. I., Alcocer, M. I. y Gual, M. 1999. *Muntingia calabura*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF. Pp. 128-130.
- Velázquez-Meza, M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública de México*. 47 (5): 381-387.
- Vélez, N., Díaz, P. L., Rodríguez, C., Bautista, A., Montaña, A. y Realpe, M. E. 2015. Caracterización molecular de aislamientos de *Shigella sonnei* recuperados en el programa de vigilancia por el laboratorio de la enfermedad diarreica aguda en Colombia. *Biomédica*. 35 (3): 395-406.
- Velu, G., Palanichamy, V. y Prem, A. 2018. Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. En: Mohana, S. y Madhumitha, G. (Eds). Bioorganic phase in natural food: an overview. Springer. Cham, Switzerland. Pp. 135-156.
- Villarreal-Ibarra, E. C., García-López, E., López, P. A., Palma-López, D. J., Lagunes-Espinoza, L. C., Ortiz-García, C. F. y Oranday-Cárdenas, A. 2014. Plantas útiles en la medicina tradicional de Malpasito-Huimanguillo, Tabasco, México. *Polibotánica*. 37: 109-134.
- Voet, D. & Voet, J. G. 2006. Bioquímica. 3ª ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1 776 pp.
- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B. y Li, M. 2021. Research progress of antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids. A review. *Antibiotics*. 10 (318): 1-30.
- Zakaria, Z. A., Sufian, A. S., Ramasamy, K., Ahmat, N., Sulaiman, M. R., Arifah, A. K., Zuraini, A. y Somchit, M. N. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of *Muntingia calabura* extracts and fractions. *African Journal of Microbiology Research*. 4 (4): 304-308.

- Zambuchini, B., Fiorini, D., Verdenelli, M. C., Orpianesi, C. y Ballini, R. 2008. Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea* L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *LWT-Food Science and Technology*. 41: 1733-1738.
- Zamora-Ramírez, C. M. y Toro-Huamanchumo, C. J. 2021. Actividad antibiótica del *Eucalyptus globulus* frente a bacterias Gram positivas: un artículo de revisión. *Revista Médica Vallejana*. 10 (2): 93-104.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Rendimiento de los extractos de *M. calabura*.

Estructura botánica	Disolvente	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hojas	Hexano	3.56	2.96
	Acetato de etilo	3.48	2.90
	Metanol	11.47	9.56
	Agua	6.28	12.57
	Total	24.79	27.99
Cortezas de tallos	Hexano	1.13	0.76
	Acetato de etilo	2.34	1.95
	Metanol	8.78	7.32
	Agua	4.65	9.29
	Total	16.90	19.32

Anexo 2. Grupos de metabolitos secundarios de hojas y cortezas de tallos de *M. calabura*.

Grupos de MS		Hojas				Cortezas de tallos			
		Hex	AcOEt	MeOH	A	Hex	AcOEt	MeOH	A
Alcaloides		–	–	+++	–	–	+	–	+++
Fenoles		+	++	+++	+++	+	+++	+++	++
Flavonoides	Flavonas	–	–	–	+	–	–	–	++
	Flavonona	–	–	–	–	–	–	–	–
	Flavonoles	–	–	–	–	–	–	–	–
	Xantinas	–	–	–	–	–	–	–	–
Glucósidos		–	–	+++	+++	+	++	+++	+++
Lactonas sesquiterpénicas		+++	–	++	–	+	+	+++	–
Saponinas		–	–	+++	+	–	–	+++	+++
Taninos	Hidrolizables	–	–	–	–	–	+++	+++	–
	Condensados	–	–	+++	–	–	–	–	–
Esteroides		–	–	++	–	++	+	–	–
Terpenos		–	–	–	–	–	–	–	–
Quinonas	NaOH	–	–	–	–	–	–	–	–
	KOH	–	–	–	–	–	–	–	–
	NH ₄ OH	–	–	–	–	–	–	–	–
Total		2	1	7	4	4	6	5	5

Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. NaOH: hidróxido de sodio; KOH: hidróxido de potasio; NH₄OH: hidróxido de amonio. Intensidad de la reacción: ausente (–), baja (+), media (++), abundante (+++).

Anexo 3. Identificación de grupos de metabolitos secundarios en extractos de *M. calabura*.

a) Prueba de Dragendorff: alcaloides

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (+++)	T	P (-)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (+)	T	P (-)	T	P (+++)
								

b) Prueba de cloruro férrico: fenoles

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (+)	T	P (++)	T	P (+++)	T	P (+++)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (+)	T	P (+++)	T	P (+++)	T	P (++)
								

H: hojas; C de T: corteza de tallos. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. T: Testigo; P: Prueba. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++), abundante (+++).

c) Prueba de Shinoda: flavonoides

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (-)	T	P (+)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (-)	T	P (++)
								

d) Prueba de Molish: glucósidos

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (+++)	T	P (+++)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (+)	T	P (++)	T	P (+++)	T	P (+++)
								

H: hojas; C de T: corteza de tallos. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso.
T: Testigo; P: Prueba. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++), abundante (+++).

e) Prueba de Baljet: lactonas sesquiterpénicas

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (+++)	T	P (-)	T	P (++)	T	P (-)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (+)	T	P (+)	T	P (+++)	T	P (-)
								

f) Prueba de espuma: saponinas

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (+++)	T	P (+)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (+++)	T	P (+++)
								

H: hojas; C de T: corteza de tallos. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. T: Testigo; P: Prueba. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++), abundante (+++).

g) Prueba para taninos hidrolizables y condensados

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (+++)	T	P (-)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (+++)	T	P (+++)	T	P (-)
								

h) Prueba de Liebermann–Buchard: terpenos–esteroides

H	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (-)	T	P (-)	T	P (++)	T	P (-)
								
C de T	Hex		AcOEt		MeOH		A	
	T	P (++)	T	P (+)	T	P (-)	T	P (-)
								

H: hojas; C de T: corteza de tallos. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. T: Testigo; P: Prueba. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++), abundante (+++).

i) Prueba de Borntrager: quinonas (extracto de hojas)

Hex	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				
AcOEt	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				
MeOH	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				
A	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				

Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. NaOH: hidróxido de sodio; KOH: hidróxido de potasio; NH₄OH: hidróxido de amonio. T: Testigo; P: Prueba. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++), abundante (+++).

j) Prueba de Borntrager: quinonas (extracto de cortezas de tallos)

Hex	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				
AcOEt	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				
MeOH	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				
A	T	NaOH (-)	KOH (-)	NH ₄ OH (-)
				

Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. NaOH: hidróxido de sodio; KOH: hidróxido de potasio; NH₄OH: hidróxido de amonio. T: Testigo; P: Prueba. Intensidad de la reacción: ausente (-), baja (+), media (++), abundante (+++).

Anexo 4. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas de *M. calabura*.

Bacteria	2.5 mg/mL			$\bar{x}$	SD	5 mg/mL			$\bar{x}$	SD	10 mg/mL			$\bar{x}$	SD
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
Hexano															
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetato de etilo															
<i>B. subtilis</i> ATCC	8	8	9	8.3	0.6	9	9	9	9	0	10	10	9	9.7	0.6
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> AC	11	10	10	10.3	0.6	13	14	13	13.3	0.6	15	16	16	15.7	0.6
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol															
<i>B. subtilis</i> ATCC	8	7	7	7.3	0.6	8	7	8	7.6	0.6	9	8	8	8.3	0.6
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> AC	9	10	9	9.3	0.6	9	9	10	9.3	0.6	12	12	13	12.3	0.6
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	8	8	7	7.7	0.6	9	8	8	8.3	0.6	11	12	10	11.0	1.0
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	7	8	8	7.7	0.6	8	8	9	8.3	0.6	11	10	9	10.0	1.0
<i>S. sonnei</i> ATCC	7	7	7	7.0	0.0	8	7	8	7.7	0.6	8	9	10	9.0	1.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acuoso															
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	9	11	10	10	1	14	15	13	14	1.0
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R1: repetición 1; R2: repetición 2; R3: repetición 3; $\bar{x}$: media; SD: desviación estándar.

