

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**Los metabolitos secundarios de extractos de
Diospyros digyna Jacq. (Ebenaceae) y su
efecto biológico**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

PRESENTA

FRANCISCO ISAI ORTIZ LÓPEZ

DIRECTORA

**DRA. LORENA MERCEDES LUNA CAZÁRES
Instituto de Ciencias Biológicas, UNICACH**

ASESOR

**DR. IVÁN DE LA CRUZ CHACÓN
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: 21 de octubre de 2025

C. **Francisco Isai Ortiz López**

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

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

Los metabolitos secundarios de extractos de *Diospyros digyna* Jacq. (Ebenaceae)
y su efecto biológico

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

Dr. Javier Gutiérrez Jiménez

Mtra. Fátima del Rosario Jiménez Sánchez

Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres

Firmas:

AGRADECIMIENTOS

A cada uno de los docentes del Instituto de Ciencias Biológicas que formaron parte de mi preparación académica, por inspirarme aún en tiempos difíciles.

A la Dra. Lorena Mercedes Luna Cazáres por brindarme las herramientas necesarias para llevar a cabo el proyecto, por su paciencia y motivación que marcaron una diferencia en mi formación profesional y personal.

Al Dr. Iván de la Cruz Chacón por su asesoramiento en la revisión de la tesis y por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Javier Gutiérrez Jiménez y la Mtra. Fátima del Rosario Jiménez Sánchez por sus buena voluntad de ser mis revisores, por todos sus consejos y sugerencias.

A la Mtra. Cecilia Guadalupe Hernández Tondopó y al Biol. Eric Montoya López por sus consejos durante y después de la culminación de este trabajo, por alentarme y apoyarme cuando lo necesité.

Esta investigación forma parte del proyecto “Las plantas medicinales y su efecto sobre microorganismos causantes de infecciones” que se realiza en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía a lo largo de este camino y permitirme llegar a la meta, por abrirme puertas que alguna vez consideré cerradas.

A mis padres Jorge Luis Ortiz López y Sandra Luz López Trujillo cuyo apoyo y motivación constante han sido pilares fundamentales en mi formación académica y personal.

A mis tías Marbella Robles Trujillo y María Isabel Trujillo Herrera por apoyarme incondicionalmente y estar presentes en todo momento.

A mis amigos Axel Torres, Andrea Gerardo, May-Lu Puerto, Angeles Santiago, Diana Girón, Fanny Rincón, Citlali Sumuano y Alejandro Padilla por todos los buenos momentos compartidos y hacer más amena la etapa de la universidad.

A todas aquellas personas que conocí a lo largo de este viaje, que dejaron una huella en mí, inspirándome con sus historias y motivándome a escribir la mía.

A aquel niño con el sueño y la ilusión de dejar su huella en el mundo, quien deseaba enorgullecer a su familia por todos sus logros, quien nunca se rindió y perseveró, pues este logro es testimonio de que el esfuerzo, constancia y fe en uno mismo hacen posibles alcanzar metas que parecen lejanas.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. El género <i>Diospyros</i>	3
2.2. El zapote negro (<i>Diospyros digyna</i>).....	3
2.2.1. Generalidades y distribución.....	3
2.2.2. Descripción botánica.....	5
2.2.3. Sinonimias.....	6
2.2.4. Nombres vernáculos y étnicos	6
2.2.5. Usos medicinales	7
2.3. Metabolitos secundarios	7
2.3.1. Alcaloides.....	8
2.3.2. Compuestos fenólicos o fenoles	9
2.3.3. Terpenos	15
2.3.4. Glucósidos	18
2.4. Bacterias ensayadas	20
2.4.1. Generalidades.....	20
2.4.2. Bacterias Grampositivas	21
2.4.3. Bacterias Gramnegativas.....	27
2.5. <i>Artemia salina</i>	33
III. ANTECEDENTES	35
IV. OBJETIVOS.....	37
V. ZONA DE RECOLECTA.....	38

5.1. Generalidades	38
5.2. Hidrología	39
5.3. Fisiografía	39
5.4. Suelo.....	39
5.5. Clima.....	39
5.6. Flora.....	40
5.7. Fauna.....	40
VI. MÉTODOS.....	41
6.1. Recolecta del material vegetal.....	41
6.2. Obtención de extractos.....	41
6.3. Identificación de metabolitos secundarios	43
6.4. Prueba de actividad antibacteriana	47
6.4.1. Bacterias ensayadas.....	47
6.4.2. Prueba de difusión en agar	47
6.5. Porcentaje de inhibición relativa (PIR).....	48
6.6. Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM).....	50
6.7. Prueba de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	52
6.8. Diseño y análisis estadístico.....	54
VII. RESULTADOS.....	55
7.1. Rendimiento de extractos	55
7.2. Grupos de metabolitos secundarios	55
7.3. Pruebas de inhibición bacteriana.....	57
7.3.1. Efecto de los extractos de hojas	58
7.3.2. Efecto de los extractos de corteza	59
7.4. Porcentaje inhibición relativa (PIR).....	61

7.5. Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM).....	63
7.6. Prueba de toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	66
VIII. DISCUSIÓN	68
IX. CONCLUSIONES	76
X. RECOMENDACIONES.....	77
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES	78
XII. ANEXOS	98

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sinonimias pertenecientes a la especie <i>Diospyros digyna</i>	6
Cuadro 2. Grupos de metabolitos secundarios identificados en extractos de <i>Diospyros digyna</i>	56
Cuadro 3. Efecto inhibitorio de los extractos de hojas y corteza de <i>Diospyros digyna</i> sobre las bacterias ensayadas	58
Cuadro 4. Porcentajes de inhibición relativa (PIR) producidos por los extractos activos de hoja y corteza de <i>Diospyros digyna</i>	62
Cuadro 5. Valores de CIM y CBM de los extractos activos de hojas de <i>Diospyros digyna</i>	65
Cuadro 6. Valores de CIM y CBM de los extractos activos de corteza de <i>Diospyros digyna</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>Diospyros digyna</i> en México.....	4
Figura 2. Distribución de <i>Diospyros digyna</i> en Chiapas.....	4
Figura 3. Árbol de <i>Diospyros digyna</i> ..	5
Figura 4. Diversos tipos de fenoles	10
Figura 5. Tipos de taninos.	12
Figura 6. Flavonoides con propiedades antibacterianas.....	13
Figura 7. Diversas estructuras de quinonas.....	14
Figura 8. Diferencias de la pared celular entre bacterias Gramnegativas y Grampositivas.	21
Figura 9. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 10. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	25
Figura 11. <i>Bacillus subtilis</i>	27
Figura 12. <i>Escherichia coli</i>	29
Figura 13. <i>Salmonella Typhi</i>	30
Figura 14. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
Figura 15. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
Figura 16. Individuo juvenil de <i>Artemia salina</i>	34
Figura 17. Zona de recolecta en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.	38
Figura 18. Obtención de los extractos orgánicos y acuosos de <i>Diospyros digyna</i>	42
Figura 19. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios.....	46
Figura 20. Prueba de actividad antibacteriana.	49
Figura 21. Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM).	51

Figura 22. Prueba de actividad biológica sobre <i>Artemia salina</i>	53
Figura 23. Rendimiento de los extractos de hojas y corteza de <i>Diospyros digyna</i>	55
Figura 24. Intensidad de reacción de los grupos de metabolitos secundarios de extractos de hojas de <i>Diospyros digyna</i>	57
Figura 25. Intensidad de reacción de los grupos de metabolitos secundarios de corteza de <i>Diospyros digyna</i>	57
Figura 26. Halos de inhibición producidos por el extracto de acetato de etilo de hojas de <i>Diospyros digyna</i>	59
Figura 27. Halos de inhibición producidos por el extracto de hexano de corteza de <i>Diospyros digyna</i>	59
Figura 28. Halos de inhibición producidos por el extracto de acetato de etilo de corteza de <i>Diospyros digyna</i>	60
Figura 29. Halos de inhibición producidos por el extracto de metanol de corteza de <i>Diospyros digyna</i>	61
Figura 30. CIM del extracto de acetato de etilo (AcOEt) de hoja y metanol (MeOH) de corteza de <i>Diospyros digyna</i> sobre <i>B. subtilis</i>	63
Figura 31. CIM del extracto de hexano (Hex) de corteza y acetato de etilo (AcOEt) de corteza de <i>Diospyros digyna</i> sobre <i>B. subtilis</i>	63
Figura 32. CIM del extracto de hexano y de acetato de etilo de corteza de <i>Diospyros digyna</i> sobre <i>S. aureus</i> AC.	64
Figura 33. CIM del extracto de acetato de etilo sobre <i>S. epidermidis</i> y metanol de corteza de <i>Diospyros digyna</i> sobre <i>S. Typhi</i>	65
Figura 34. Toxicidad letal media de los extractos de hojas de <i>Diospyros digyna</i>	67
Figura 35. Toxicidad letal media de los extractos de corteza de <i>Diospyros digyna</i>	67

RESUMEN

Entre las plantas medicinales nativas de México se encuentra el zapote negro (*Diospyros digyna*); una especie, muy apreciada en las comunidades rurales por su fruto y las propiedades medicinales que se les atribuyen a las raíces, la madera, las hojas, los frutos y las semillas; estos recursos botánicos se han utilizado para tratar las enfermedades gastrointestinales, la digestión, dermatitis, asma, y trastornos como la hipertensión y las hemorragias. Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto inhibitorio que pueden tener las hojas y las cortezas de tallos del zapote negro sobre bacterias causantes de infecciones.

Por lo anterior, la finalidad de la investigación fue evaluar el efecto biológico de extractos de diferente polaridad de hojas y cortezas de *D. digyna* sobre bacterias Gramnegativas, Grampositivas y asociarlos con sus características fitoquímicas y su posible toxicidad con el ensayo de *Artemia salina*. Se obtuvieron extractos con cuatro disolventes orgánicos de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, metanol y agua) de las hojas y las cortezas de tallo. El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de acetato de etilo de corteza (16.34 %), seguido del hexánico de corteza (11.82 %) y metanólico de hojas (10.41 %).

Los grupos de metabolitos secundarios (MS) se identificaron con pruebas colorimétricas y de precipitación. Los extractos de las hojas y las cortezas tuvieron en común siete de los diez tipos de compuestos secundarios ensayados: (alcaloides, esteroides, fenoles, flavonas, glucósidos, saponinas y taninos condensados); las cortezas adicionalmente presentaron quinonas. De los extractos de hojas, el de acetato de etilo fue el que presentó mayor diversidad de MS (seis), mientras que en los extractos de corteza fue el de metanólico (cinco).

Las pruebas de actividad antibacteriana demostraron que los extractos de hojas fueron los que presentaron menor efecto, siendo activo el de acetato de etilo en la concentración más alta (10 mg/d) sobre *B. subtilis* con halos de inhibición de 6.33 mm,

una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 20 mg. mL⁻¹ y un porcentaje de inhibición relativa (PIR) de 17.1 %; mientras que de los extractos de corteza de tallos el de mayor actividad inhibitoria fue el de acetato de etilo con concentraciones ensayadas (2.5, 5 y 10 mg/d), la más alta produjo halos de inhibición de 14.33 mm sobre *S. aureus* y 12.33 mm sobre *B. subtilis* y, una CIM fue de 10 mg. mL⁻¹ para ambas bacterias y un PIR de 46.2 % y 33.3 %, respectivamente. El extracto de corteza de hexano también presentó actividad antibacteriana con las tres concentraciones sobre *S. aureus* AC, la concentración más alta provocó halos de inhibición de 8.33 mm, una CIM de 40 mg. mL⁻¹ y un PIR de 26.87 %. El extracto también fue activo sobre *B. subtilis* con la concentración más alta con halos de inhibición de 7.66 mm, una CIM de 20 mg. mL⁻¹ y un PIR de 20.7 %.

El bioensayo de letalidad sobre nauplios de *Artemia salina* demostró que los extractos no son tóxicos puesto que presentaron una concentración letal media (CL₅₀) alta, la excepción fue el extracto de acetato de etilo de corteza, el cual presentó una CL₅₀ de 972.09 mg. mL⁻¹, por lo tanto, fue categorizado como moderadamente tóxico.

El efecto antibacteriano de los cuatro extractos activos sobre las bacterias Grampositivas fue estadísticamente significativo, por lo que los extractos de *D. digyna* son susceptibles a ser estudiados en el área de la biotecnología.

Palabras clave: zapote negro, extractos vegetales, actividad antibacteriana, metabolitos secundarios.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de las cualidades especiales de las plantas como remedio para combatir enfermedades se remontan a tiempos prehistóricos, por lo que representan la forma más antigua de medicación aún vigente en la medicina tradicional de muchas culturas (Marrelli, 2021).

Su aprovechamiento, sin duda, comenzó con la continua experimentación de materiales vegetales diversos, que de acuerdo con sus características ofrecían agradables aromas, sabores a los alimentos, alivio al dolor y cura a las enfermedades. Hasta el siglo XIX, las plantas y algunos productos de origen animal y mineral fueron los únicos medicamentos empleados por el hombre en los países occidentales (Juárez *et al.*, 2012). Los productos naturales aún siguen siendo de importancia contemporánea como forma de atención primaria de salud para aproximadamente el 85 % de la población mundial (Fitzgerald *et al.*, 2020).

La diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural de la República Mexicana han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas, que se transformó y aumentó con la llegada de los españoles y cautivos provenientes de otras culturas. Este patrimonio cultural se ha transmitido de generación en generación (García *et al.*, 2012).

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la actual herbolaria tradicional mexicana, soportada por aproximadamente 4 500 especies, por lo que ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (García *et al.*, 2012). El uso y la comercialización de fitofármacos y productos naturales con fines medicinales muestran un crecimiento acelerado en los últimos años, lo que se evidencia con el aumento significativo en la demanda mundial por estos productos. Lo anterior debido a las consecuencias secundarias que algunos fármacos producen (Florián, 2024).

La herbolaria en las comunidades rurales mestizas y de pueblos originarios se ha constituido en el principal medio para la prevención, tratamiento y curación de las

enfermedades. principalmente en comunidades con algún tipo de marginación, sin embargo, entre los usuarios existe, en la mayoría de los casos, un escaso conocimiento de la naturaleza de los principios activos que contienen las plantas y las reacciones que pueden generar en el organismo su consumo por tiempos prolongados (Gallegos, 2015).

Las plantas utilizadas con fines medicinales deben su efecto a una diversidad de principios activos que derivan del metabolismo secundario, denominados metabolitos secundarios (MS). Las plantas producen y acumulan estos compuestos de naturaleza química diversa y se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas diversas y muchos desempeñan funciones ecológicas. El aislamiento de estos compuestos ha sido un tema importante de investigación en los últimos 20 años para la búsqueda y producción de nuevos compuestos más efectivos contra la resistencia bacteriana (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). En la actualidad, se han creado diferentes formas de producción biotecnológicas a gran escala de los principios activos medicinales en las plantas, lo que es importante para la investigación de nuevos compuestos con diferentes fines farmacéuticos (Gil-Rodríguez *et al.*, 2020).

Entre las plantas medicinales nativas de México se encuentra el zapote negro (*Diospyros digyna*), muy apreciado en las comunidades rurales por su fruto y las propiedades medicinales que se le atribuyen a las raíces, la madera, las hojas, los frutos y las semillas, que se han utilizado contra las enfermedades gastrointestinales, la digestión, dermatitis, asma, trastornos como la hipertensión y las hemorragias (Andueza-Noh *et al.*, 2022). Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto inhibitorio que pueden tener las hojas y tallos del zapote negro sobre bacterias causantes de infecciones producidas por bacterias. Por ello, en el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto inhibitorio de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de diferente polaridad de hojas y cortezas de *Diospyros digyna* sobre bacterias Gramnegativas, Grampositivas y el efecto tóxico sobre *Artemia salina*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. El género *Diospyros*

Es el más representativo de la familia Ebenaceae, cuenta con más de 500 especies, con cerca de 120 en el continente americano y más de 20 en territorio mexicano. La distribución principal se presenta en zonas tropicales y subtropicales; muchas de las especies del género son árboles dioicos de porte bajo o medio que crecen en bosques a bajas densidades poblacionales. Pocas especies han penetrado en zonas montañosas y templadas. Muchas de estas especies crecen en regiones húmedas, cerca de ríos o zonas inundables, pero algunas prefieren crecer en vegetación seca, sabanas y bosques caducifolios (García *et al.*, 2015).

Se han estudiado cerca de 130 especies del género *Diospyros* caracterizados por la presencia de carotenoides, taninos, azúcares, carbohidratos, lípidos, compuestos aromáticos, flavonoides, fenoles, cumarinas, esteroides, terpenoides y naftoquinonas en tallos, hojas, raíz, fruto, flor, semilla y corteza, siendo los triterpenos y las naftoquinonas los que se han encontrado de manera más abundante en prácticamente todos los tejidos (Sánchez, 2018).