AC: aislamiento clínico; ATCC: American Type Culture Collection.

Anexo 5. Actividad antibacteriana de los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*.

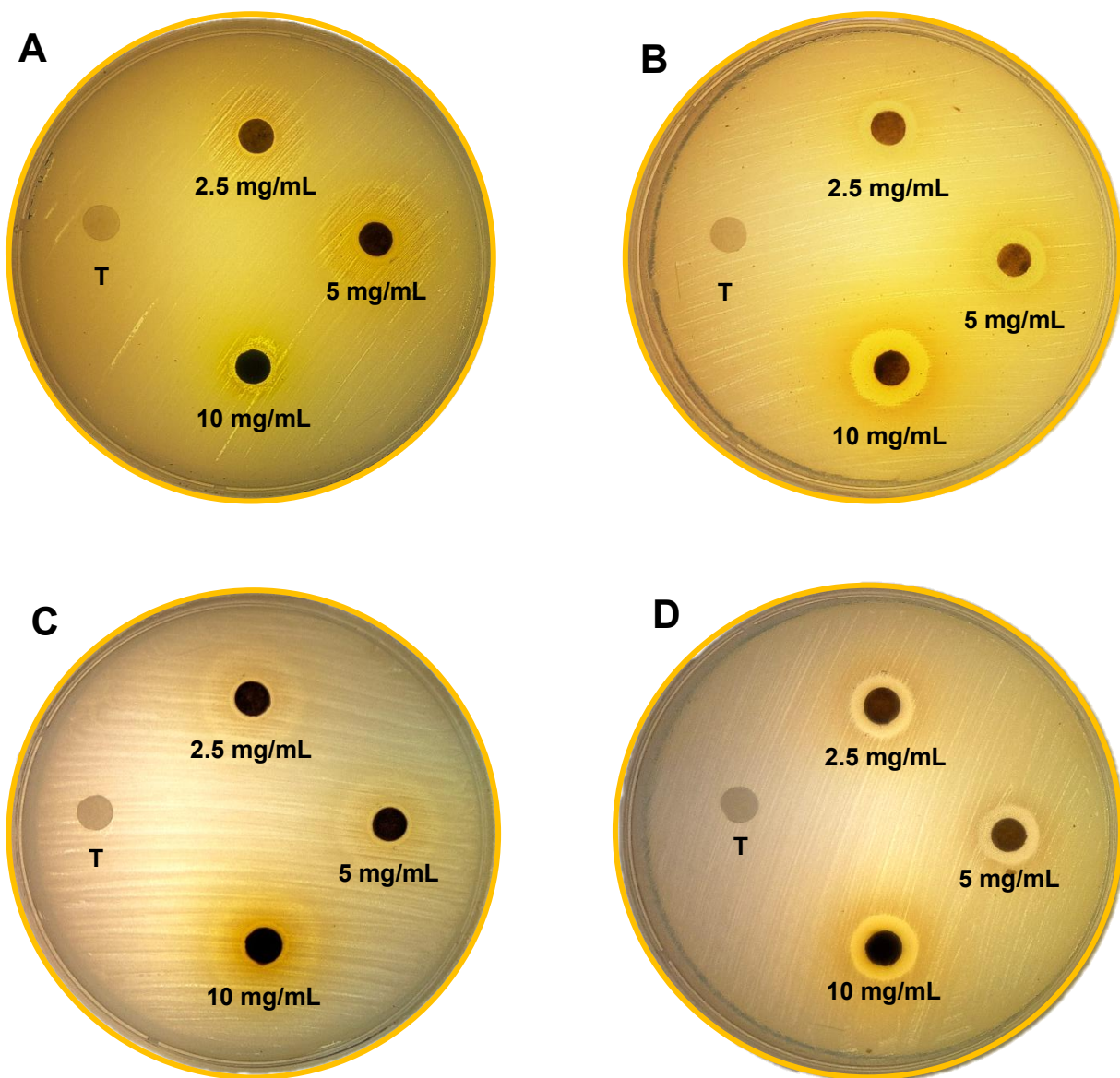
Bacteria	2.5 mg/mL			$\bar{x}$	SD	5 mg/mL			$\bar{x}$	SD	10 mg/mL			$\bar{x}$	SD
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			R1	R2	R3		
Hexano															
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetato de etilo															
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	9	9	1
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	10	11	10	1
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	10	9.3	0.6
<i>S. sonnei</i> ATCC	8	7	8	7.7	0.6	9	8	9	8.7	0.6	10	9	11	10	1.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metanol															
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	0
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	11	10	11	1
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	8	8	9	8.3	0.6	9	9	8	8.7	0.6	11	10	10	10.3	0.6
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	9	8	8	8.3	0.6	9	8	9	8.7	0.6	12	10	10	10.7	1.2
<i>S. sonnei</i> ATCC	8	7	8	7.7	0.6	9	8	8	8.3	0.6	9	8	9	8.7	0.6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acuoso															
<i>B. subtilis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	0
<i>S. aureus</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>S. aureus</i> AC	7	8	8	7.7	0.6	9	9	10	9.3	0.6	14	15	16	15	1
<i>S. epidermidis</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i> ATCC	7	6	7	6.7	0.6	7	7	7	7	0	8	8	8	8	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