2.2. El zapote negro (*Diospyros digyna*)

2.2.1. Generalidades y distribución

Se puede encontrar creciendo en selva alta perennifolia y subperennifolia, selva baja caducifolia, bosque caducifolio y vegetación secundaria derivada de estos tipos de vegetación. En México, esta especie se encuentra en varias zonas tropicales y subtropicales del país (Figura 1). De forma nativa a lo largo de ambas costas de México desde Jalisco hasta Chiapas, Veracruz y Yucatán, pero principalmente en los estados de Campeche, Guerrero, Michoacán, Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Yucatán (Fideicomiso de Riesgo Compartido, 2017; Merino-Sánchez *et al.*, 2021).

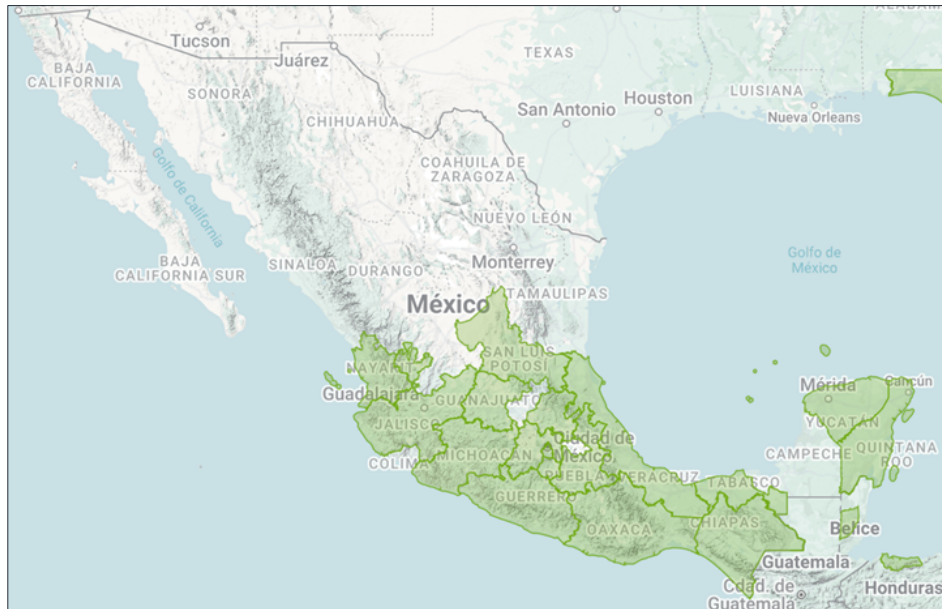


Figura 1. Distribución de *Diospyros digyna* en México. Los Estados en color verde representan su ubicación (iNaturalist, 2025).

En Chiapas, se tienen registros de esta especie en las localidades de Palenque, Catazajá, Copainalá, Tapachula, Berriozábal, Tuxtla Gutiérrez, la Trinitaria y en la Reserva de la Biosfera Montes Azules (Figura 2).

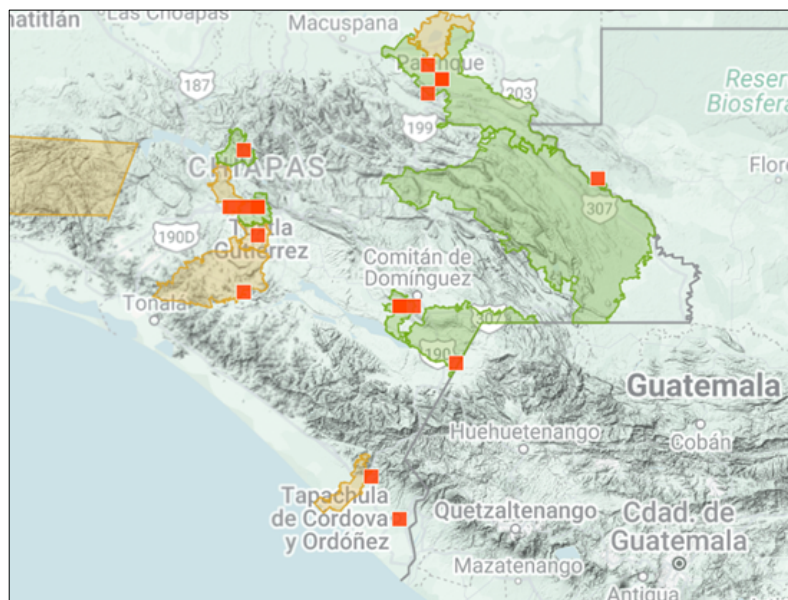


Figura 2. Distribución de *Diospyros digyna* en Chiapas. Los cuadros en color verde y los puntos rojos representan su ubicación (iNaturalist, 2025).

2.2.2. Descripción botánica

Es un árbol que alcanza hasta 25 m de altura (Figura 3), con un tronco de hasta 2.5 m de diámetro a la altura del pecho, las hojas son alternas, simples y enteras, de forma oblongo-elípticas, con una longitud de 1 a 30 cm y textura semicoriácea, presentan el ápice agudo, acuminado u obtuso y la base cuneada o atenuada. Las flores son axilares, solitarias o en cimas, con el cáliz persistente y acrescente, presentan 4 ó 5 sépalos, los cuales están unidos hasta la mitad del cáliz; la corola es de forma urceolado-campanulada, blanca, con 4 ó 5 pétalos unidos hasta la mitad de la corola. El fruto es una baya globosa o semiglobosa, solitaria, verde brillante y lisa, de 3 a 10 cm de diámetro y presentan un olor dulce, el mesocarpio es negro, de textura suave y sabor dulce. Este es un alimento nutritivo y rico en calcio, vitamina C, carbohidratos, minerales y ácido ascórbico, superando en este último a los cítricos (Pacheco, 1981).



Figura 3. Árbol de *Diospyros digyna*. Fotografía Ortiz-López (2023).

2.2.3. Sinonimias

Las sinonimias de *Diospyros digyna* encontradas en la revisión de la literatura especializada se anotan a continuación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Sinonimias pertenecientes a la especie *Diospyros digyna*

Sinonimia	Referencia documental
<i>Diospyros ebenaster</i> Retz.	Jiménez-González y Guerrero-Beltrán, 2021
<i>Sapota nigra</i> Blanco	
<i>Diospyros digyna</i> Jacq.	Royal Botanic Gardens, Kew, 2000
<i>Diospyros sapota</i> Roxb.	
<i>Diospyros obtusifolia</i> Kunth	
<i>Diospyros edulis</i> Lodd.	
<i>Diospyros sapotanigera</i> DC.	
<i>Diospyros tliltzapotl</i> Sessé & Moc.	

2.2.4. Nombres vernáculos y étnicos

El nombre científico aceptado actualmente del zapote negro es *Diospyros digyna*; sin embargo, también puede encontrarse como *Diospyros nigra*, especie originaria de México y Centro América. A esta especie se le conoce con diferentes nombres, dependiendo de dónde crece, el nombre más conocido es zapote negro, sin embargo, también se le conoce como ébano, guayabota, limpia dientes, matasano de mico, zapote prieto, zapote de mico y black persimmon (inglés) (Crane y Balerdi, 2006).

El nombre zapote proviene de la lengua náhuatl (sapote = "tliltzapotl", donde "tilli" significa negro y "tzapotl" zapote), en náhuatl también se le conoce como totocuitlatzapotl (zapote de excremento de pájaro). En maya recibe el nombre de ta'uch o tauch-ya; en totonaco bianqui o sawat; en otomí se le conoce como bomrza o bonza, en zapoteco como biaahui o biaqui; en tenek recibe el nombre de munek'; en zoque como inu y en popoloca como xindé (Crane y Balerdi, 2006; Jiménez-González y Guerrero-Beltrán, 2021; Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2025).

2.2.5. Usos medicinales

Es un remedio utilizado para tratar la diarrea, mejorar la digestión, infecciones de la garganta, desinflamar, ayuda a conciliar el sueño, a reducir el colesterol, a regular el índice de glucosa en la sangre y previene la degeneración macular (Navarrete, 2024).

Uso medicinal de hojas

La cultura totonaca, con pueblos originarios en los estados de Veracruz, Puebla e Hidalgo, utilizaban y quizá, sigan utilizando la infusión de hojas como laxante ligero y antileucorreico (Alfaro, 1984). La decocción de las hojas es útil en el tratamiento de problemas digestivos y respiratorios y de manera tópica alivia dolores musculares y articulares. Las hojas, como cataplasma, han demostrado ser útiles en el tratamiento de enfermedades cutáneas como la lepra, la dermatofitosis o la tiña (infección fúngica de la piel) y enrojecimiento o urticaria de la piel (Jiménez-González y Guerrero-Beltrán, 2021).

Uso medicinal de tallos

La decocción de los tallos consumida por la noche puede ayudar a aliviar los síntomas nerviosos o reducir la fiebre. En forma de compresa, los tallos sirven como astringente (agente antihemorrágico) (Jiménez-González y Guerrero-Beltrán, 2021). La decocción del tallo se usa para tratar la arterioesclerosis y goza de reputación para bajar la presión arterial (Morera, 1992).

2.3. Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran variedad de compuestos orgánicos, la mayoría de los cuales no parecen participar directamente en su crecimiento y el desarrollo. Estas sustancias, tradicionalmente denominadas metabolitos secundarios, suelen estar distribuidas de forma diferencial entre grupos taxonómicos limitados dentro del reino vegetal. Estos metabolitos son aquellos que suelen producirse en una fase posterior al crecimiento, no tienen función en el crecimiento (aunque pueden tener función de supervivencia), como ya se mencionó, son producidos por ciertos grupos taxonómicos,

tienen estructuras químicas inusuales y a menudo se forman a partir de compuestos químicos excedentes del metabolismo primario. Los MS de las plantas son fuentes únicas de posibles productos farmacéuticos, aditivos alimentarios, aromas y otros materiales industriales (Tiwari y Rana, 2015).

Los MS pueden clasificarse de diversas formas, puede basarse en función de: su estructura química (por ejemplo, que tengan anillos, que contengan un azúcar), su composición (contienen nitrógeno o no), su solubilidad en diversos disolventes o la vía por la que se sintetizan. Sin embargo, la clasificación utilizada en este trabajo es la anotada por Ávalos García y Pérez-Urria (2009), quienes agrupan a los metabolitos secundarios en cuatro clases principales: alcaloides, compuestos fenólicos, terpenos y glicósidos.

2.3.1. Alcaloides

Los alcaloides, son compuestos nitrogenados que se sintetizan a partir diversos aminoácidos. La palabra alcaloide proviene del árabe alkali que hace alusión a su comportamiento químico parecido al de las bases que tienen una consistencia jabonosa y sabor amargo. Generalmente aparecen en los vegetales en forma de sales y raramente en forma libre (Balam Díaz, 2024).

Son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. También se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos. Estos compuestos tienen estructuras de bajo peso molecular y forman aproximadamente el 20 % de los MS (Sepúlveda *et al.*, 2003). Dependiendo de su precursor biosintético y su sistema de anillos heterocíclicos, los alcaloides se han clasificado en diferentes categorías que incluyen alcaloides de indol, tropano, piperidina, purina, imidazol, pirrolizidina, pirrolidina, quinolizidina e isoquinolina (Kauri y Arora, 2015).

Se pueden encontrar en una sola especie vegetal (muy específico) o en diversas especies vegetales (inespecíficos). Por ejemplo, la cocaína en las hojas de la coca (específico) y la cafeína en las de té y café (inespecífico) (Anónimo, 2025).

Las fuertes propiedades biológicas de los alcaloides los han hecho históricamente importantes en la medicina convencional y contemporánea. Está bien establecido que pueden usarse para tratar infecciones, especialmente aquellas que muestran signos de resistencia a múltiples fármacos. Las bacterias se encuentran entre los microorganismos patógenos contra los cuales alcaloides como la berberina, la sanguinarina y la piperina han mostrado una potente actividad antibacteriana. Las propiedades antibacterianas de los alcaloides se atribuyen principalmente a su capacidad para alterar las membranas celulares y suprimir la actividad enzimática (Mahmood *et al.*, 2024).

Los alcaloides tienen la capacidad de intercalarse con el DNA, detener la síntesis de proteínas y pueden alterar la división celular. Los alcaloides también pueden ejercer actividades antibacterianas al interferir con los metabolitos primario y energético en las bacterias para bloquear las toxinas bacterianas o inhibir el crecimiento bacteriano. El trifosfato de adenosina (ATP) se encuentra entre los objetivos potenciales de los alcaloides. El ATP no solo juega un papel importante en la respiración y el metabolismo primario, sino que también actúa como fuente de energía para algunas reacciones enzimáticas. Por lo tanto, la inhibición de la ATP sintasa afecta muchos procesos metabólicos normales en las bacterias, lo que puede conducir a la muerte (Yan *et al.*, 2021).

2.3.2. Compuestos fenólicos o fenoles

Los fenoles son compuestos aromáticos que contienen uno o varios grupos funcionales hidroxilo. Se sintetizan mediante diferentes rutas como la del shikimato. Se les clasifica en taninos, flavonoides, quinonas y ligninas. Se agrupan por el número de sustituyentes fenólicos dentro de la molécula, como se muestra en la siguiente figura.

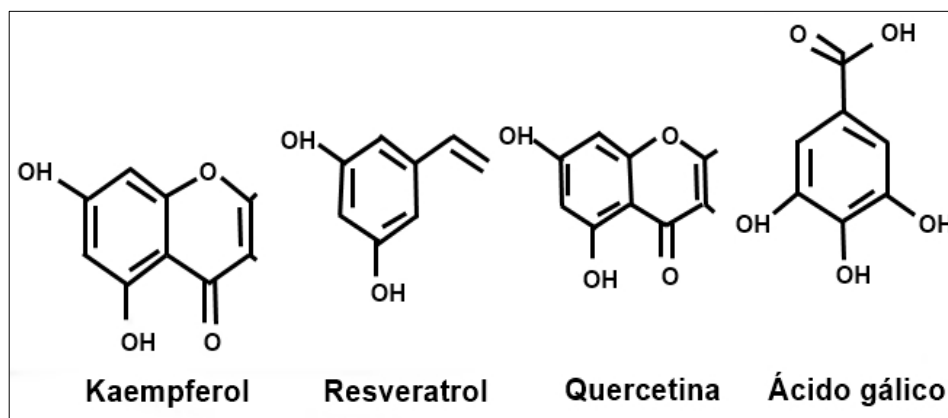


Figura 4. Diversos tipos de fenoles (Meyer *et al.*, 2018)

Los compuestos fenólicos son unos de los principales MS de las plantas. Los fenoles son sintetizados por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, sin embargo, también los factores ambientales regulan su síntesis. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta, por ejemplo, los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que se encuentran en las pieles de frutas y hortalizas. Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Gimeno, 2004).

Químicamente, los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los pigmentos flavonoides (Martín, 2018).

Los compuestos fenólicos poseen actividad antimicrobiana y son más efectivos sobre las bacterias Grampositivas que sobre las Gramnegativas. Tienen la capacidad de inactivar los sistemas enzimáticos y afectan a las bacterias a través del daño a la pared de la membrana celular, este efecto conduce a un cambio en la hidrofobicidad y carga de la superficie celular, con la consiguiente fuga de contenido citoplasmático (Abud *et al.*, 2015). La inhibición de bacterias Grampositivas y Gramnegativas también

se ha evaluado por la destrucción de las células bacterianas y proteínas celulares, además de la inhibición de la actividad Na⁺/K⁺-ATP-asa. La actividad antimicrobiana está en íntima relación con la concentración y la especie microbiana a tratar (Correa y Silva, 2023).

Taninos

Son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular. Poseen un gran número de grupos hidroxilo fenólicos que les brinda la capacidad de formar complejos principalmente con las proteínas y en menor medida con iones metal, aminoácidos y polisacáridos (Vélez-Terranova *et al.*, 2014).

Los taninos están presentes en diferentes plantas, son moléculas complejas formadas por cerca de 12 a 16 grupos fenólicos, lo que les otorga gran capacidad para interactuar con otras moléculas de interés biológico (Hassanpour *et al.*, 2011). Son compuestos que se encuentran en la madera, la corteza, rizomas, raíces y frutas de las plantas. Son parte de la familia de los polifenoles que se encuentran presentes como MS en varias especies vegetales (Olivas *et al.*, 2015; Montoya-Inzunza y Gutiérrez-Grijalva, 2021).

La mayoría de los taninos, según su estructura química se clasifican en dos grupos: condensados (TC) e hidrolizables (TH) (Figura 5), sin embargo, diversos autores incluyen a los florotaninos (derivados de algas café) (Olivas *et al.*, 2015). Se emplean en diversas industrias, entre ellas la farmacéutica, en la que son parte de la formulación de agentes antidiarreicos, antibacteriales, antivirales, inhibidores de enzimas, hepatoprotectores y vasodilatadores, entre otros (Montoya-Inzunza y Gutiérrez-Grijalva, 2021).

Los taninos condensados son el resultado de la polimerización de unidades de flavan-3-ol como la catequina, epicatequina o leucocianidina unidos mediante enlace C-C y carentes de un núcleo glucosídico. Los taninos hidrolizables por su parte están compuestos por ésteres de ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos)

unidos a una unidad central de carbohidrato y su nombre hace referencia a su capacidad para hidrolizarse en presencia de ácidos, bases o enzimas.

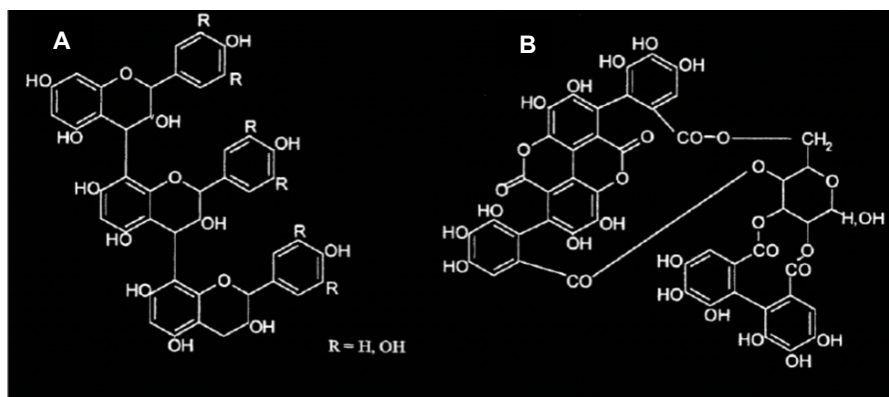


Figura 5. Tipos de taninos. A: condensado; B: hidrolizable (Hassanpour *et al.*, 2011)

Los taninos son capaces de atravesar la pared celular bacteriana hasta la membrana interna, interfiriendo con el metabolismo de la célula causando su muerte. En las bacterias Grampositivas, su acción es rápida mientras que en las bacterias Gramnegativas, que tienen una doble membrana, es mucho más lenta. Además, los taninos pueden quelar el hierro férrico de su entorno, por lo que el hierro no está disponible para las bacterias, el cual es esencial para el crecimiento bacteriano óptimo (Kabeer *et al.*, 2020).

Flavonoides

Los flavonoides, también conocidos como bioflavonoides, forman un grupo de alrededor de 5 000 compuestos fenólicos que tienen una estructura química similar, dotándolos de propiedades funcionales importantes al ser consumidos. Son compuestos que presentan una estructura fenólica básica que presenta uno o más anillos de tipo fenol, en su composición. Son un tipo de polifenol, aunque es importante señalar que no todos los polifenoles son flavonoides, por ejemplo, el resveratrol es un compuesto polifenólico, sin embargo, no es considerado un flavonoide. El resveratrol pertenece a un grupo denominado estilbenos (Cruz, 2025).

Los flavonoides se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también pueden encontrarse de forma libre. Es importante señalar que los glicósidos o glucósidos son compuestos formados por un azúcar y otra molécula cualquiera mediante un enlace no digerible por el intestino humano. No debe confundirse el término glicósido o glucósido, con glúcido, estos últimos son también denominados azúcares, hidratos de carbono o sacáridos (Cruz, 2025).

Estos metabolitos pueden encontrarse en todas las familias de plantas superiores y en casi todas las especies vegetales; es decir, que los flavonoides están presentes en todas las frutas, verduras y hierbas aromáticas. En las plantas, estos compuestos son los principales responsables de los pigmentos rojo, azul y morado que las colorean, tienen funciones de protección ultravioleta (UV), modulan la actividad enzimática, atraen o repelen insectos, son atractivos para los polinizadores (Martín, 2018).

Los flavonoides se clasifican en siete subclases según las modificaciones de sus esqueletos básicos; estas subclases incluyen flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonoles, chalconas, flavanoles y antocianinas (Chen *et al.*, 2023)

Varios flavonoides muestran una buena inhibición bacteriana, actuando como bactericidas y agentes bacteriostáticos; sin embargo, la actividad biológica depende de los grupos sustituyentes de la estructura del flavonoide, que varían entre estructuras, como se observa en la siguiente figura.

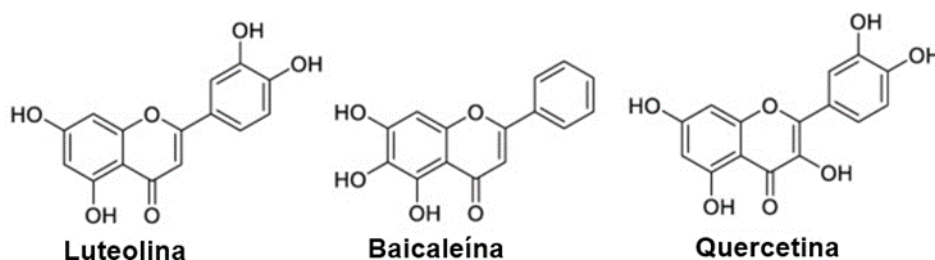


Figura 6. Flavonoides con propiedades antibacterianas (Shamsudin *et al.*, 2022).

Diversos estudios apuntan a la participación de los flavonoides en la disrupción de las membranas celulares. Esta disrupción se derivaría de la partición de compuestos no polares en el interior hidrofóbico de la membrana y debido a la interacción entre la membrana bacteriana y la formación de enlaces de hidrógeno entre grupos polares de lípidos celulares con los flavonoides más hidrofílicos.

Además, otros estudios han apuntado a un aumento de la permeabilidad celular a través de una disminución de los lípidos de la bicapa. Adicionalmente, otros estudios han demostrado la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar alteraciones en la permeabilidad de la membrana y conducir al daño de la membrana (Correa y Silva, 2023).

Quinonas

Son compuestos fenólicos originados por vía acetato, oxigenados, compuestas por un cromóforo básico de benzoquinona, que es una estructura cíclica insaturada con dos grupos carbonilo. La estructura de tipo benzoquinona forma la unidad básica de las quinonas. Por lo tanto, las benzoquinonas sirven como componente básico importante en la biosíntesis de quinonas. En la naturaleza, las benzoquinonas se encuentran en plantas con flores, hongos, líquenes e insectos (Chan *et al.*, 2023).

Los grupos principales de quinonas son las benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y poliquinonas. Algunos ejemplos de ellas son las ubiquinonas y las plastoquinonas que forman parte de las benzoquinonas (Rami *et al.*, 2021); dentro de las naftoquinonas se encuentran la alcalina y plumbagina, mientras que la aloína y lucidina son antraquinonas (Figura 7) (Martínez y Benito, 2005).

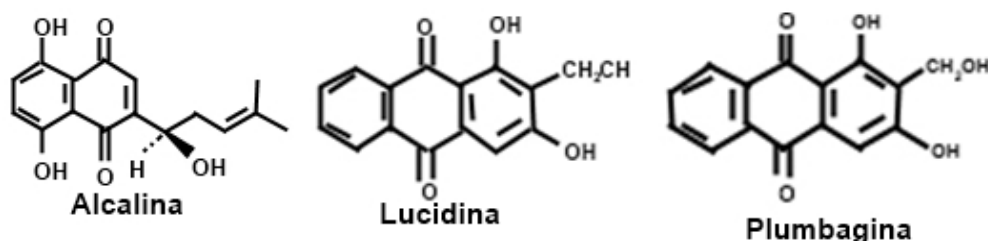


Figura 7. Diversas estructuras de quinonas (*Idem*).

Las quinonas y sus derivados son compuestos biológicamente activos y se ha demostrado que poseen actividad antibacteriana, atribuida principalmente a la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones orto o adyacentes relacionadas con el carbonilo es de interés crucial para la formación de quelatos altamente estables con una miríada de iones metálicos que contribuyen a ampliar las actividades biocidas de las quinonas, especialmente porque pueden influir en las estructuras de las proteínas y en la capacidad reguladora de transferencia de electrones, así como en el reconocimiento/unión del sustrato (Dahlem *et al.*, 2022). Además, la actividad antibiofilm observada en las quinonas se debe a cuatro mecanismos principales: ruptura de membrana y unión al complejo de adhesina a la pared celular, interacción con el ADN eucariota y bloqueo de la fusión viral (Franza y Gaudú, 2022).

2.3.3. Terpenos

Los terpenos corresponden a la familia de los productos naturales con cerca de 40 000 compuestos, son los ejemplos más impresionantes de la evolución divergente de las sustancias químicas de las plantas. Los terpenoides también se conocen como isoprenoides, ya que su estructura base está formada por la unión de unidades de isopreno (C_5H_8), algunos ejemplos son los aceites esenciales, triterpenoides y esteroides (Sánchez y García-Figueroa, 2022).

Su estructura típica contiene esqueletos carbonados generalmente (en algunos casos no se da) representados por $(C_5)_n$, clasificándose como: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}). Los terpenos, pueden encontrarse en fuentes vegetales libres o formando glucósidos (especialmente los triterpenos) en cuyo caso son llamados saponinas (Macías *et al.*, 2010).

Estos compuestos tienen una composición química variada, que va desde una molécula simple con carbono e hidrógeno hasta moléculas más complejas con grupos orgánicos oxigenados, alcoholes, aldehídos, cetonas y éteres. Muchas de estas moléculas con 10 y 15 átomos de carbono tienen una actividad biológica importante

como antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, antiinflamatorios, insecticidas, analgésicos, anticancerígenos y citotóxicos, entre otros (Noriega-Rivera, 2021).

Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente monoterpenos, como el limoneno y el mentol, principales constituyentes de los aceites de limón y menta, respectivamente. Entre los diterpenoides se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas. Entre los triterpenos se encuentran esteroides y esteroides derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 carbonos de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los terpenos de mayor tamaño son los tetraterpenos y politerpenos, entre los que se encuentran los carotenoides (tetraterpenos) y los hidrocarburos de alto peso molecular como el caucho y gutapercha (politerpenos o poliisoprenoides) (Ávalos García y Pérez-Urria, 2009).

Muchos de los compuestos que pertenecen a la familia de los terpenos poseen propiedades antimicrobianas que se han asociado a su composición química, estructura y grupos funcionales. La actividad antimicrobiana de los terpenos puede explicarse por medio de algunos de los siguientes mecanismos de acción: la inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, interferencia de procesos metabólicos esenciales, inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos y la interrupción en la comunicación celular (Gallegos *et al.*, 2019).

Lactonas sesquiterpénicas

Son metabolitos secundarios terpenoide que contienen 15 átomos de carbono con estructura isoprenoide en el que se pueden encontrar uno o más anillos lactónicos que pueden tener una orientación cis o trans. Las lactonas sesquiterpénicas se encuentran en varias familias botánicas como las Angiospermas, incluyendo Amaranthaceae, Apiaceae, Asteraceae, Bombacaceae, Burseraceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Lauraceae y Magnoliaceae, entre otras (Sánchez y García-Figueroa, 2022). La diversidad química de las lactonas sesquiterpénicas se basa en la variedad de estructuras de la cadena principal, la diferente formación del anillo de lactona y la gran variedad de decoraciones de las cadenas principales, la mayoría son γ -lactonas. Esto

significa que son producto de una esterificación intramolecular (lactonización) de un grupo carboxilo con un grupo hidroxilo en la posición γ . Las γ -lactonas pueden formarse de cuatro maneras diferentes: 6,7 cis o trans y 7,8 cis o trans, y en la mayoría de los casos contienen una fracción α -metileno (Frey *et al.*, 2024).

Estas moléculas poseen múltiples actividades biológicas, entre las que se destacan la actividad antineoplásica y citotóxica, ambas vinculadas a la función del agrupamiento α -metilén- γ -lactona, al parecer por ataque nucleofílico de determinados centros activos de las proteínas al doble enlace a través de una adición conjugada. Así, los grupos tiol de la cisteína parecen ser las dianas primarias de las lactonas sesquiterpénicas, la cual da lugar a la inhibición de diversas funciones celulares que conducen a las células a la apoptosis (Ruiz y Suárez, 2015). La actividad antimicrobiana de estos metabolitos secundarios también está asociada a cambios en la síntesis proteica, alteración de la permeabilidad celular e interacción con fosfolípidos de la pared celular que alteran la integridad de la membrana (Mazur y Maslowiec, 2022).

Esteroides

Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, este último sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C 22 y C 23. Los esteroides son componentes naturales de las células vegetales y realizan funciones biológicas en ellas similares a las que realiza el colesterol en las células de los mamíferos: mantenimiento de la estructura y función de la membrana celular (Rahman *et al.*, 2017).

Se ha reportado que los esteroides poseen actividad antibacteriana, tanto contra bacterias Grampositivas como Gramnegativas. El mecanismo de acción de estos compuestos se debe al carácter lipofílico, que ocasionan cambios o daños en la composición de ácido grasos en la membrana exterior de bacterias e incrementan la

permeabilidad causando pérdidas de ATP, fuga de iones y por lo tanto, lisis celular (Jain *et al.*, 2019).

2.3.4. Glucósidos

Pertenecen a la familia química de los glicósidos, que engloban a todos los compuestos químicos unidos a residuos azucarados.

Los glucósidos de las plantas son compuestos químicos formados por la unión de un enlace glucosídico con un azúcar (glicona que es hidrofílica) a otra molécula no azucarada (aglicona o genina que es principalmente lipofílica). Cabe aclarar que los glucósidos no son fenoles, pero muchos compuestos fenólicos se presentan en forma de glucósidos. La forma de unión aumenta la solubilidad en agua, facilita el transporte dentro de la planta, mejora la estabilidad (por ejemplo, frente a la oxidación) y permite la liberación selectiva del principio activo a través de enzimas o cambios de pH (Parada, 2023).

Ampliamente distribuidos en las plantas, los glucósidos son estructuralmente diversos y dadas sus bioactividades comprobadas y uso tradicional, son de gran importancia para la farmacognosia, aunque aún queda mucho por dilucidar sobre sus funciones y propiedades (Bartnik y Facey, 2024).

Existen cuatro grupos de glicósidos de particular interés, el primero es el de las saponinas, en el que se encuentran glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. El segundo es el de los glicósidos cardíacos o cardenólidos, que son semejantes a las saponinas esteroideas, pero su estructura contiene una lactona. El tercero es el de los glicósidos cianogénicos, que se tratan de compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Un ejemplo es la amigdalina. Y el cuarto grupo es el de los glucosinolatos, también llamados glicósidos del aceite de mostaza, los cuales se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos como la mostaza (Ávalos García y Pérez-Urria, 2009).

Las características estructurales de los glicósidos, como la presencia de la fracción de azúcar o el número de grupos hidroxilo, pueden cambiar significativamente la permeabilidad de la membrana y la afinidad posterior a los sitios de unión externos e internos en las bacterias, por lo tanto, pueden dañar la membrana citoplasmática y causar pérdida de componentes intracelulares (Lafuente, 2018).

Saponinas

Las saponinas constituyen una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide o esteroideal, conocidos como aglicona o sapogenina, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifílico. Las saponinas ofrecen también una alta actividad superficial debido a la combinación estructural de un grupo polar (azúcar) y uno no polar (esteroide o triterpeno), propiedad que permite su uso como un detergente natural, agente estabilizante y emulsificador en productos de limpieza y cosméticos (Ahumada *et al.*, 2016).

Las saponinas son producidas principalmente por plantas, donde forman parte del sistema de defensa contra patógenos y depredadores. Diversos géneros de plantas pueden producir estos compuestos en distintas partes como semillas, raíces, hojas, frutos, tallos y cortezas. Un rasgo distintivo de las saponinas es su capacidad de producir espuma (Reichert *et al.*, 2019). Muchos compuestos “formadores de espuma” son glucósidos, así la parte aglicona de las saponinas glucosídicas consiste en triterpenoides pentacíclicos o esteroides tetracíclicos. Son heterogéneos estructuralmente, pero poseen características funcionales en común (Parada, 2023).

Estas moléculas presentan actividad biológica, con beneficios a la salud, dependiendo principalmente del tipo de sapogenina, los azúcares unidos a la estructura y su concentración en la fuente vegetal. Entre las plantas utilizadas en la medicina herbal para tratar diversas enfermedades, la mayoría son consideradas fuentes de saponinas con potencial de aplicación médica mediante el desarrollo de

fármacos. Por ejemplo, en la medicina tradicional china se utiliza el ginseng y otras plantas ricas en saponinas debido a su actividad antimicrobiana (Gongora *et al.*, 2023).

En las saponinas la ramificación terminal del azúcar se relaciona con la actividad antibacteriana ya que forman complejos con esteroides de las membranas celulares y producen poros en la misma, alterando su permeabilidad y provocando la lisis del microorganismo (Carrillo y Galván, 2022). Además, las saponinas han demostrado el potencial de actuar sinérgicamente con los antibióticos, contribuyendo al reciclaje de antibióticos antiguos que alguna vez se consideraron ineficaces debido a problemas de resistencia. Por tanto, el efecto sinérgico de las combinaciones de saponinas con antibióticos estándar abre un campo completamente nuevo de posibles aplicaciones en medicina para superar la resistencia de los microorganismos resistentes a múltiples fármacos (Tagousop *et al.*, 2018).