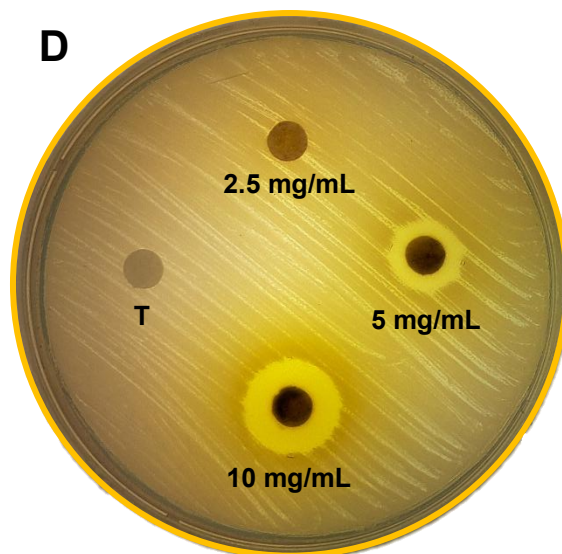
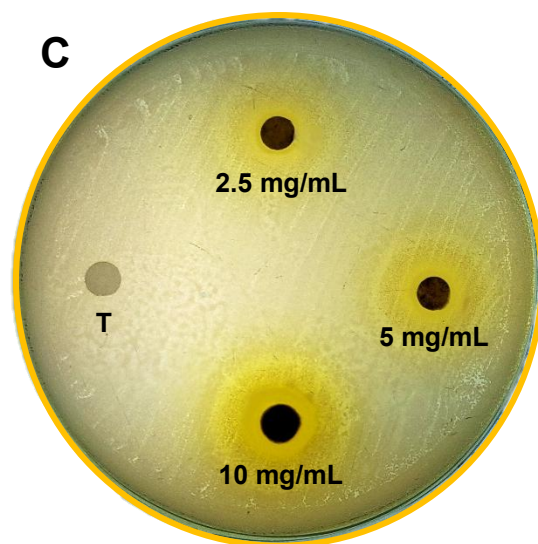
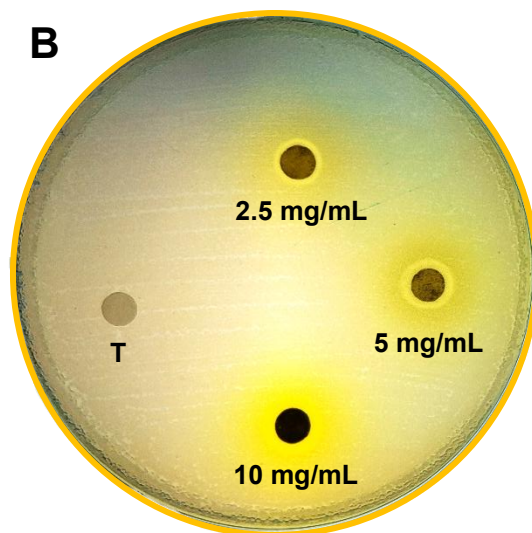
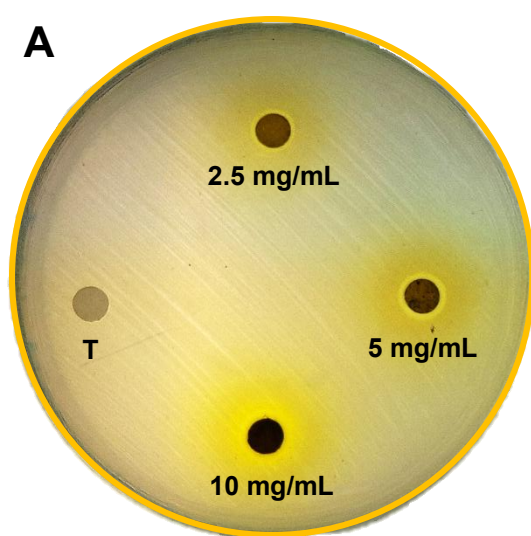
R1: repetición 1; R2: repetición 2; R3: repetición 3; $\bar{x}$: media; SD: desviación estándar.

AC: aislamiento clínico; ATCC: American Type Culture Collection.

Anexo 6. Actividad de extractos de hojas de *M. calabura* sobre bacterias ensayadas mediante difusión en disco.

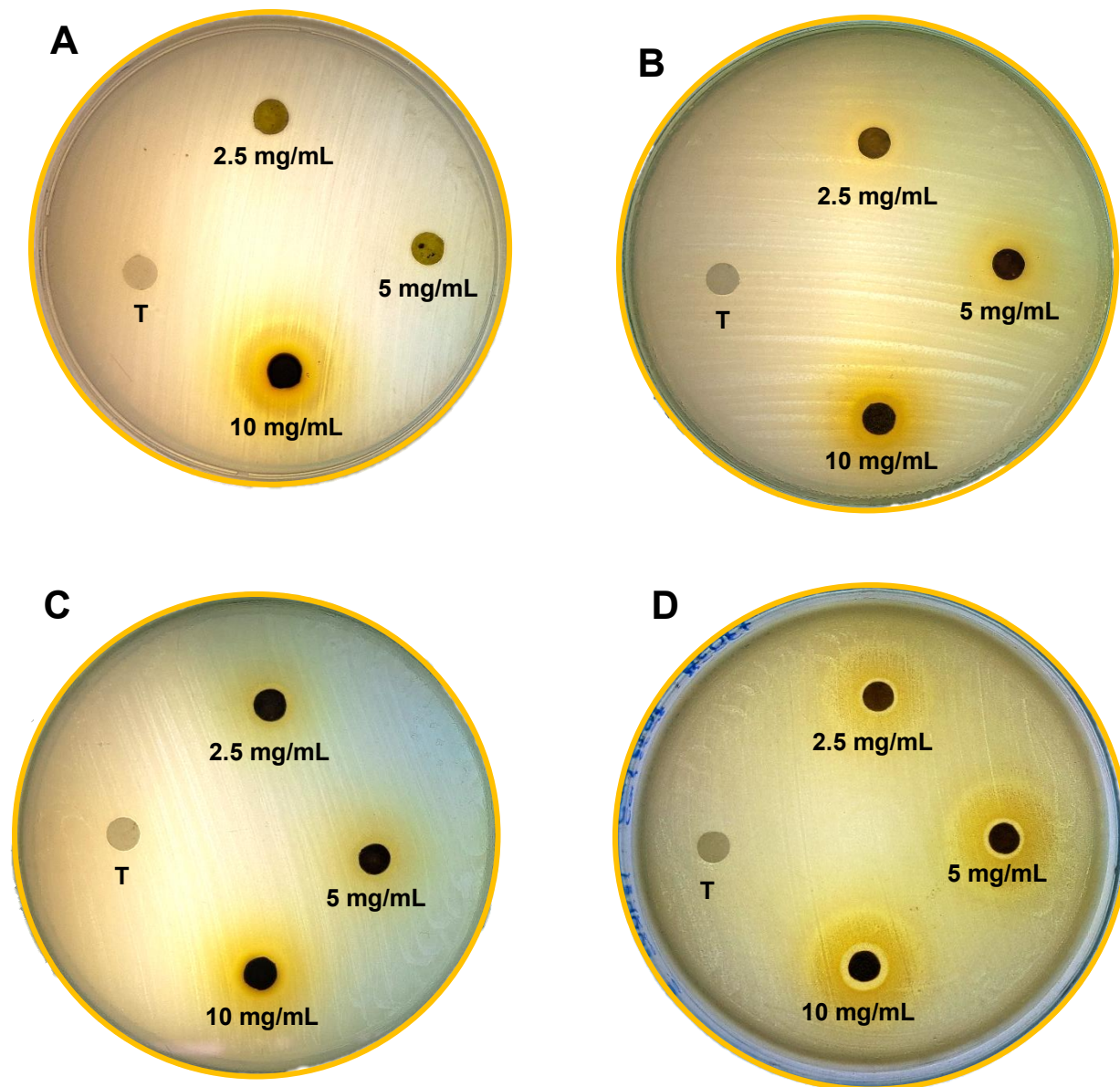


1) Halos de inhibición producidos por los extractos de hojas de *M. calabura*. Extracto de AcOEt sobre: A) *B. subtilis* ATCC y B) *S. aureus* AC. Extracto de MeOH sobre: C) *B. subtilis* ATCC y D) *S. aureus* AC. T: testigo.

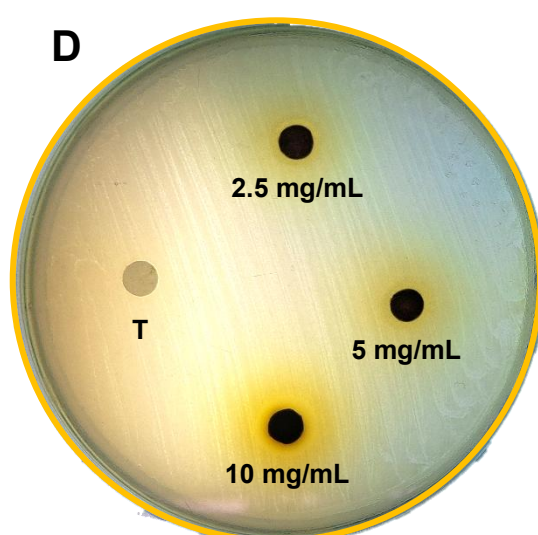
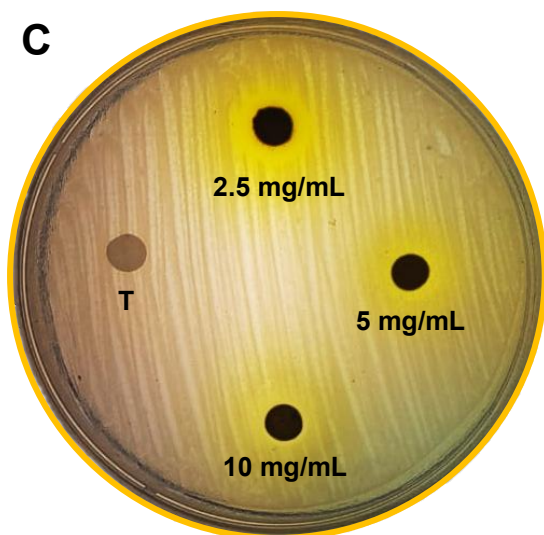
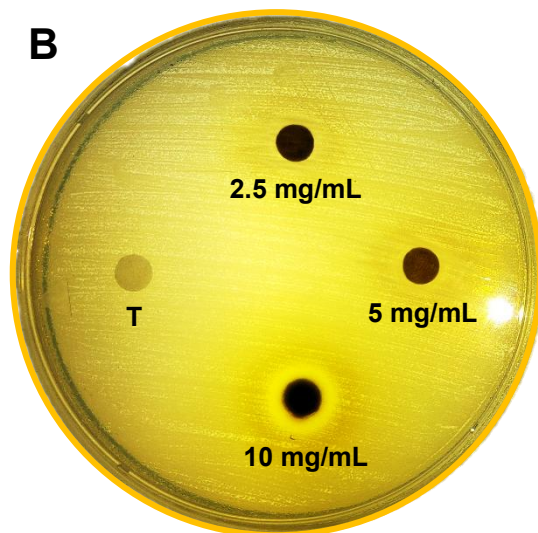
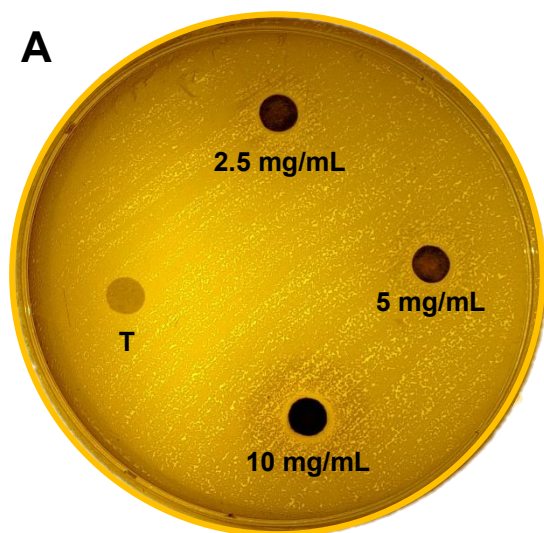


2) Halos de inhibición producidos por los extractos de hojas de *M. calabura*. Extracto de MeOH sobre: A) *E. coli* ATCC, B) *S. Typhi* ATCC y C) *S. sonnei* ATCC. Extracto acuoso sobre: D) *S. aureus* AC. T: testigo.

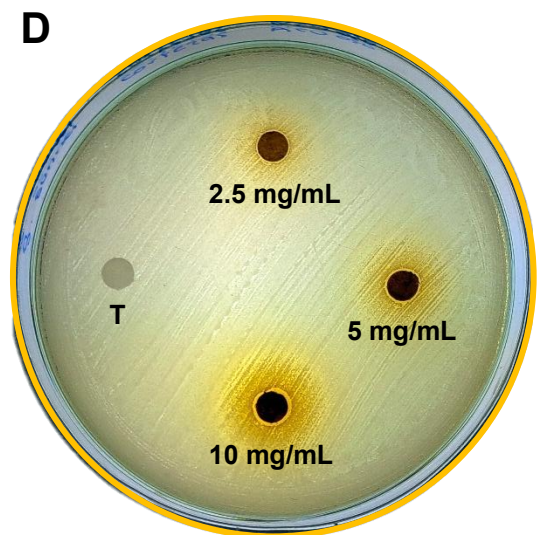
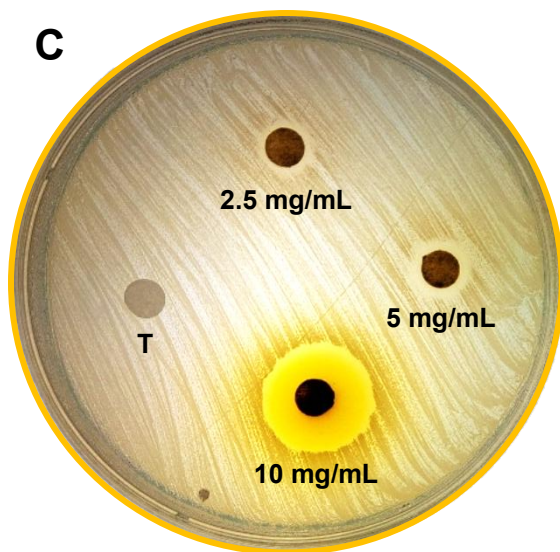
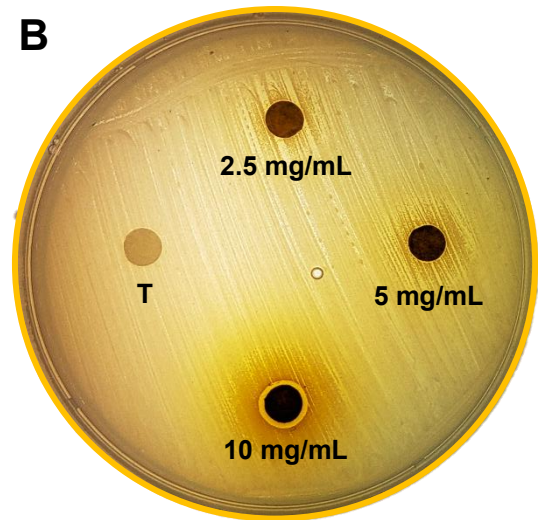
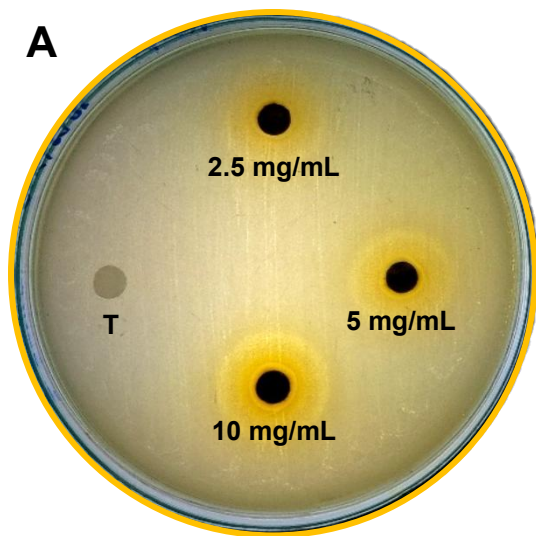
Anexo 7. Actividad de extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* sobre bacterias ensayadas mediante difusión en disco.