2.4. Bacterias ensayadas

2.4.1. Generalidades

Las bacterias son microorganismos unicelulares relativamente simples. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana especial, se denominan procariontes. Las bacterias están recubiertas por paredes celulares que en gran parte están constituidas por un complejo hidrato de carbono y proteína denominado peptidoglucano. Suelen reproducirse mediante la división en dos células iguales; este proceso se conoce como fisión binaria. Algunas bacterias pueden producir sus propios alimentos mediante la fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de sustancias inorgánicas y otras sustancias orgánicas (Tortora *et al.*, 2017).

Para identificar a las bacterias se emplean gran variedad de tinciones, una de las más conocidas es la tinción de Gram, que permite dividir a la mayoría de las bacterias en dos tipos, las que retienen el cristal violeta y que se tiñen de color azul se definen como Grampositivas, y las que no lo retienen se denominan Gramnegativas (Jiménez y Vélez, 2012).

La diferencia entre las bacterias Grampositivas y Gramnegativas se debe a la naturaleza química de sus paredes celulares (Figura 4). En las primeras el peptidoglucano no se tiñe propiamente, más bien, parece que actúa como barrera de permeabilidad para evitar la pérdida del complejo de cristal violeta-yodo, el que no es eliminado durante la fase de decoloración y las bacterias continuarán teñidas de color azul ya que el alcohol contrae los poros de la gruesa capa de peptidoglucano; mientras que la capa de peptidoglucano de las bacterias Gramnegativas es muy fina, sin tantos enlaces y con poros de mayor tamaño, además, también es posible que el tratamiento con alcohol extraiga suficientes lípidos de su envoltura para aumentar su porosidad. Por estos motivos, el alcohol elimina más fácilmente el complejo cristal violeta-yodo de las bacterias Gramnegativas (Prescott *et al.*, 2002).

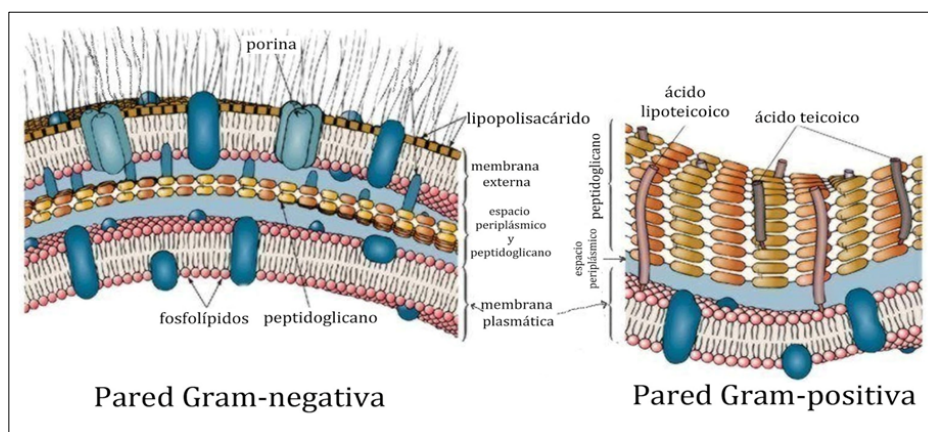


Figura 8. Diferencias de la pared celular entre bacterias Gramnegativas y Grampositivas (Lamont *et al.*, 2015).

2.4.2. Bacterias Grampositivas

Las bacterias Grampositivas producen una gama de toxinas que pueden contribuir a su patogenicidad. Investigaciones recientes han demostrado que muchas de estas toxinas juegan un papel esencial en la supervivencia y virulencia de estas bacterias, pero para algunas toxinas su importancia evolutiva y beneficios potenciales para las bacterias que las albergan siguen sin estar claros. Las toxinas son un factor importante en la patogénesis de muchas infecciones bacterianas Grampositivas, causando daño tisular y contribuyendo a la gravedad de la enfermedad. También pueden tener efectos más allá de su papel directo en la patogénesis, como influir en el comportamiento de

otras bacterias en el microbioma, alterar la respuesta inmune del huésped e incluso la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, provocando resistencia a los mismos (Sharma *et al.*, 2023).

El desarrollo de resistencia en cepas Grampositivas inicia usualmente en las unidades de cuidados intensivos. Es en estas unidades donde los pacientes pueden no sólo tener infecciones cruzadas, sino que pueden al estar expuestos a antibióticos múltiples de amplio espectro desarrollar más resistencia. Durante décadas, la problemática de la resistencia se concentraba en bacterias Gramnegativas, en los últimos años este fenómeno ha cambiado y actualmente la resistencia a los antimicrobianos en bacterias Grampositivas, como *Staphylococcus aureus*, se ha incrementado a nivel mundial y gran parte de las estrategias para el control de la resistencia van dirigidas a este grupo de microorganismos (Morfín *et al.*, 2002).

Las bacterias Grampositivas seleccionadas para determinar el efecto antibacteriano de los extractos vegetales del zapote negro son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*.

Staphylococcus aureus

Esta bacteria (Figura 5) de la familia *Staphylococcaceae* está clasificada como un coco Grampositivo que se agrupa en racimos, β hemolítico, catalasa y coagulasa positiva. Su tamaño oscila entre 0.8 y 1.5 micrómetros de diámetro. Para su crecimiento requiere de temperaturas entre 30 a 37 °C y un pH entre 4.2 a 9.3, siendo el óptimo entre 7 a 7.5 (Pasachova *et al.*, 2019).

Crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, agar infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo donde se recupera fácilmente. El medio recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios es el agar sal manitol o medio de Chapman por su elevado contenido de sal que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gramnegativas. Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica (Prescott *et al.*, 2002).

La identificación de *S. aureus* se realiza con el empleo de la tinción de Gram, pruebas bioquímicas como: prueba de la catalasa, fermentación de glucosa, que permite diferenciar al género *Staphylococcus* del género *Micrococcus*, que también se considera catalasa positiva pero no fermenta la glucosa (Cervantes *et al.*, 2014).

Esta bacteria se encuentra en la microbiota cutánea normal de animales y humanos, con una tasa de transporte de entre el 20 y el 30 % en la población humana sana. *S. aureus* es una de las bacterias más implicadas en las enfermedades humanas, produce infecciones alimentarias ya que las bacterias se multiplican en los alimentos y producen toxinas especialmente si el alimento se mantiene a temperatura ambiente. Los abscesos, las infecciones pulmonares, la bacteriemia, la endocarditis y la osteomielitis son causadas por *S. aureus* en humanos (Ahmad *et al.*, 2021).

Las infecciones por esta bacteria dependen de la producción de proteínas de superficie que inician la adherencia bacteriana a los tejidos del huésped, la secreción de toxinas y enzimas extracelulares que destruyen las células y los tejidos del huésped, la evitación o inactivación del sistema inmunológico del huésped y el crecimiento y expansión de bacterias en células y tejidos huésped. *S. aureus* produce muchas y muy variadas toxinas. Estas toxinas se dividen en cuatro tipos: citotoxinas, enterotoxinas, toxinas exfoliativas y toxinas del choque tóxico (*idem*).

La resistencia a los antibióticos está muy extendida en *S. aureus*. Por ejemplo, la resistencia a los antibióticos betalactámicos tradicionales (penicilina y derivados) que son sensibles a la beta-lactamasa es prácticamente omnipresente en *S. aureus*. Además, esta bacteria puede mostrar, a menudo en forma combinada, resistencia a casi todos los antibióticos disponibles (Cheung *et al.*, 2021).



Figura 9. *Staphylococcus aureus* (Kon, 2015).

Staphylococcus epidermidis

Es una bacteria de la familia *Staphylococcaceae*, es anaerobia facultativa, catalasa-positiva, coagulosa-negativa (CoNS). Las células de *S. epidermidis* son cocos Grampositivos (Figura 6), inmóviles, de 0.5 a 1 μm dispuestos en racimos similares a uvas y aparecen en agar como colonias blancas de 1 a 2 mm. Pueden crecer entre los 15 y 45 °C, sin embargo, la temperatura óptima para ello es de 30 a 37 °C y un pH óptimo es de 6.8. Para su identificación, primero se debe realizar una tinción de Gram, si esta sugiere la presencia de estafilococos, las muestras se inoculan en medios de cultivo con sangre. Se pueden sembrar en medios sólidos, es decir, sangre, soya tripticaseína o agar de infusión cerebro corazón. Luego, las colonias se analizan para determinar la positividad de la catalasa (distingue los estafilococos de los estreptococos) y la negatividad de la coagulasa (distingue de *S. aureus*) (Skovdal *et al.*, 2022).

Uno de los principales factores que permiten a este microorganismo causar infecciones es su capacidad para formar biopelículas en superficies abióticas, como las que se encuentran en los dispositivos médicos implantables. Si bien las infecciones nosocomiales por *S. epidermidis* han atraído mucha atención, este colonizador de la piel aparentemente no ha evolucionado para causar enfermedad, sino que mantiene la relación comúnmente benigna con su huésped. En consecuencia, *S. epidermidis* no produce determinantes de virulencia agresivos. Más bien, los factores que

normalmente sustentan el estilo de vida comensal de esta bacteria parecen generar beneficios adicionales durante la infección (Otto, 2009).

Sin embargo, ahora se reconoce esta bacteria y sus interacciones con el huésped existen en un espectro de patogenicidad potencial derivado de su alta heterogeneidad a nivel de cepa. La evidencia emergente adicional sugiere que algunas cepas de *S. epidermidis* pueden causar infecciones asociadas a implantes, endocarditis de válvulas protésicas e infecciones de marcapasos cardíacos. Además, también es responsable del 30-40 % de las infecciones del torrente sanguíneo nosocomiales (Severn y Horswill, 2023).

Se observa con frecuencia resistencia de *S. epidermidis* a los aminoglucósidos y macrólidos, y en menor medida, a la tetraciclina, el cloranfenicol y la clindamicina. La resistencia intermedia a la vancomicina está aumentando, sin embargo, no se ha informado de la propagación de cepas resistentes a la vancomicina de alto nivel. *S. epidermidis* produce una cantidad muy limitada de exoenzimas y toxinas que dañan los tejidos (Otto, 2012).

La única toxina producida por esta bacteria es la δ -toxina del péptido alfa helicoidal, mayoritariamente N-formilada. Está codificado por el gen *hld* ubicado en el locus regulador *agr*. La δ -toxina provoca la lisis de los eritrocitos mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática (*Idem*).

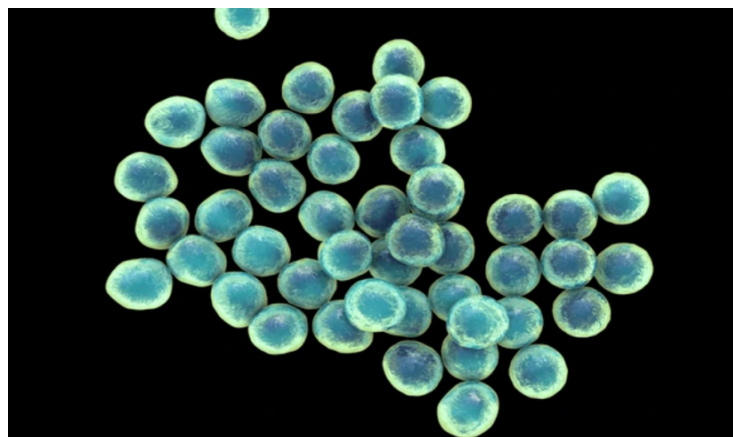


Figura 10. *Staphylococcus epidermidis* (Kon, 2015).

Bacillus subtilis

Es una bacteria de la familia *Bacillaceae*, es aeróbica con forma de bastón (Figura 7) y de rápido crecimiento, que miden típicamente entre 2 y 6 μm de largo y un poco menos de 1 μm de diámetro. Crece en un amplio intervalo de pH de entre 4.9 a 9.3 y su temperatura óptima de crecimiento es de aproximadamente 30 a 35 °C, lo que da un tiempo de duplicación de tan solo 20 minutos (Errington y Aart, 2020). Forma colonias de 2 a 4 mm de diámetro, beta hemolíticas con hemólisis completa, que pueden ser de aspecto liso, mucoso o rugoso; los bordes pueden ser ondulados o extendidos en el medio y ocasionalmente dan la apariencia de cultivos mixtos (Realpe *et al.*, 2002).

Al igual que la mayoría de sus parientes más cercanos, *B. subtilis* es no patógeno, se puede cultivar y manipular genéticamente con relativa facilidad y es eficaz en la secreción de proteínas y metabolitos. Esta bacteria tiene una gran capacidad de mutación genética y, por ello, se utiliza en experimentos en el laboratorio. Es muy utilizada en la producción de numerosos antibióticos, como difciclina, oxidifciclina, subtilisina A, bacilomicina B y bacitracina, así como bacilisocina, auxiliar en el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por bacterias, y evita infecciones en cortaduras y quemaduras leves (Jiménez *et al.*, 2018).

Sin embargo, la capacidad de *B. subtilis* para formar esporas resistentes le permite soportar condiciones extremas de calor y desecación en el ambiente, lo que promueve su supervivencia en muchos casos, como en los hospitales, lo que genera problemas de limpieza y desinfección. La propagación aérea se ha relacionado con el desarrollo de un conjunto de síntomas, particularmente en pacientes inmunodeprimidos, que incluyen irritación de ojos y senos nasales, dolor de garganta, dolor de cabeza, fatiga y mareos (Yassin y Ahmad, 2012).

Se han notificado casos de bacteriemia nosocomial en pacientes con enfermedades subyacentes, como cáncer y trastornos hematológicos. Además, *B. subtilis* produce una toxina extracelular conocida como subtilisina, un compuesto

proteínico, capaz de causar reacciones alérgicas y de hipersensibilidad en personas que se exponen repetidamente a ella (*Idem*).



Figura 11. *Bacillus subtilis* (Kaulitzki, 2006).

2.4.3. Bacterias Gramnegativas

Este tipo de bacterias son los principales agentes causales de infecciones asociadas a la atención de la salud, que comprenden una afección cada vez más común, particularmente en el entorno de salas con pacientes en estado crítico. Estos patógenos causan principalmente infecciones del torrente sanguíneo, tracto pulmonar, tracto urinario, sitios quirúrgicos, piel y tejidos blandos. En la actualidad se reporta en las unidades de cuidados intensivos un número elevado de infecciones ocasionadas por las bacterias Gramnegativas con elevadas tasas de resistencia a los antimicrobianos, lo que representa un problema de gran magnitud en estas áreas, debido a que atienden a pacientes gravemente enfermos que son altamente vulnerables a infecciones y comúnmente requieren de antibióticos para mejorar su posibilidad de supervivencia (Uc-Cachón *et al.*, 2023). Las bacterias Gramnegativas son sensibles a la deshidratación. Por lo tanto, normalmente se encuentran en ambientes húmedos, por ejemplo, fregaderos y sus sistemas de drenaje. Las trampas de agua de los sumideros constituyen un entorno relativamente protegido, que favorece el crecimiento de bacterias y la producción de biopelículas (Gideskog *et al.*, 2023).

Las bacterias Gramnegativas empleadas en esta investigación son *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Escherichia coli

Es una bacteria miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo Gramnegativo (Figura 8), no exigente, oxidasa negativa, catalasa positiva y anaerobio facultativo. Mide solo 1 μm de longitud por 0.35 μm de ancho. Forma colonias que tienen de 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja (Kaper *et al.*, 2004).

Puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C y un amplio rango de pH, de 4.4-10, con un óptimo de 6-7. Se cultivan clásicamente en agar MacConkey, un medio de cultivo que contiene lactosa. Esta bacteria produce indol durante el metabolismo y el crecimiento bacteriano en el medio antes señalado es diagnóstico de *E. coli* (*Idem*).

E. coli causa muchas enfermedades diarreicas, como la diarrea del viajero y la disentería. Este es el patógeno más común que causa cistitis sin complicaciones y también provoca otras enfermedades extraintestinales, como neumonía, bacteriemia e infecciones abdominales como la peritonitis bacteriana espontánea. Esta bacteria es fácil de encontrar y es susceptible de alteración genética natural y aleatoria. Existe una vasta colección de genomas secuenciados de *E. coli* que exhiben diferentes tamaños y diversidad genómica entre comensales y patógenos, lo que indica una gran variedad dentro de la misma especie bacteriana. Forman parte de bacterias no patógenas que pueden actuar como comensales y pertenecen a la microbiota intestinal normal de los seres humanos y de muchos animales (Sosa y Chapoñan, 2022).