1) Halos de inhibición producidos por los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*. Extracto de AcOEt sobre: A) *B. subtilis* ATCC, B) *E. coli* ATCC, C) *S. Typhi* ATCC y D) *S. sonnei* ATCC. T: testigo.



2) Halos de inhibición producidos por los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*. Extracto de MeOH sobre: A) *B. subtilis* ATCC, B) *S. aureus* AC, C) *E. coli* ATCC y D) *S. Typhi* ATCC. T: testigo.



3) Halos de inhibición producidos por los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura*. Extracto de MeOH sobre: A) *S. sonnei* ATCC. Extracto acuoso sobre: B) *B. subtilis* ATCC, C) *S. aureus* AC y D) *S. sonnei* ATCC. T: testigo.

Anexo 8. Prueba ANOVA de un factor para bacterias ensayadas frente a *M. calabura*

Bacteria	SD	G.L.	Valor de p
<i>B. subtilis</i> ATCC	0.05779	13	2×10^{-16}
<i>S. aureus</i> ATCC	1 274.2	13	0.986
<i>S. aureus</i> AC	0.17520	13	2×10^{-16}
<i>S. epidermidis</i> ATCC	1 274.2	13	0.986
<i>E. coli</i> ATCC	0.30148	13	2×10^{-16}
<i>E. coli</i> AC	1 274.2	13	0.986
<i>S. Typhi</i>	0.30504	13	2×10^{-16}
<i>S. sonnei</i> ATCC	0.26855	13	2×10^{-16}
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	1 274.2	13	0.986
<i>P. aeruginosa</i> AC	1 274.2	13	0.986

SD: desviación estándar; G.L.: grados de libertad.

Anexo 9. Prueba ANOVA de un factor para extractos activos de *M. calabura* frente a bacterias ensayadas.

Bacteria	SD	G.L.	Valor de p
Acetato de etilo	0.43306	13	2×10^{-16}
Metanol	0.61244	13	0.059
Acuoso	0.96836	13	0.304

SD: desviación estándar; G.L.: grados de libertad.

Anexo 10. Prueba post-hoc de Tukey con base en ANOVA factorial de la actividad de hojas y cortezas de *M. calabura*.

a) *B. subtilis* ATCC

Estructura + Concentración (mg/mL)	AcOEt		MeOH		Acuoso	
	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p
Hojas [5]-Hojas [2.5]	6.66x10 ⁻¹	0.642	3.3x10 ⁻¹	0.909	1.63x10 ⁻¹⁵	0
Hojas [10]-Hojas [2.5]	1.333	0.077	1.0	0.090	1.77x10 ⁻¹⁵	0
Cortezas [2.5]-Hojas [2.5]	-8.333	0	-7.333	0	1.33x10 ⁻¹⁵	0
Cortezas [5]-Hojas [2.5]	6.666	0	-7.333	0	8.88x10 ⁻¹⁶	0
Cortezas [10]-Hojas [2.5]	6.666	0.642	6.6x10 ⁻¹	0.395	8.0	0
Hojas [10]-Hojas [5]	-9.0	0.642	6.6x10 ⁻¹	0.395	1.48x10 ⁻¹⁶	0.058
Cortezas [2.5]-Hojas [5]	-9.0	0	-7.666	0	-2.9x10 ⁻¹⁶	3.12x10 ⁻⁴
Cortezas [5]-Hojas [5]	0	0	-7.666	0	-7.41x10 ⁻¹⁶	0
Cortezas [10]-Hojas [5]	-9.66	1.0	3.333	0.909	8.0	0
Cortezas [2.5]-Hojas [10]	-9.66	0	-8.333	0	-4.44x10 ⁻¹⁶	5.2x10 ⁻⁶
Cortezas [5]-Hojas [10]	-6.66	0	-8.333	0	-8.88x10 ⁻¹⁶	0
Cortezas [10]-Hojas [10]	-6.66x10 ⁻¹	0.642	-3.333	0.909	8.0	0
Cortezas [5]-Cortezas [2.5]	-5.33x10 ⁻¹⁵	1.0	-1.7x10 ⁻¹⁵	1.0	4.44x10 ⁻¹⁶	5.2x10 ⁻⁶
Cortezas [10]-Cortezas [2.5]	9.0	0	8.000	0	8.0	0
Cortezas [10]-Cortezas [5]	9.0	0	8-00	0	8.0	0

Dif: indica la diferencia promedio entre las medias de los dos grupos comparados. Si es positiva, la media del segundo grupo es mayor, si es negativa la del primer grupo es mayor.

b) *S. aureus* AC

Estructura+ Concentración (mg/mL)	AcOEt		MeOH		Acuoso	
	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p
Hojas [5]-Hojas [2.5]	3.0	1.29×10^{-5}	-3.55×10^{-15}	1.0	10	2×10^{-7}
Hojas [10]-Hojas [2.5]	5.333	0	3.000	3.9×10^{-4}	13.666	0.000
Cortezas [2.5]-Hojas [2.5]	-10.333	0	-9.333	0	7.666	3.1×10^{-6}
Cortezas [5]-Hojas [2.5]	-10.333	0	-9.333	0	9.333	4×10^{-7}
Cortezas [10]-Hojas [2.5]	-10.333	0	1.666	0.037	15	0
Hojas [10]-Hojas [5]	-13.333	1.619×10^{-4}	3.000	3.9×10^{-4}	3.666	0.003
Cortezas [2.5]-Hojas [5]	-13.333	0	-9.333	0	-2.33	0.073
Cortezas [5]-Hojas [5]	-13.333	0	-9.333	0	-0.666	0.940
Cortezas [10]-Hojas [5]	-15.666	0	1.666	0.037	5.0	2.4×10^{-4}
Cortezas [2.5]-Hojas [10]	-15.666	0	-1.233	0	-6.0	4.06×10^{-5}
Cortezas [5]-Hojas [10]	-15.666	0	-1.233	0	-4.333	9.02×10^{-4}
Cortezas [10]-Hojas [10]	-15.666	0	-1.333	0.119	1.333	0.506
Cortezas [5]-Cortezas [2.5]	0	1.0	-1.77×10^{-15}	1.0	1.666	0.290
Cortezas [10]-Cortezas [2.5]	0	1.0	1.1	0	7.333	5.0×10^{-6}
Cortezas [10]-Cortezas [5]	0	1.0	1.1	0	5.666	7.21×10^{-5}

Dif: indica la diferencia promedio entre las medias de los dos grupos comparados. Si es positiva, la media del segundo grupo es mayor, si es negativa la del primer grupo es mayor.

c) *E. coli* ATCC

Estructura+ Concentración (mg/mL)	AcOEt		MeOH		Acuoso	
	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p
Hojas [5]-Hojas [2.5]	-5.18x10 ⁻¹⁶	1.0	6.666x10 ⁻¹	0.817	0	NA
Hojas [10]-Hojas [2.5]	7.40x10 ⁻¹⁷	1.0	3.333	5.6x10 ⁻⁴	0	NA
Cortezas [2.5]-Hojas [2.5]	5.18x10 ⁻¹⁶	1.0	6.666x10 ⁻¹	0.817	0	NA
Cortezas [5]-Hojas [2.5]	-2.15x10 ⁻¹⁵	1.0	1.000	0.479	0	NA
Cortezas [10]-Hojas [2.5]	9.333	0	2.666	0.003	0	NA
Hojas [10]-Hojas [5]	5.92x10 ⁻¹⁶	1.0	2.666	0.003	0	NA
Cortezas [2.5]-Hojas [5]	1.036x10 ⁻¹⁵	1.0	1.776x10 ⁻¹⁵	1.000	0	NA
Cortezas [5]-Hojas [5]	-1.63x10 ⁻¹⁵	1.0	3.333x10 ⁻¹	0.987	0	NA
Cortezas [10]-Hojas [5]	9.333	0	2.000	0.029	0	NA
Cortezas [2.5]-Hojas [10]	4.44x10 ⁻¹⁶	1.0	-2.666	0.003	0	NA
Cortezas [5]-Hojas [10]	-2.22x10 ⁻¹⁵	1.0	-2.333	0.010	0	NA
Cortezas [10]-Hojas [10]	9.333	0	-6.666x10 ⁻¹	0.817	0	NA
Cortezas [5]-Cortezas [2.5]	-2.66x10 ⁻¹⁵	1.0	3.333x10 ⁻¹	0.987	0	NA
Cortezas [10]-Cortezas [2.5]	9.333	0	2.000	0.029	0	NA
Cortezas [10]-Cortezas [5]	9.333	0.	1.666	0.081	0	NA

Dif: indica la diferencia promedio entre las medias de los dos grupos comparados. Si es positiva, la media del segundo grupo es mayor, si es negativa la del primer grupo es mayor.

NA: no aplica

d) S. Typhi ATCC

Estructura+ Concentración (mg/mL)	AcOEt		MeOH		Acuoso	
	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p
Hojas [5]-Hojas [2.5]	1.48x10 ⁻¹⁵	1.0	0.666	0.893	0	NA
Hojas [10]-Hojas [2.5]	1.184x10 ⁻¹⁵	1.0	2.333	0.030	0	NA
Cortezas [2.5]-Hojas [2.5]	5.18x10 ⁻¹⁶	1.0	0.666	0.893	0	NA
Cortezas [5]-Hojas [2.5]	-5.92x10 ⁻¹⁶	1.0	1.000	0.632	0	NA
Cortezas [10]-Hojas [2.5]	1.0	0	3.000	0.005	0	NA
Hojas [10]-Hojas [5]	-2.96x10 ⁻¹⁶	1.0	1.666	0.167	0	NA
Cortezas [2.5]-Hojas [5]	-9.62x10 ⁻¹⁶	1.0	0.000	1.0	0	NA
Cortezas [5]-Hojas [5]	-2.07x10 ⁻¹⁵	1.0	0.333	0.994	0	NA
Cortezas [10]-Hojas [5]	10	0	2.333	0.030	0	NA
Cortezas [2.5]-Hojas [10]	6.66x10 ⁻¹⁶	1.0	-1.666	0.167	0	NA
Cortezas [5]-Hojas [10]	-1.77x10 ⁻¹⁵	1.0	-1.333	0.353	0	NA
Cortezas [10]-Hojas [10]	10	0	0.666	0.893	0	NA
Cortezas [5]-Cortezas [2.5]	-1.11x10 ⁻¹⁵	1.0	0.333	0.994	0	NA
Cortezas [10]-Cortezas [2.5]	10	0	2.333	0.030	0	NA
Cortezas [10]-Cortezas [5]	10	0	2.000	0.073	0	NA

Dif: indica la diferencia promedio entre las medias de los dos grupos comparados. Si es positiva, la media del segundo grupo es mayor, si es negativa la del primer grupo es mayor.

NA: no aplica

e) *S. sonnei* ATCC

Estructura+ Concentración (mg/mL)	AcOEt		MeOH		Acuoso	
	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p	Dif	Valor de p
Hojas [5]-Hojas [2.5]	3.848x10 ⁻¹⁵	1.0	0.666	0.775	3.70x10 ⁻¹⁵	1.0
Hojas [10]-Hojas [2.5]	2.66x10 ⁻¹⁵	1.0	2.0	0.019	4.58x120 ⁻¹⁵	1.0
Cortezas [2.5]-Hojas [2.5]	7.666	0	0.666	0.775	6.666	0
Cortezas [5]-Hojas [2.5]	8.666	0	1.333	0.165	7.0	0
Cortezas [10]-Hojas [2.5]	10	0	1.666	0.057	8.0	0
Hojas [10]-Hojas [5]	-1.18x10 ⁻¹⁵	1.0	1.333	0.165	8.881x10 ⁻¹⁶	1.0
Cortezas [2.5]-Hojas [5]	7.666	0	0	1.000	6.666	0
Cortezas [5]-Hojas [5]	8.666	0	0.666	0.775	7.0	0
Cortezas [10]-Hojas [5]	10	0	1.0	0.413	8.0	0
Cortezas [2.5]-Hojas [10]	7.666	0	-1.333	0.165	6.666	0
Cortezas [5]-Hojas [10]	8.666	0	-0.666	0.775	7.0	0
Cortezas [10]-Hojas [10]	10	0	-0.333	0.983	8.0	0
Cortezas [5]-Cortezas [2.5]	1.0	0.256	0.666	0.775	3.333x10 ⁻¹	0.538
Cortezas [10]-Cortezas [2.5]	2.333	0.001	1.0	0.413	1.333	1.7x10 ⁻⁴
Cortezas [10]-Cortezas [5]	2.333	0.077	0.333	0.983	1.0	0.002

Dif: indica la diferencia promedio entre las medias de los dos grupos comparados. Si es positiva, la media del segundo grupo es mayor, si es negativa la del primer grupo es mayor.

Anexo 11. Porcentaje de inhibición relativa producido por los extractos de hojas de *M. calabura* sobre las bacterias.

Bacteria	2.5 mg/mL			5 mg/mL			10 mg/mL		
	PHIG	PHIE	PIR (%)	PHIG	PHIE	PIR (%)	PHIG	PHIE	PIR (%)
Acetato de etilo									
<i>B. subtilis</i> ATCC	36	8.3	23.1	37	9	24.3	37	9.7	26.1
<i>S. aureus</i> AC	29	10.3	35.6	30.7	13.3	43.4	31.7	15.7	49.5
Metanol									
<i>B. subtilis</i> ATCC	36	7.3	20.4	37	7.3	20	37	8.3	23
<i>S. aureus</i> AC	29	9.3	32.2	30.7	9.3	30	31.7	12.3	39
<i>E. coli</i> ATCC	29.6	7.7	25.9	31	8.3	27	31.7	11	35
<i>S. Typhi</i> ATCC	34	7.7	22.5	35	8.3	24	35	10	29
<i>S. sonnei</i> ATCC	30	7	23.3	31.3	7.7	24	31.3	9	29
Acuoso									
<i>S. aureus</i> AC	29	0	0	30.7	10	34	31.7	14	44