También existen variantes patogénicas, divididas en patógenos diarreógenos y extraintestinales, con diferentes patotipos y diversas cepas híbridas naturales. Estas variantes pueden ser patógenos facultativos u obligados. Las bacterias facultativas forman parte del tracto intestinal y pueden actuar como patógenos oportunistas fuera de su hábitat natural, provocando diversos tipos de infecciones extraintestinales (Braz

et al., 2020). *E. coli* es clínicamente relevante ya que posee resistencia a cefotaxima, cefuroxime, ampicilina, cefazolina, levofloxacino, sulfametoxazol, aztreonam y ciprofloxacino (Sosa y Chapoñan, 2022).

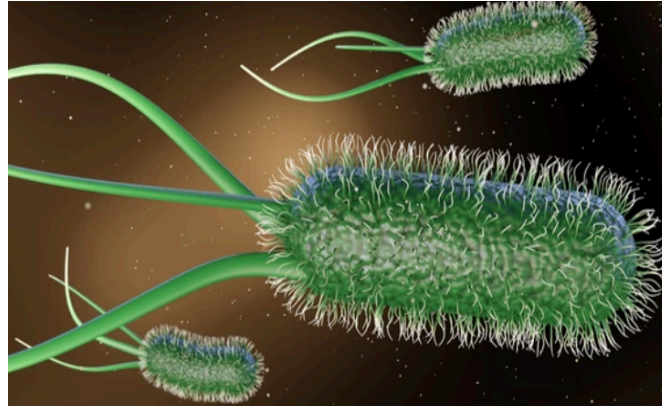


Figura 12. *Escherichia coli* (Kon, 2015).

Salmonella Typhi

Es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, posee forma de bacilo y es flagelada (Figura 9). Toda la bacteria está cubierta por una cápsula que se atribuye a su virulencia y evasión de la fagocitosis en el huésped, lo que ayuda a causar la infección. Posee un tamaño de 2 μm de longitud por 0.4 a 0.6 μm de ancho. Puede crecer en un rango de un mínimo de 7 °C y un máximo de 45 °C, con una temperatura óptima entre 35 a 37 °C y un pH óptimo entre 7 y 7.5. Produce colonias con un centro negro grande brillante o colonias casi completamente negras (Kaur y Jain, 2012).

S. Typhi tiene la capacidad de producir la toxina tifoidea, la cual procede de dos toxinas, CDT y la toxina pertussis, con una estructura novedosa que la hace característica de esta bacteria. La fiebre tifoidea es una enfermedad infecciosa potencialmente mortal causada por esta bacteria, que suele transmitirse a través del agua y los alimentos contaminados. Las personas con fiebre tifoidea llevan la bacteria en la sangre y los intestinos. Los síntomas de la enfermedad son: fiebre alta prolongada, cansancio, cefaleas, náuseas, dolor abdominal y estreñimiento o diarrea, y algunos pacientes presentan erupciones cutáneas (Galán, 2016).

Aunque muchas cepas de *Salmonella* spp. son capaces de causar enfermedades tanto en humanos como en animales, *S. Typhi* es común sólo en huéspedes humanos. El patógeno es capaz de causar enfermedades en los huéspedes evadiendo los sistemas de defensa, adhiriéndose a las células epiteliales y sobreviviendo en las células huésped en presencia de varios factores de virulencia, mediados por plásmidos de virulencia y genes agrupados en distintas regiones conocidas como islas de patogenicidad de *Salmonella*. Estos factores, junto con genes de resistencia a los antimicrobianos mediados por plásmidos, permiten que la bacteria se vuelva resistente a diversos antibióticos de amplio espectro utilizados en el tratamiento de la fiebre tifoidea y otras infecciones. Se observa con frecuencia resistencia de *S. Typhi* ante la gentamicina, estreptomina, estreptomina, amoxicilina, trimetopim/sulfametoxazol y tetraciclina (Khan y Shamim, 2022).



Figura 13. *Salmonella* Typhi (Adao, 2012).

Pseudomonas aeruginosa

Es una bacteria de la familia *Pseudomonadaceae*, tiene forma de bacilo aproximadamente de 0.5-1 μm de diámetro y de 1.5-5 μm de largo (Figura 10). Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa. Puede crecer entre 20 y 43 $^{\circ}\text{C}$, sin embargo su temperatura óptima de crecimiento es de 37 $^{\circ}\text{C}$, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Puede crecer en un pH de 4-6, siendo 5 un pH óptimo. *P. aeruginosa* forma colonias redondas

y lisas con un color verdoso fluorescente; suele producir el pigmento azulado no fluorescente piocianina, que se difunde en el agar (Paz *et al.*, 2019).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista multirresistente que causa infección aguda o crónica en personas inmunocomprometidas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, cáncer, traumatismos, quemaduras, sepsis y neumonía asociada a la ventilación. Esta bacteria, en estados de biopelícula puede sobrevivir en una atmósfera hipóxica u otros ambientes extremadamente hostiles. Además, los tratamientos para la infección causada por esta bacteria son extremadamente difíciles debido a sus rápidas mutaciones y adaptación para ganar resistencia a los antibióticos (Qin *et al.*, 2022).

Este microorganismo muestra resistencia a una variedad de antibióticos, incluidos aminoglucósidos, quinolonas y β -lactámicos. En general, los principales mecanismos de *P. aeruginosa* utilizados para contrarrestar el ataque de antibióticos se pueden clasificar en resistencia intrínseca, adquirida y adaptativa. La resistencia intrínseca de esta bacteria incluye baja permeabilidad de la membrana externa, expresión de bombas de eflujo que expulsan antibióticos fuera de la célula y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos. La resistencia adquirida se puede lograr mediante transferencia horizontal de genes de resistencia o cambios mutacionales (Pang *et al.*, 2019).

La resistencia adaptativa de *P. aeruginosa* implica la formación de una biopelícula en los pulmones de los pacientes infectados, donde la biopelícula actúa como barrera de difusión para limitar el acceso de los antibióticos a las células bacterianas (*Idem*).

Como parte de los factores de virulencia secretados, la bacteria posee el sistema de secreción de toxinas. *P. aeruginosa* tiene cinco sistemas de secreción (I, II, III, V y VI) de los siete tipos existentes en las bacterias. El tipo III (SST3) es el principal mecanismo de patogenicidad asociado a la secreción de toxinas que posee la bacteria; por medio de éste secreta toxinas importantes como: Exo A, Exo T, Exo S, Exo U, y Exo Y las que pueden llegar a inducir apoptosis (Foulkes *et al.*, 2019).



Figura 14. *Pseudomonas aeruginosa* (Burgstedt, 2015).

Klebsiella pneumoniae

Es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, tiene forma de bastón, inmóvil y no formadora de esporas, que varía de 0.3 a 2.0 μm de ancho y de 0.6 a 6.0 μm de largo (Figura 11), con una apariencia mucoide distintiva en placas de agar. Como anaerobio facultativo, *K. pneumoniae* está adaptado para prosperar en entornos tanto aeróbicos como anaeróbicos. Sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo, con una temperatura óptima de crecimiento de entre 37 y 40 °C y un pH de 7.0. Bioquímicamente, fermenta lactosa, es catalasa positiva y citocromo oxidasa negativa (Abbas *et al.*, 2024).

K. pneumoniae afecta en gran medida a las personas con inmunidad comprometida o cuya inmunidad está debilitada por otras infecciones. Sin embargo, esta bacteria es capaz de infectar a personas sanas, lo que lleva a infecciones adquiridas en la comunidad, incluyendo absceso hepático piógeno, meningitis, fascitis necrosante, endoftalmitis y neumonía grave. El desarrollo de la infección adquirida en el hospital suele estar precedido por la colonización del tracto gastrointestinal por esta bacteria. Además, esta colonización puede extenderse al tracto urinario, tracto respiratorio y torrente sanguíneo. Otro aspecto infeccioso de *K. pneumoniae* es su biopelícula, que puede desarrollarse en equipos médicos (catéteres y tubos endotraqueales), causando una fuente de infección sustancial en pacientes cateterizados (Kaspersen *et al.*, 2023).

El mecanismo de resistencia más notable de *K. pneumoniae* es la producción betalactamasas, enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos betalactámicos. Estudios han demostrado su resistencia a penicilinas combinadas con inhibidores de β -lactamasa (amoxicilina más ácido clavulánico y piperacilina más tazobactam), también es resistente a las cefalosporinas de segunda (cefuroxima) y tercera generación (cefotaxima), imipenem, tobramicina y amikacina (Kot *et al.*, 2023).



Figura 15. *Klebsiella pneumoniae* (Kon, 2015).

2.5. *Artemia salina*

Es un artrópodo acuático primitivo (Figura 12) que vive en lagos salados, de la familia Artemiidae con una antigüedad de unos 100 millones de años. El cuerpo consta de tres segmentos: cabeza, tórax y abdomen. La especie presenta dimorfismo sexual, las principales diferencias morfológicas entre machos y hembras observadas en la distancia máxima entre ojos compuestos, la longitud de la primera antena, la anchura del tercer segmento abdominal, la longitud total, el diámetro del ojo compuesto y la longitud abdomen. El macho adulto alcanza los 8-10 mm de longitud, y la hembra 10-12 mm. Los adultos tienen tres ojos y 11 pares de patas. Producen huevos que flotan en el agua, las larvas recién eclosionadas, se denominan nauplios. Si las condiciones ambientales son desfavorables se transforma en quistes (formas de vida latentes) que pueden sobrevivir largos periodos de sequía. Si las condiciones ambientales mejoran, los quistes se "revitalizan" y pueden eclosionar en nauplios (Dumitrascu, 2011).



Figura 16. Individuo juvenil de *Artemia salina* (Dumitrascu, 2011).

Las larvas de *Artemia salina* se han utilizado por más de 40 años en estudios toxicológicos y ecotoxicológicos, y se ha estudiado su biología y usos potenciales en diversos campos como un método práctico y económico para la determinación de bioactividad de compuestos sintéticos y productos naturales. También es útil para predecir actividades plaguicidas y farmacológicas, responde a un amplio rango de compuestos químicos y farmacológicamente diversos; es por ello que resulta tan importante su aplicación en programas de descubrimiento y desarrollo de nuevos plaguicidas y medicamentos de origen natural. Además, permite la evaluación rápida de las relaciones estructura-actividad y son fácilmente observables las interacciones entre compuestos (Pino y Lazo, 2010).

III. ANTECEDENTES

En la revisión documental, solo se encontró ningún reporte de actividad antibacteriana de *Diospyros digyna* sobre las bacterias ensayadas, la que se describe a continuación.

Dinda *et al.* (2006) aislaron diospirodina y nonaacetato de los extractos de acetato de etilo y metanólicos de hojas y tallos de *Diospyros digyna*, y reportaron que estos compuestos son activos frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para el ensayo se utilizaron los métodos de difusión y dilución en agar. Todas las bacterias se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 24 h. La solución de diospirodina se realizó en etanol-agua al 50 % y del nonaacetato en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mg. mL⁻¹. Una parte de las soluciones madre de los compuestos se diluyeron a concentraciones más bajas para realizar las pruebas. Después de 24 horas en incubación, se determinó la actividad antibacteriana positiva midiendo la zona de inhibición del crecimiento (mm).

La concentración de ambos compuestos empleada en los discos fue de 250, 125 y 70 µg/disco. La zona de inhibición en *B. subtilis* para el compuesto 1 fue de 12, 6 y 4 mm, para *S. aureus* fue de 9, 5 y 2 mm, para *E. coli* fue de 8, 3 mm y negativo, para *P. aeruginosa* fue de 5, 2 y negativo, respectivamente. Los resultados del compuesto 2 en las concentraciones ya indicadas fueron: para *B. subtilis* fue de 6, 3 y negativo, para *S. aureus* 4, 2 mm y negativo, para *E. coli* fue de 4, 1 mm y negativo, para *P. aeruginosa* fue de 3 mm, y dos negativos, respectivamente. Se emplearon como control positivo discos de los antibióticos amikacina a 70 µg/disco para *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* y penicilina a 10 µg/disco para *S. aureus*.

Como ya se indicó, hasta el momento, son escasos los estudios realizados para *D. digyna*, sin embargo, existen investigaciones en otras especies del género, como la de Oluwatosin *et al.* (2022), quienes reportaron las actividades antimicrobianas de los extractos metanólicos, clorofórmicos y hexánicos de hojas y corteza de tallo de *Diospyros villosa* utilizando el método de difusión en pozos de agar. Los resultados de

los extractos metanólicos de hojas mostraron actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. La zona de inhibición de los extractos de hoja y corteza de tallo de *D. villosa* a 10 mg. mL⁻¹ fue significativamente mayor en comparación con el control ($p < 0.05$), excepto por la actividad del extracto de corteza de tallo en metanol contra *E. coli*. donde la zona de inhibición a 10 mg. mL⁻¹ fue menor en comparación con el control. A una concentración de 5 mg. mL⁻¹, se encontró que las zonas de inhibición del extracto de metanol de hoja contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* eran mayores con los controles positivos (estreptomicina y gentamicina). La zona de inhibición del extracto metanólico de corteza de tallo a 5 mg. mL⁻¹ observada contra *S. aureus* fue mayor en comparación con el control ($p < 0.05$). Se observó el efecto del extracto clorofórmico de hojas sobre *S. aureus*. Se observó que la zona de inhibición del extracto contra *K. pneumoniae* era mayor en comparación con el control (gentamicina) a una concentración de 10 mg. mL⁻¹. En todas las concentraciones, la zona de inhibición del extracto de hoja en hexánico contra *K. pneumoniae* fue menor en comparación con el control (gentamicina). Mientras tanto, la zona de inhibición contra *K. pneumoniae* a una concentración de 10 mg. mL⁻¹ fue mayor en comparación con el control.

Galo *et al.* (2018) reportaron la presencia de alcaloides, antraquinonas, carbohidratos, flavonoides, saponinas, esteroides, taninos y terpenoides en el extracto acuoso de hoja y de corteza de tallo de *Diospyros mespiliformis*. La actividad antimicrobiana revela que tanto el extracto acuoso de hoja y corteza de tallo de la planta mostraron efecto sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* sp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Salmonella* Typhi. El resultado se obtuvo considerando la zona de crecimiento e inhibición de los organismos por las fracciones de prueba. Las dosis empleadas de extractos acuosos de hoja y corteza de tallo para los discos fueron de 50 mg. mL⁻¹. La zona de inhibición (mm) para *E. coli* fue de 12 y 17, para *P. aeruginosa* de 12 y 20, para *Shigella* spp de 15 y 19, para *S. aureus* de 14 y 18, para *S. pneumoniae* de 5 y 8, para *S. pyogenes* de 28 y 29 y para *S. Typhi* de 24 y 26, respectivamente. Se utilizó Ampiclox (10 mg. mL⁻¹) como control positivo.

IV. OBJETIVOS

General

Evaluar el efecto de los extractos con grupos de metabolitos secundarios de hojas y cortezas de *Diospyros digyna* sobre bacterias Gramnegativas, Grampositivas y *Artemia salina*.

Específicos

- Identificar los grupos de metabolitos secundarios de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de hojas y cortezas de *D. digyna*.
- Determinar la actividad inhibitoria de los extractos de hexano, acetato de etilo, metanol y acuoso de hojas y cortezas sobre las bacterias *Escherichia coli* (ATCC 25922 y AC), *Salmonella Typhi* (ATCC 6539), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 y AC), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 y AC), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) y *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
- Conocer el efecto tóxico de los extractos orgánicos y acuosos de zapote negro sobre *Artemia salina*.

V. ZONA DE RECOLECTA

5.1. Generalidades

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, se encuentra entre los paralelos $16^{\circ}38'$ y $16^{\circ}51'$ de latitud norte; los meridianos $93^{\circ}02'$ y $93^{\circ}15'$ de longitud oeste; altitud entre 200 y 1400 m (Figura 13). Colinda al norte con los municipios de San Fernando, Osumacinta y Chiapa de Corzo; al este con Chiapa de Corzo y Suchiapa; al sur con Suchiapa; al oeste con Suchiapa, Ocozocoautla de Espinosa, Berriozábal y San Fernando. Ocupa el 0.46 % de la superficie del estado. Cuenta con 106 localidades y una población total de 553 374 habitantes (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2010)

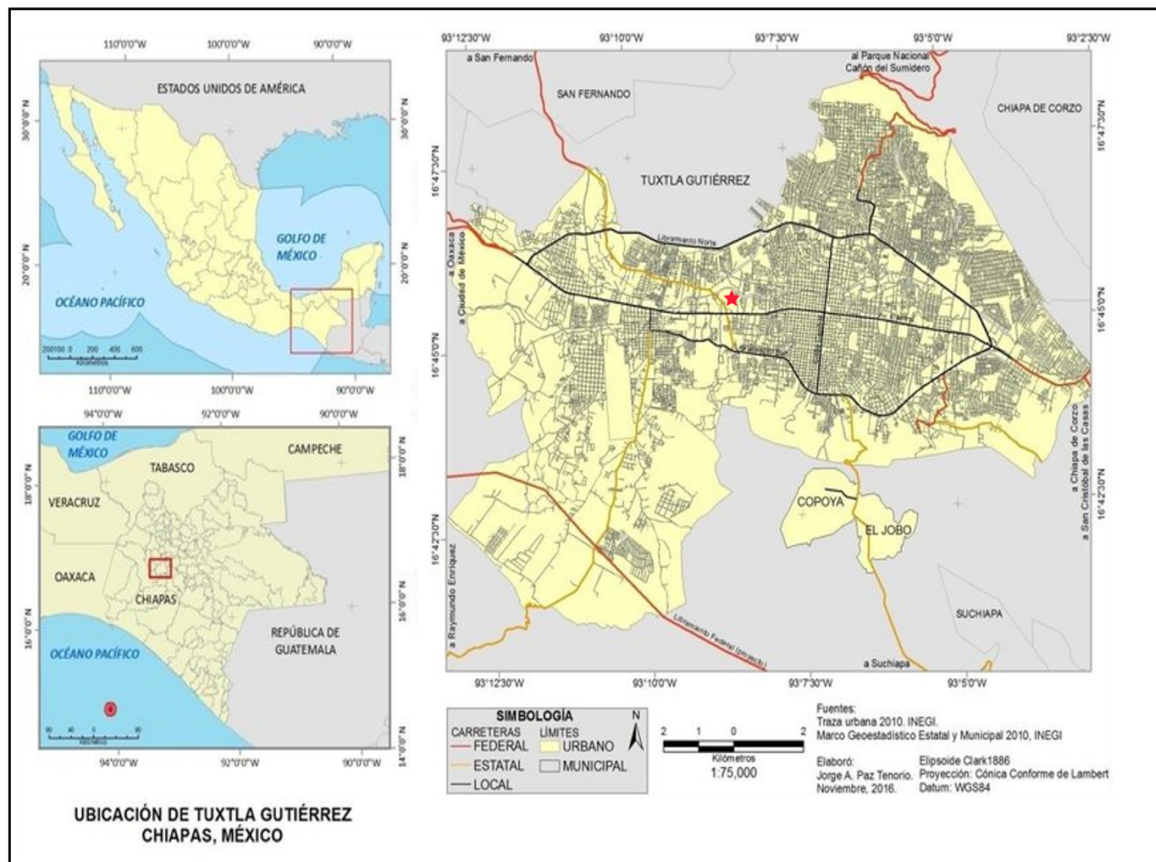


Figura 17. Zona de recolecta en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Paz et al., 2017).

5.2. Hidrología

Las principales corrientes del municipio son: los ríos perennes El Sabinal y Grijalva; y los ríos intermitentes Sabino, San Francisco y Poti, entre otros. El territorio municipal se encuentra dentro de las subcuencas Tuxtla Gutiérrez, Suchiapa, Presa Chicoasén (de la cuenca Río Grijalva Tuxtla Gutiérrez) (Anónimo, 2011).

5.3. Fisiografía

El municipio de Tuxtla Gutiérrez se ubica en la Depresión Central de Chiapas. Fisiográficamente está compuesto por el Valle de Tuxtla y zonas de relieve montañoso tanto al sur como al norte del municipio: la Mesa de Copoya (también conocida como Meseta de Copoya) con la eminencia del cerro Mactumatzá y la Mesa de las Ánimas que bordea el Cañón del Sumidero. El valle comienza en la frontera con el municipio conurbado de Berriozábal y avanza hasta terminar en las riberas del Río Grande (Anónimo, 2011).

5.4. Suelo

Los tipos de suelos presentes en el municipio son: litosol con el 29.26 por ciento asociado con luvisol crómico y rendzina; regosol con el 20.46; rendzina con el 24.39; vertisol pélico con el 23.22 asociado con luvisol; y rendzina asociado con litosol y feosem háplico y la zona urbana que ocupa el 2.66 de la superficie municipal (Hernández y Vásquez, 2009; Anónimo, 2011).

5.5. Clima

El clima predominante es cálido subhúmedo con lluvias en verano (de mayo a octubre) con temperatura máxima antes del solsticio de verano y poca oscilación termal a lo largo del año. En las partes más altas se presentan variaciones de promedio térmicos y de humedad (Anónimo, 2011). En el periodo de noviembre a abril, la temperatura mínima promedio va de 12 °C a 18 °C, y la máxima promedio fluctúa entre 24 °C y 33 °C y una marcha de la temperatura tipo Ganges, con presencia de canícula. En los

meses de mayo a octubre, la precipitación media fluctúa entre los 900 mm y los 1 200 mm, y en el periodo de noviembre a abril, la precipitación media va de los 25 mm a 200 mm (Hernández y Vásquez, 2009).

5.6. Flora

La vegetación es de selva alta o mediana subcaducifolia y selva baja caducifolia. La gradual expansión de la ciudad ha arrebatado mucho terreno a las Áreas Naturales Protegidas que tiene como resultado una alta tasa de deforestación, como sucede en el Parque Nacional Cañón del Sumidero, la Reserva Estatal del Cerro Mactumatzá y el Centro Ecológico Recreativo El Zapotal (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2010). Algunas especies representativas son: aguacatillo (*Nectandra globosa* Aubl.), cacho de toro (*Bucida macrostachya* Standl.), canelo (*Calycophyllum candidissium* Vahl.), capulín (*Trema micrantha* Blume), guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.), sospó (*Pseudobombax ellipticum* Kunth), flor de mayo (*Plumeria rubra* L.), jobo (*Spondias mombin* L.), morro (*Crescentia cujete* L.) y pumpushuti (*Chochlospermum vitifolium* Willd).

5.7. Fauna

Debido al crecimiento demográfico, se han deforestado muchas áreas verdes y muchas especies nativas del municipio han desaparecido o escasean. Algunas especies nativas son: urraca (*Calocitta formosa* Skutch), zanate (*Quiscalus mexicanus* J. F. Gmenlin), tortolita (*Columbina inca* Lesson), paloma bravía (*Columba livia* J. F. Gmenlin), buitre negro americano (*Coragyps atratus* Jefferson), tlacuache (*Didelphis marsupialis* Linnaeus), zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus* Schreber), ardilla (*Sciurus aureogaster* Cuvier), murciélago trompudo (*Choeronycteris mexicana* Jakob) e iguana negra (*Ctenosaura pectinata* F. Wilhem) (Hernández y Vásquez, 2009).

VI. MÉTODOS

6.1. Recolecta del material vegetal

Se recolectaron hojas y cortezas de tallo del árbol *Diospyros digyna* el 16 de agosto del 2021 en el parque Joyyo Mayu ubicado en Prolongación 5a. avenida Norte y Periférico Norte-Poniente en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, en las coordenadas 16°45'40" N y 93°8'38" W. El material fresco se cortó en fragmentos, pero antes se desecharon las partes maltratadas o enfermas de la planta y el polvo. El material se deshidrató a temperatura ambiente y a la sombra, y se molió hasta un tamaño de partícula de 1 mm.

6.2. Obtención de extractos

Extractos orgánicos

Se realizó una extracción selectiva utilizando el equipo de Soxhlet (Redfern *et al.*, 2014) con disolventes de polaridad creciente como hexano, acetato de etilo y metanol. Se pesó el material vegetal que se colocó en la cámara de extracción, envuelto en papel filtro, la muestra estuvo en contacto con cada disolvente por tres periodos de 8 horas.

Cada extracto proveniente del Soxhlet se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio a 120 rpm, se utilizaron temperaturas de acuerdo al solvente utilizado. Los extractos concentrados se depositaron en frascos limpios previamente pesados, el disolvente se terminó de eliminar a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó el rendimiento (%) de cada extracto por gramo de material seco.

Extracto acuoso

Se obtuvo por decocción de 50 g de la muestra vegetal al que se le agregaron 200 mL de agua destilada y se llevó a ebullición por cerca de 15 minutos, el extracto se filtró y el sobrenadante se dejó evaporar a sequedad en condiciones de luz y temperatura ambiente. Los extractos se depositaron en frascos previamente pesados.

Finalmente se determinó el rendimiento (%) de cada extracto por gramo de material vegetal seco empleado y se almacenó a 5°C al abrigo de la luz (Figura 14).

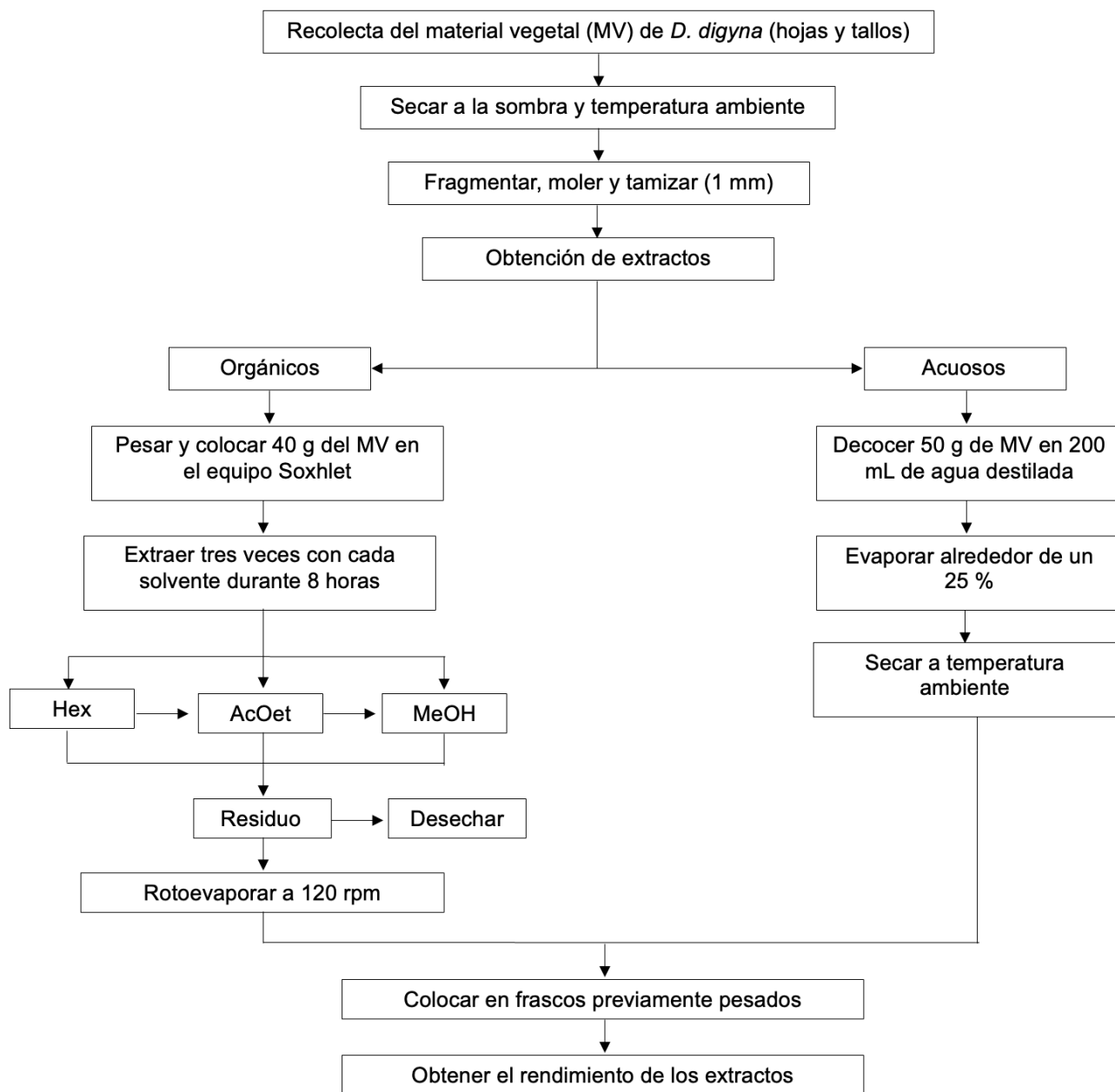


Figura 18. Obtención de los extractos orgánicos y acuosos de *Diospyros digyna*.

6.3. Identificación de metabolitos secundarios

Preparación de solución madre de los extractos

Se preparó una disolución madre con 100 mg de cada extracto diluido en el disolvente con el que se obtuvo cada extracto. Se transfirieron 125 µL de la solución madre de los extractos orgánicos y 75 µL de los extractos acuosos a tubos de ensayo para cada una de las pruebas y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente.

Una vez seco el extracto, se realizaron las pruebas cualitativas para identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes. Las pruebas se realizaron por duplicado y los resultados se anotaron mediante una escala de intensidad de reacción representada por “cruces” para especificar la presencia o ausencia y en su caso la intensidad de los grupos de metabolitos, siguiendo los criterios de presencia: alta (+++=3), media (++=2), ligera (+=1) y ausencia (-=0). A continuación, se describe cada una de las pruebas (Figura 15).

Alcaloides: prueba de Dragendorff (Espinoza, 2014)

En un tubo de ensayo con 125 µL de la solución madre los de extractos orgánicos y a 75 µL de extractos acuosos secos se añadió 1 mL de HCl al 10 %, y dos gotas del reactivo de Dragendorff. Un precipitado marrón indicó la presencia de este tipo de metabolito. Si hubo opalescencia se consideró (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

Fenoles: prueba del cloruro férrico (Miranda y Cuéllar, 2001)

A 125 µL de la solución madre de cada extracto orgánico y a 75 µL de extractos acuosos secos se le añadió 5 mL de cloruro férrico al 5 % en disolución salina. Un ensayo positivo desarrolla coloración rojo-vino para compuestos fenólicos en general; una coloración verde intensa para fenoles condensados (taninos del tipo pirocatecólicos) y una coloración azul para taninos hidrolizables de tipo pirogalotánicos.

Flavonoides: prueba de Shinoda (Domínguez, 1973)

A un tubo de ensayo con 125 μ L de extractos orgánicos y otro con 75 μ L de extractos acuosos secos, se le añadió 1 mL de etanol más tres trocitos de magnesio de 5 mm cada uno y dos gotas de HCl concentrado. El desarrollo de un color naranja indicó la presencia flavona; color rojo para flavonona; rojo azulado para flavonol y violeta para xantinas.

Glucósidos: prueba de Molish (Plummer, 1981)

A un tubo de ensayo 125 μ L de extractos orgánicos y a tubos 75 μ L de extractos acuosos secos, se le añadió 1 mL de etanol, luego dos gotas de alfa-naftol al 5 % en etanol y 1 mL de H₂SO₄, gota a gota dejando resbalar por las paredes del tubo. La formación de un anillo de color violeta indicó una reacción positiva.

Lactonas sesquiterpénicas o Sesquiterpénlactonas: prueba de Baltej (Miranda, 2002)

A un tubo con 125 μ L de extractos orgánicos y a otroa tubos con 75 μ L de extractos acuosos secos, se le agregaron 1 mL de etanol y se agitaron. Posteriormente se le añadieron 1 mL del reactivo de Baljet, lo que permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico. La presencia de una coloración roja (++) o precipitado de color rojo (+++) indicó si la prueba fue positiva.

Quinonas: prueba de Borntrager (Miranda, 2006)

A un tubo de ensayo con 125 μ L de extractos orgánicos y a otros tubos con 75 μ L de extractos acuosos secos, se le añadieron 1 mL de cloroformo y 1 mL de hidróxido de potasio al 5 % en agua. Se agitaron los tubos para mezclar las fases y se dejó en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se coloreó de rosado o rojo, el ensayo se consideró positivo, si el color fue rosa (+++), mientras que si el color fue rojo corresponde a dos cruces (++)

Saponinas: prueba de espuma (Domínguez, 1973)

A un tubo de ensayo con 125 μ L de extractos orgánicos y a otros tubos de 75 μ L de extractos acuosos secos, se les añadió 1 mL de agua destilada, se cubrió y agitó durante 30 segundos, la aparición de espuma que permaneció durante 2 minutos indicó la presencia de saponinas.

Taninos: hidrolizables y condensados (Salem *et al.*, 2013)

A un tubo de ensayo con 125 μ L de extractos orgánicos y a otros con 75 μ L de extractos acuosos secos, se le añadió 1 mL de agua y dos gotas de solución acuosa de FeCl_3 al 2 %. La aparición de una coloración azul indicó la presencia de taninos hidrolizables y una coloración verde la de taninos condensados.

Terpenos-esteroides: prueba de Liebermann-Buchard (Domínguez, 1973)

A un tubo de ensayo con 125 μ L de extractos orgánicos y a otros tubos con 75 μ L de extractos acuosos secos, se le añadieron 1 mL de cloroformo y 1 mL del reactivo de Liebermann-Buchard, reactivo que permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6 (Miranda, 2006). La reacción fue positiva para esteroides si se desarrolló una coloración azul o azul verde; y si se trató de terpenos se pudo observar una coloración roja, rosa o violeta.