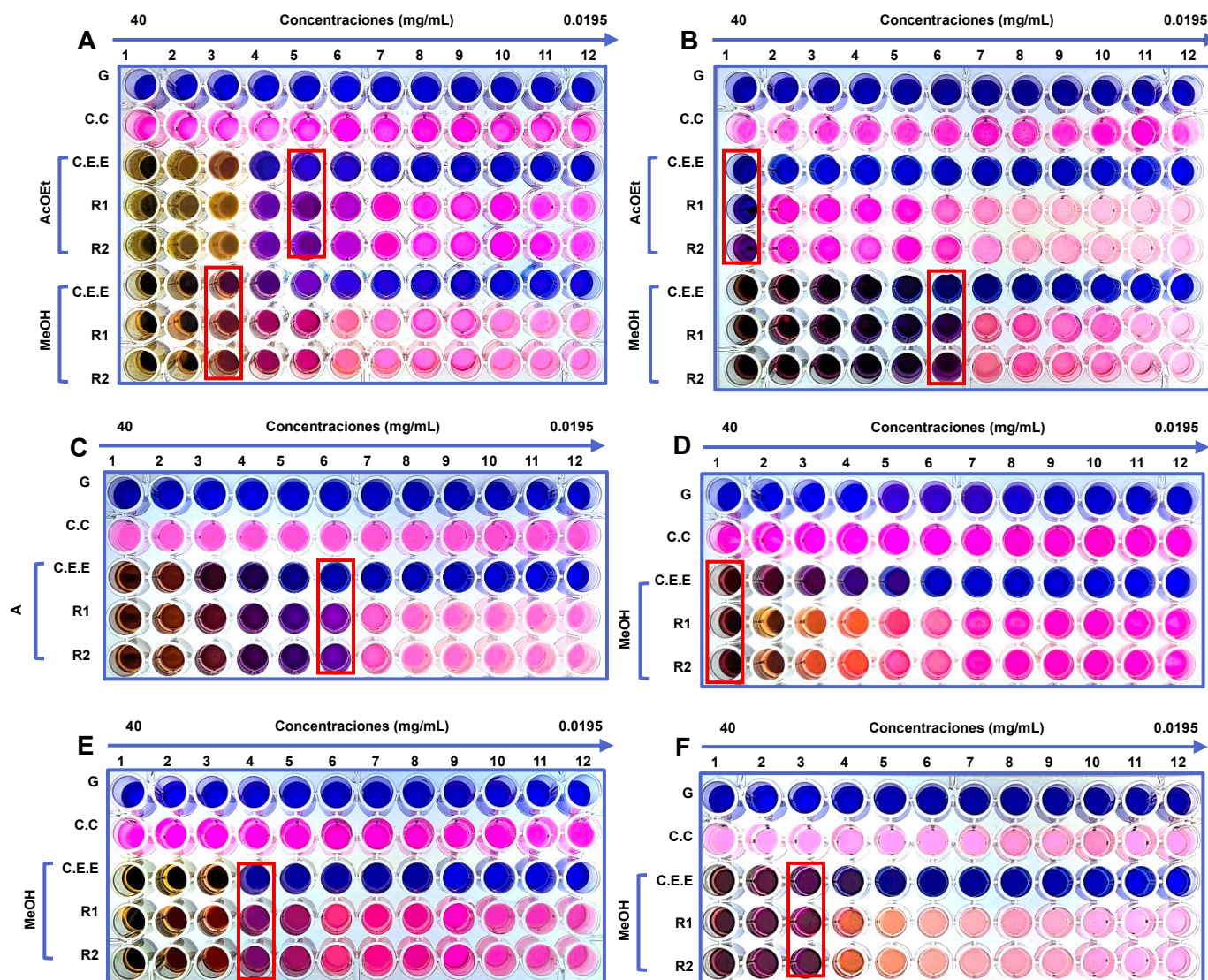
PHIG: promedio de halos de inhibición con gentamicina; PHIE: promedio de halos de inhibición con extracto; PIR: porcentaje de inhibición relativa; ATCC: American Type Culture Collection; AC: aislamiento clínico.

Anexo 12. Porcentaje de inhibición relativa producido por los extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* sobre las bacterias.

Bacteria	2.5 mg/mL			5 mg/mL			10 mg/mL		
	PHIG	PHIE	PIR (%)	PHIG	PHIE	PIR (%)	PHIG	PHIE	PIR (%)
Acetato de etilo									
<i>B. subtilis</i> ATCC	36	0	0	37	0	0	37	9	24.3
<i>E. coli</i> ATCC	29.6	0	0	31	0	0	31.7	10	31.6
<i>S. Typhi</i> ATCC	34	0	0	35	0	0	35	9.3	26.7
<i>S. sonnei</i> ATCC	30	7.7	25.6	31.3	8.7	27.7	31.3	10	31.9
Metanol									
<i>B. subtilis</i> ATCC	36	0	0	37	0	0	37	8	21.6
<i>S. aureus</i> AC	29	0	0	30.7	0	0	31.7	11	34.7
<i>E. coli</i> ATCC	29.6	8.3	28.2	31	8.7	28	31.7	10.3	32.6
<i>S. Typhi</i> ATCC	34	8.3	24.5	35	8.7	24.8	35	10.7	30.5
<i>S. sonnei</i> ATCC	30	7.7	25.6	31.3	8.3	26.6	31.3	8.7	27.7
Acuoso									
<i>B. subtilis</i> ATCC	36	0	0	37	0	0	37	8	21.6
<i>S. aureus</i> AC	29	7.7	26.4	30.7	9.3	30.4	31.7	15	47.4
<i>S. sonnei</i> ATCC	30	6.7	22.2	31.3	7	22.4	31.3	8	25.6

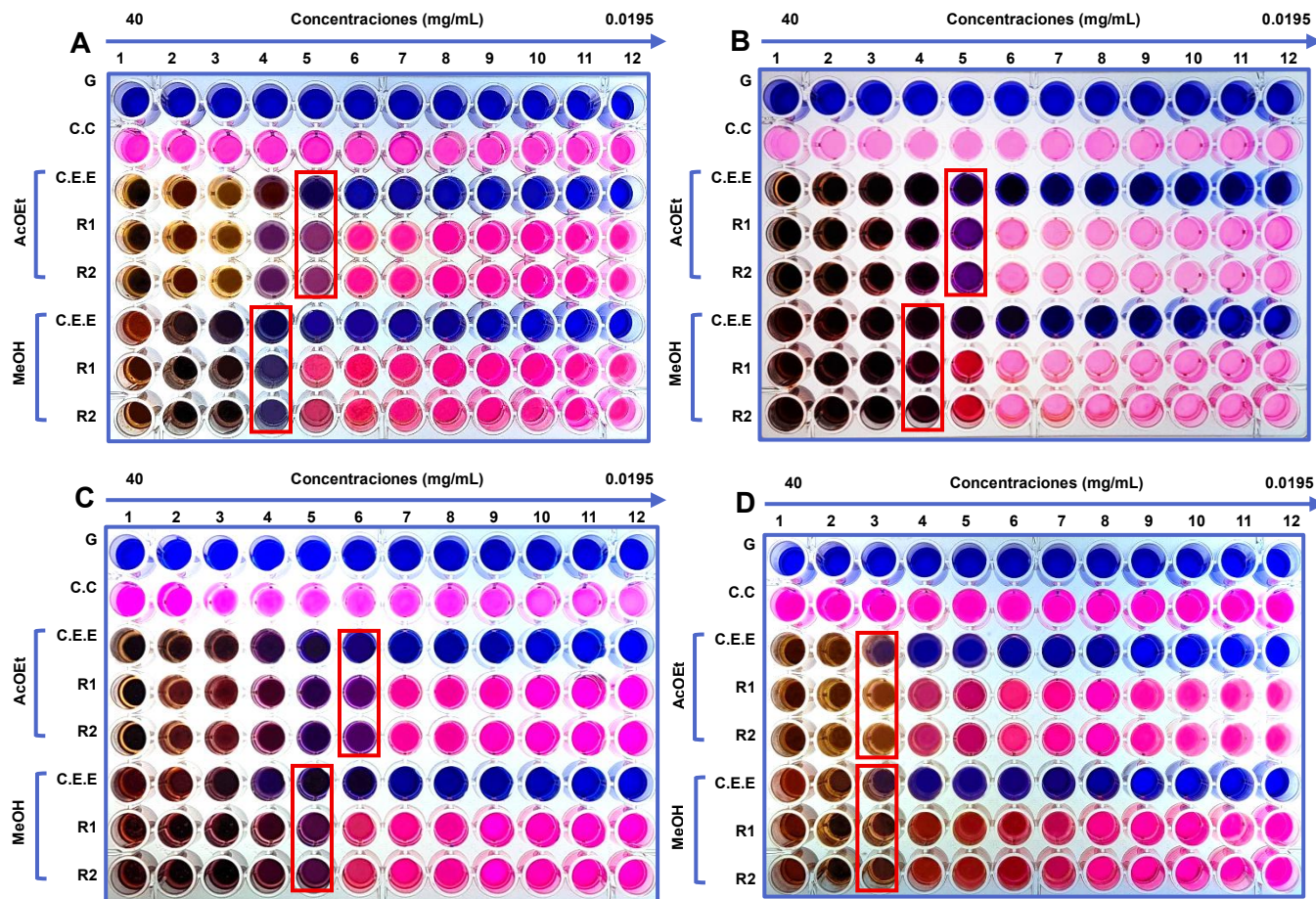
PHIG: promedio de halos de inhibición con gentamicina; PHIE: promedio de halos de inhibición con extracto; PIR: porcentaje de inhibición relativa; ATCC: American Type Culture Collection; AC: aislamiento clínico.