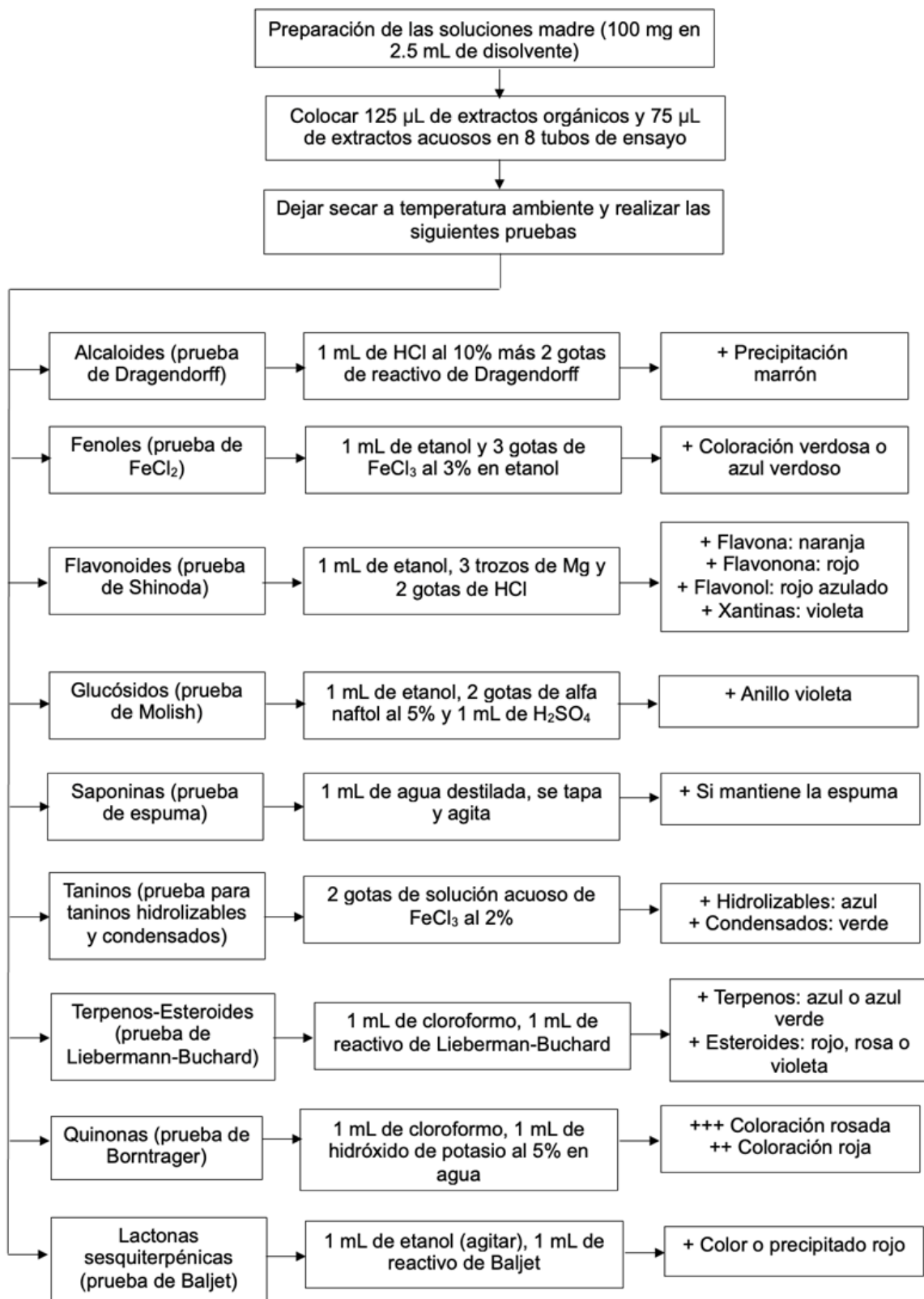


Figura 19. Pruebas de identificación de metabolitos secundarios.

6.4. Prueba de actividad antibacteriana

6.4.1. Bacterias ensayadas

Se ensayaron cuatro extractos de hojas y cuatro de corteza de *D. digyna* sobre siete cepas de colección: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (ATCC 6539), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) y tres cepas de aislamiento clínico (proporcionados por el Hospital Regional Dr. “Rafael Pascacio Gamboa”): *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, respetando la confidencialidad del paciente, estas últimas se denominarán a partir de este momento como aislamiento clínico (AC).

6.4.2. Prueba de difusión en agar

Preparación de soluciones madre

Con el fin de obtener las concentraciones de prueba se preparó una solución madre de 50 mg. mL⁻¹ de cada uno de los extractos. Las concentraciones finales fueron 2.5, 5 y 10 mg/ disco (mg/d).

Preparación de discos

Se cortaron discos de papel filtro Whatman® No.1 de 5 mm de diámetro, los que se esterilizaron a 121°C y 15 lb de presión durante 15 minutos. En condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se impregnaron discos con cada una de las concentraciones antes indicadas.

Reactivación de bacterias

Se sembraron las bacterias en caldo nutritivo y se incubaron a 36°C ± 1 durante 24 horas, después se realizó la tinción a cada cepa para corroborar el tipo de Gram, se sembraron en placa por 24 horas, se revisó la morfología colonial y se realizaron pruebas bioquímicas con el sistema API 20E (Biomériux®). Una vez corroborada la

identidad de la cepa se mantuvieron en agar soya tripticaseína inclinado (Herrera, 1999).

Preparación del inóculo

Para preparar el inóculo de cada cepa se tomaron con un asa de 3 a 6 colonias aisladas y se cultivaron en caldo soya-tripticaseína e incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por aproximadamente 6 horas. La turbidez de la suspensión se ajustó a 0.5 de la escala de McFarland, que corresponde a cerca de 1.5×10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (1.5×10^8 UFC/mL⁻¹).

La inoculación de cada cepa se realizó en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton en condiciones de esterilidad, pasando un hisopo estéril sobre toda la placa, rotándola aproximadamente 90° para asegurar su distribución homogénea. Se esperaron de 5 a 10 minutos y después se colocaron los discos utilizando una pinza estéril. Los discos tuvieron una distribución equidistante sobre la circunferencia de la placa de agar. En otras placas de agar Mueller-Hinton se sembró el mismo inóculo y se colocó un disco con gentamicina (2.5 mg/d), este correspondió al control positivo.

Después se invirtieron las placas y se incubaron a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 18 horas. La acción antibacteriana se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición en mm, la medida incluye el diámetro del disco. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (Figura 16).

6.5. Porcentaje de inhibición relativa (PIR)

Este cálculo se utilizó para cuantificar el efecto de inhibición de cada uno de los extractos que produjeron zonas de inhibición en las cepas evaluadas con respecto al efecto inhibitorio de la gentamicina (Sigma-Aldrich®) como control positivo (CP) (modificado de Ramírez y Díaz, 2007). Se asumió que el máximo efecto inhibitorio fue producido por el CP en las mismas concentraciones que los extractos evaluados. Para el cálculo se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{PIR} = \frac{\text{Diámetro halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro halo de inhibición del CP}} \times 100$$

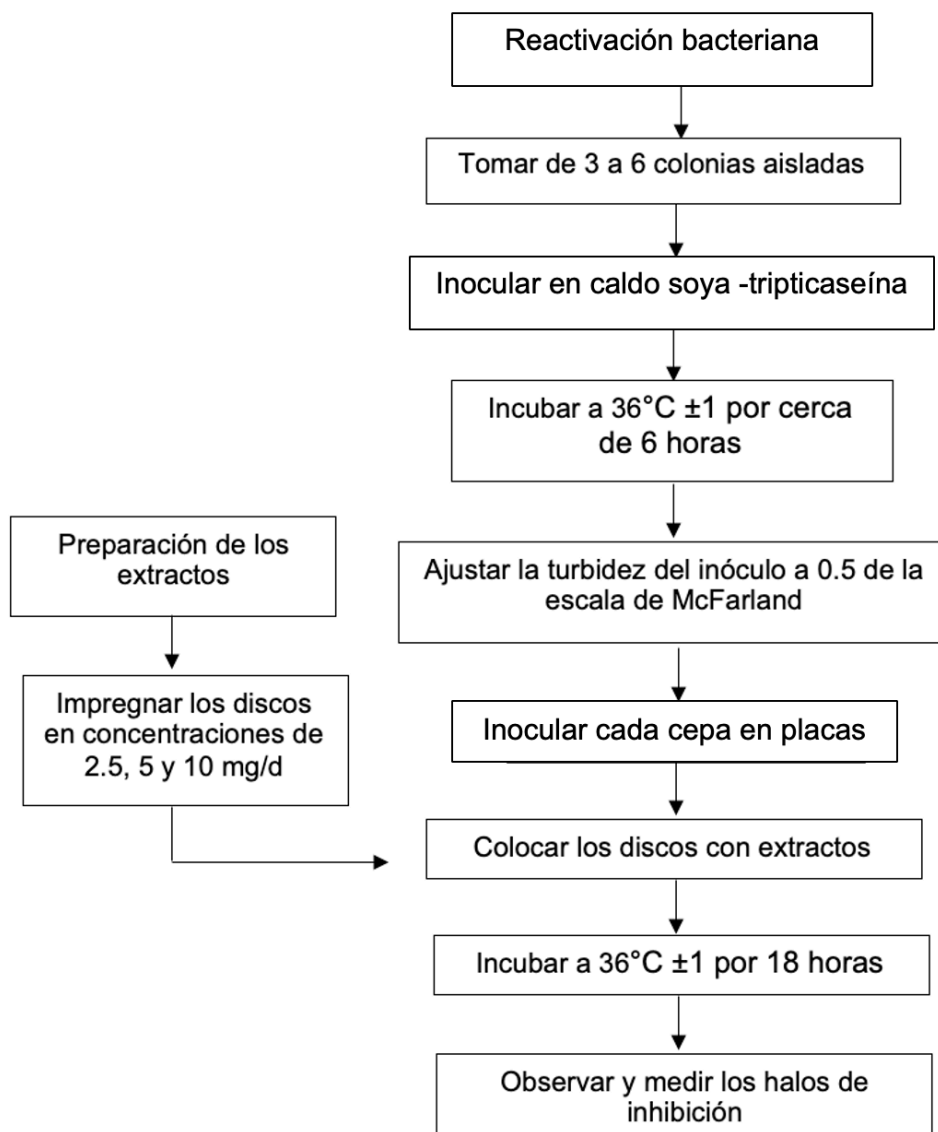


Figura 20. Prueba de actividad antibacteriana.

6.6. Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM)

Preparación de la solución madre de la CIM

Para preparar la solución madre de cada extracto se pesaron 96 mg del extracto a evaluar y se disolvieron en caldo Müeller-Hinton y en DMSO (Sigma-Aldrich®).

Preparación de la resazurina y gentamicina

Se disolvió 0.00118 g de resazurina (Sigma-Aldrich®) en 1 mL de agua destilada estéril y 0.01 g de gentamicina (Sigma-Aldrich®) en 1 mL de caldo Müeller-Hinton (Sarker *et al.*, 2007).

Prueba de microdilución en caldo (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)

Por el método de microdilución seriada en medio líquido se determinaron los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Sarker *et al.*, 2007) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos en estudio contra las bacterias que fueron inhibidas en la prueba de la CIM (Zampini *et al.*, 2007) (Figura 21).

Se utilizaron placas estériles con 96 pocillos (Brandplates®), se prepararon en una campana de flujo laminar de la siguiente manera: en todos los pocillos se depositaron 100 µL de caldo Müeller-Hinton y en el primer pocillo 100 µL de solución madre, a partir de este se realizaron transferencias para obtener diluciones seriadas (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078 y 0.039 mg. mL⁻¹). Después se añadieron a cada pocillo 10 µL de la solución de resazurina (Sigma-Aldrich®) y 10 µL del inóculo. En la misma placa se realizaron controles de esterilidad, viabilidad bacteriana, controles negativo y positivo con el agente antimicrobiano gentamicina (Sigma-Aldrich®). Las placas fueron preparadas por duplicado (Sarker *et al.*, 2007).

Las placas se incubaron aeróbicamente a 36° C ± 1 por 18 horas. Al finalizar se observó la coloración de cada pozo: color rosa indica crecimiento y azul inhibición del crecimiento bacteriano, determinando entonces el valor de la CIM para cada

microorganismo, la cual es definida como la menor concentración del agente microbiano capaz de inhibir el crecimiento (Sarker *et al.*, 2007).

Se determinaron tres controles, el control positivo (gentamicina + caldo + bacteria + resazurina), control negativo (DMSO + caldo + bacteria + resazurina) y el control estéril (extracto + caldo + resazurina).

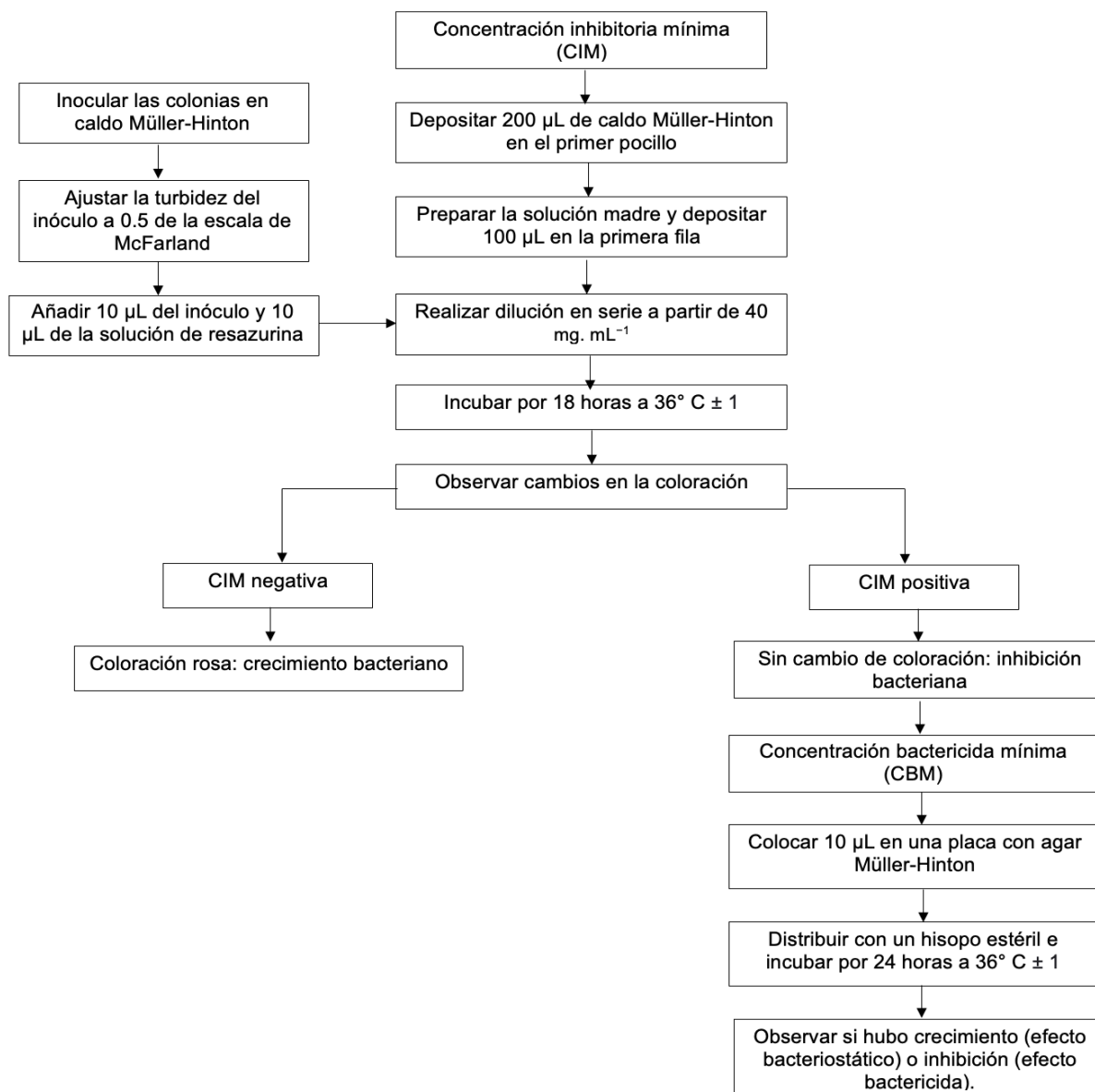


Figura 21. Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM).

6.7. Prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*

Se expusieron nauplios de *Artemia salina* a los extractos de *D. digyna* para determinar la concentración letal media (CL₅₀), expresada en g.mL⁻¹. Los valores de CL₅₀ no advierten una actividad fisiológica o biológica en particular, son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas (Sánchez y Neira, 2005).