Anexo 13. Actividad de extractos de hojas de *M. calabura* sobre bacterias ensayadas mediante ensayo de concentración inhibitoria mínima.

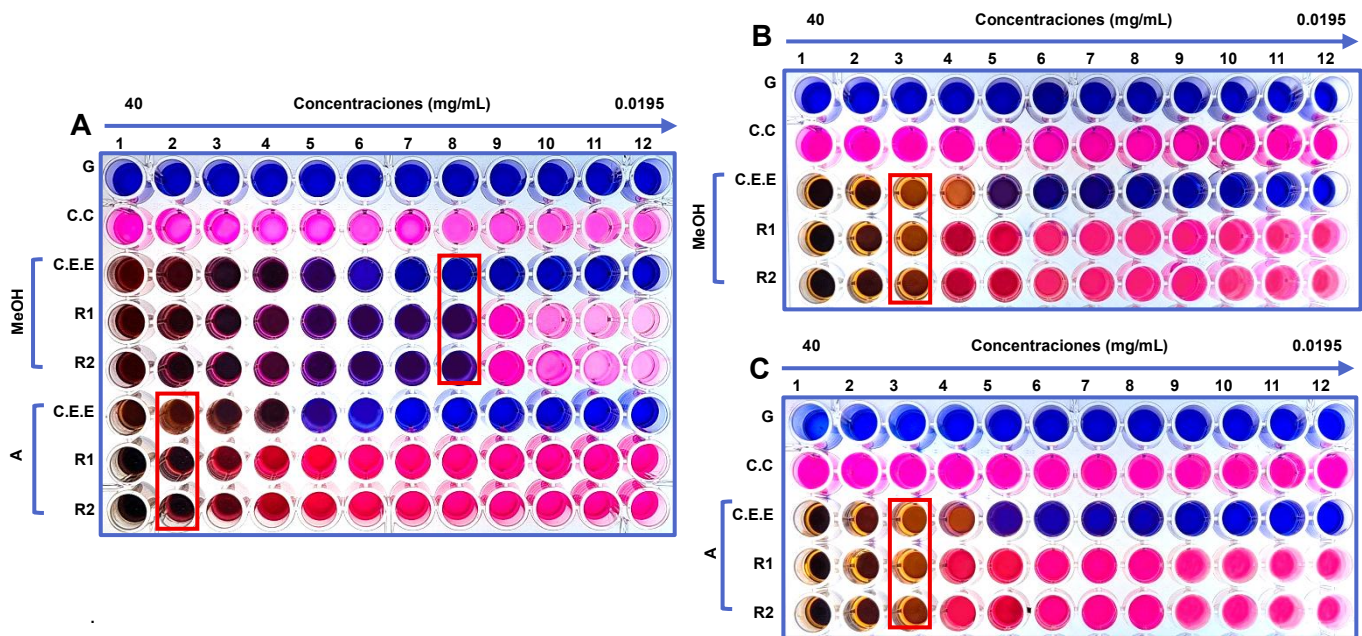


1) Efecto inhibitorio de extractos de hojas de *M. calabura* sobre: A) *B. subtilis* ATCC, B) *S. aureus* AC, C) *S. aureus* AC, D) *E. coli* ATCC, E) *S. Typhi* ATCC y F) *S. sonnei* ATCC. G: gentamicina; C. C: control de crecimiento; C.E.E: control de esterilidad del extracto; R1: repetición 1; R2: repetición 2. AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. Concentraciones: 1=40; 2=20; 3=10; 4=5; 5=2.5; 6=1.25; 7=0.625; 8=0.3125; 9=0.1562; 10=0.0781; 11=0.039; 12=0.0195 mg/mL. El corte de la CIM está señalado por el recuadro rojo.

Anexo 14. Actividad de extractos de cortezas de tallos sobre bacterias ensayadas mediante ensayo de concentración inhibitoria mínima.



1) Efecto inhibitorio de extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* sobre A) *B. subtilis* ATCC, B) *E. coli* ATCC, C) *S. Typhi* ATCC y D) *S. sonnei* AC. G: gentamicina; C. C: control de crecimiento; C.E.E: control de esterilidad del extracto; R1: repetición 1; R2: repetición 2. AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol. Concentraciones: 1=40; 2=20; 3=10; 4=5; 5=2.5; 6=1.25; 7=0.625; 8=0.3125; 9=0.1562; 10=0.0781; 11=0.0309; 12=0.0195 mg/mL. El corte de la CIM está señalado por el recuadro rojo.



2) Efecto inhibitorio de extractos de cortezas de tallos de *M. calabura* sobre A) *S. aureus* AC, B) *B. subtilis* ATCC y C) *S. sonnei* ATCC. G: gentamicina; C. C: control de crecimiento; C.E.E: control de esterilidad del extracto; R1: repetición 1; R2: repetición 2. MeOH: metanol; A: acuoso. Concentraciones: 1=40; 2=20; 3=10; 4=5; 5=2.5; 6=1.25; 7=0.625; 8=0.3125; 9=0.1562; 10=0.0781; 11=0.0309; 12=0.0195 mg/mL. El corte de la CIM está señalado por el recuadro rojo.

Anexo 15. Concentración letal media (CL₅₀) de los extractos de *M. calabura* sobre *A. salina*.

Estructura botánica	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	Categoría de toxicidad *	SD	G.L.	Valor de P
Hojas	Hex	1 211.2	No tóxico	2.0189	1	0.1553
	AcOEt	1 479.5	No tóxico	2.3703	1	0.1237
	MeOH	892.0	Moderadamente tóxico	8.4492	1	0.0037
	A	500.4	Moderadamente tóxico	14.5323	1	0.0001
Cortezas de tallos	Hex	5 086.5	No tóxico	0.0745	1	0.7848
	AcOEt	427.8	Moderadamente tóxico	20.8077	1	0.0000
	MeOH	113.9	Moderadamente tóxico	18.1873	1	0.0000
	A	530.0	Moderadamente tóxico	2.7809	1	0.0954

Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; A: acuoso. SD: desviación estándar; G.L.: grados de libertad.

* Categorías de toxicidad tomadas de McLaughlin *et al.* (1998).