Se empleó el método de McLaughlin *et al.* (1998) para determinar la toxicidad de los extractos acuosos y orgánicos. Para ello se construyó una pecera dividida en dos secciones, una totalmente oscura y la otra descubierta, en la que se depositó agua salina (30 g de sal de mar en 1 L de agua destilada), con oxigenación constante, se iluminó con un foco. Los huevecillos se colocaron en la parte oscura y se esperó a que eclosionaran.

Para la preparación de las disoluciones de extractos a evaluar se disolvieron en etanol, posteriormente se transfirieron 100, 50 y 5 µL a tubos de ensayo dejando evaporar el disolvente. Después se añadieron 5 mL de agua salina y se depositaron 10 larvas del crustáceo (con 24 horas de eclosión) en cada uno de los viales. Las concentraciones finales fueron: 10, 100 y 1000 mg. mL⁻¹ que equivalen a 10, 100 y 1000 ppm en cada vial (Figura 18).

Con un microscopio estereoscópico, se realizaron conteos a las 24 horas de nauplios sobrevivientes. Las pruebas se realizaron por quintuplicado, se evaluó un control positivo el cual contenía agua salina y las larvas de crustáceo, y otro negativo en las mismas concentraciones que los extractos. En caso de muertes en el testigo, los valores de las concentraciones se corrigieron mediante la fórmula de Abbot's (McLaughlin *et al.*, 1998).

Donde:

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

C: número de muertes por testigo

T: número de muertes en el tratamiento

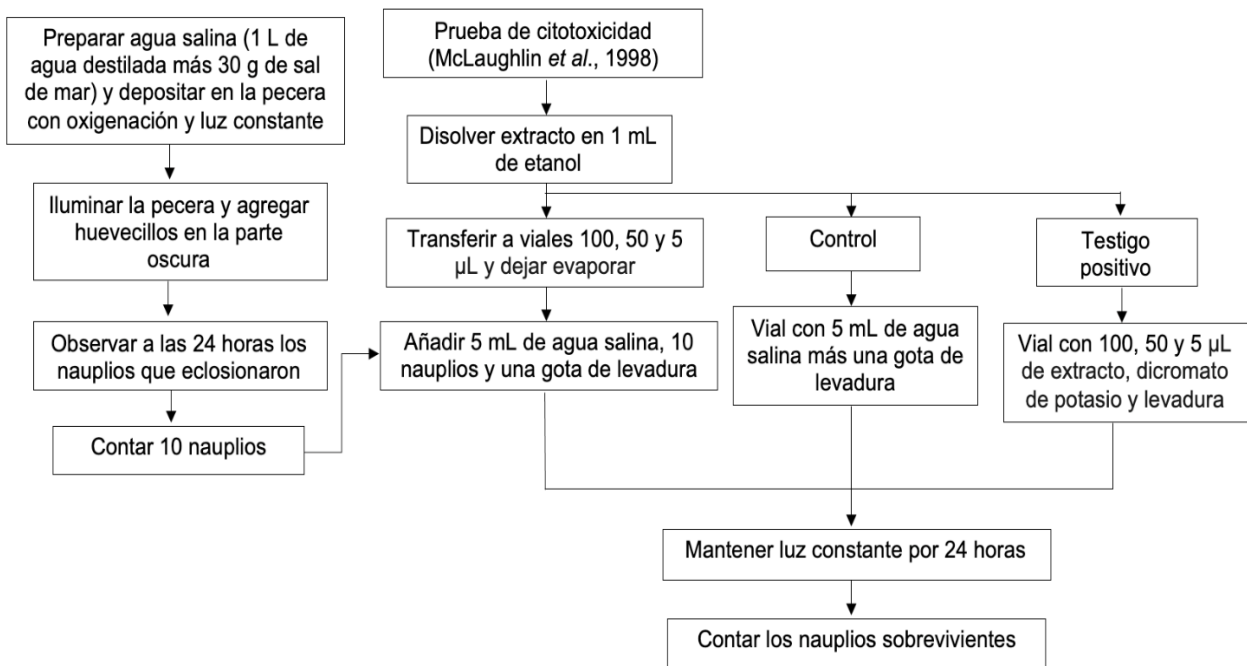


Figura 22. Prueba de actividad biológica sobre *Artemia salina*.

6.8. Diseño y análisis estadístico

Los resultados de la prueba de actividad antibacteriana se evaluaron estadísticamente utilizando el programa R (versión 4.5.1.). Para evaluar la normalidad de los datos se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis con el fin de comparar las medianas entre los grupos. En los casos en que se detectaron diferencias significativas, se aplicó la prueba post hoc de Dunn con la corrección de Bonferroni para identificar entre qué grupos existían diferencias estadísticamente significativas. Los datos que presentaron distribución normal se analizaron estadísticamente con el programa STATGRAPHICS Centurion (versión de prueba). Para determinar si existen diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas se realizó un Análisis de Varianza Simple (ANOVA) con un 95 % de confianza. Posteriormente, en aquellos casos donde se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba de Tukey HSD como método post hoc, lo que permitió identificar entre qué grupos se presentaban dichas diferencias.

Los datos obtenidos de las pruebas de *Artemia salina*, que se realizaron por quintuplicado, se analizaron con el algoritmo logic del programa estadístico PROBIT.

VII. RESULTADOS

7.1. Rendimiento de extractos

Empleando disolventes de polaridad creciente se obtuvieron ocho extractos, cuatro de hojas y cuatro de corteza de tallo de *Diospyros digyna* (Figura 19, Anexo 1). El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de acetato de etilo de corteza (16.34 %), seguido del hexánico de corteza (11.82 %) y metanólico de hojas (10.41 %).

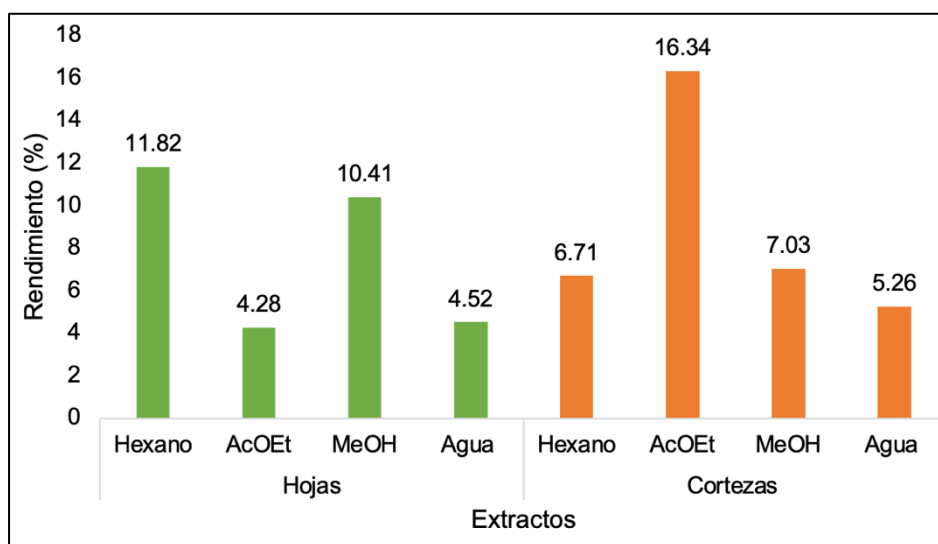


Figura 23. Rendimiento de los extractos de hojas y corteza de *Diospyros digyna*.

7.2. Grupos de metabolitos secundarios

Las hojas y las cortezas tuvieron en común siete de diez tipos de compuestos secundarios ensayados (alcaloides, esteroides, fenoles, flavonas, glucósidos, saponinas y taninos condensados) con diferencias en la intensidad (Cuadro 2, Anexo 2), las cortezas adicionalmente presentaron quinonas (Cuadro 2, Anexo 3).

Los MS presentes con mayor intensidad (+++) en los extractos de hojas fueron los alcaloides en el extracto acuoso y los esteroides en el extracto hexánico (Figura 20). Los extractos con mayor número de MS fueron el de acetato de etilo (seis), el metanólico (cinco) y el acuoso (cinco), el de menor número fue el hexánico (dos) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Grupos de metabolitos secundarios identificados en extractos de *Diospyros digyna*.

Metabolitos secundarios		Estructura							
		Hojas				Corteza			
		Hex	AcOEt	MeOH	H ₂ O	Hex	AcOEt	MeOH	H ₂ O
Alcaloides		-	+	+	+++	-	-	++	+
Esteroides		+++	++	-	-	+	-	-	-
Fenoles		-	+	+	+	-	+	-	-
Flavonoides	Flavona	-	-	+	+	-	++	+	-
	Flavonona	-	-	-	-	-	-	-	-
	Flavonol	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucósidos		++	++	++	++	-	++	++	-
Lactonas sesquiterpénicas		-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas		-	+	++	+	-	-	+	-
Taninos	Condensados	-	+	-	-	-	+	+	+
	Hidrolizados	-	-	-	-	-	-	-	-
Terpenos		-	-	-	-	-	-	-	-
Quinonas		-	-	-	-	++	-	-	-

Extractos: Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; H₂O: acuoso. Intensidad: ausencia (-); baja (+); media (++); alta (+++).

En los extractos de corteza, ninguno de los MS presentó una alta intensidad (+++), sin embargo, los que presentaron una intensidad media (++) fueron los alcaloides y glucósidos en el extracto metanólico, las flavonas y glucósidos en el extracto de acetato de etilo y las quinonas en el extracto hexánico (Figura 21). Los extractos con mayor número de MS fueron el metanólico (cinco) y el de acetato de etilo (cuatro), los de menor número el hexánico (dos) y el acuoso (dos) (Cuadro 2).

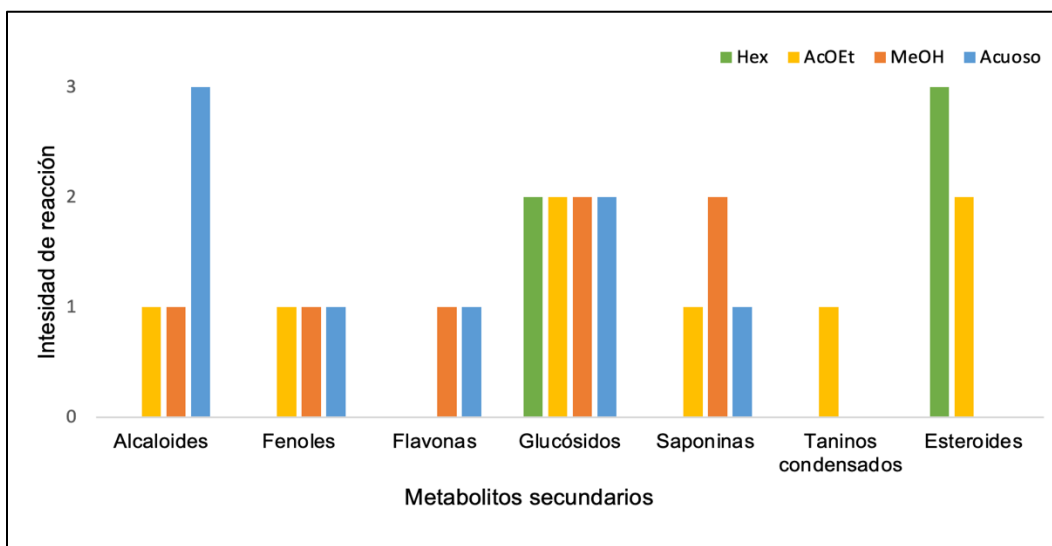


Figura 24. Intensidad de reacción de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de hojas de *Diospyros digyna*. Intensidad: ausente 0= (-); baja 1= (+); media 2= (++); alta 3 = (+++).

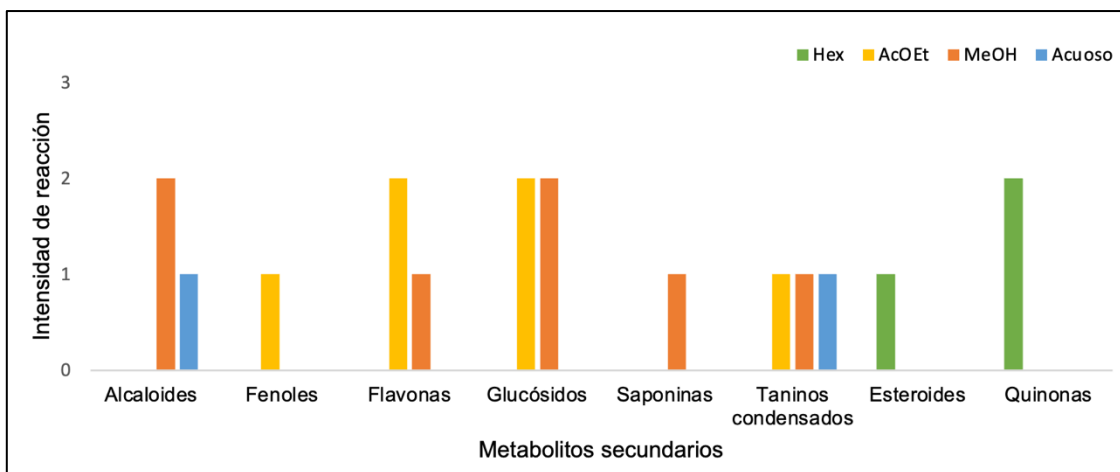


Figura 25. Intensidad de reacción de los grupos de metabolitos secundarios en extractos de corteza de *Diospyros digyna*. Intensidad: ausente 0= (-); baja 1= (+); media 2= (++); alta 3 = (+++).

7.3. Pruebas de inhibición bacteriana

De los extractos, el de acetato de etilo de hojas inhibió a *B. subtilis*, mientras que el extracto de acetato de etilo de corteza fue el que presentó mayor actividad, inhibiendo a *S. aureus* AC, *S. epidermidis* y *B. subtilis*, por otra parte, el extracto hexánico de

corteza no permitió el crecimiento de *S. aureus* AC y *B. subtilis*, mientras que el extracto metanólico de *B. subtilis* y *S. Typhi* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto inhibitorio de los extractos de hojas y corteza de *Diospyros digyna* sobre bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

Bacterias	Estructura							
	Hojas				Corteza			
	Hex	AcOEt	MeOH	H ₂ O	Hex	AcOEt	MeOH	H ₂ O
<i>S. aureus</i> AC	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	+	-	-	+	+	+	-
<i>S. Typhi</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>E. coli</i> AC	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> AC	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Inhibición bacteriana: positiva (+); negativa (-).

7.3.1. Efecto de los extractos de hojas

Los extractos de hojas de *D. digyna* fueron los de menor actividad inhibitoria, el de acetato de etilo fue el único activo en la concentración más alta (10 mg/d) inhibió a *B. subtilis* con halos de inhibición de 6.33 mm en promedio (Figura 22, Anexo 4). La prueba de Kruskal-Wallis mostró que el efecto del extracto sobre esta bacteria fue significativo ($P = 0.034$; Anexo 6), sin embargo, la prueba de Dunn indicó que las diferencias entre las tres concentraciones no fueron lo suficientemente grandes para ser consideradas estadísticamente significativas ($P > 0.05$; Anexo 6).

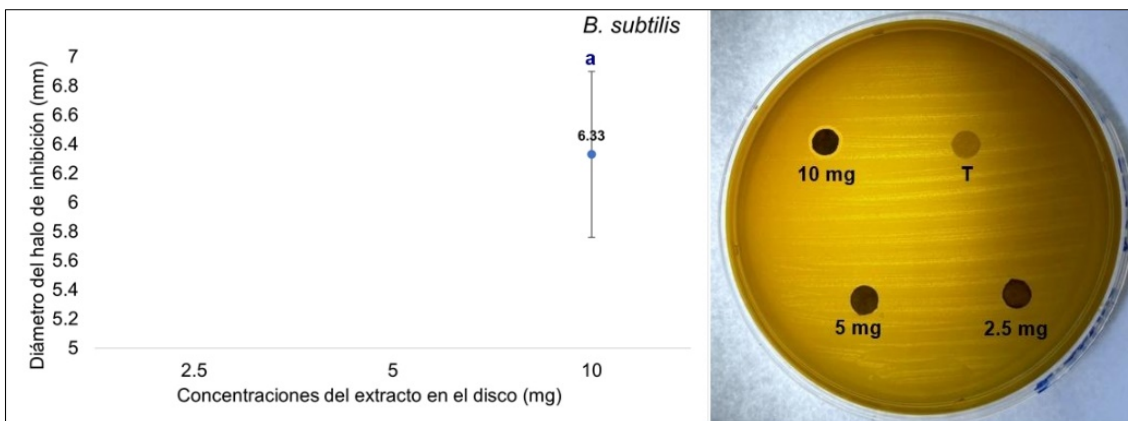


Figura 26. Halos de inhibición producidos por el extracto de acetato de etilo de hojas de *Diospyros digyna*. La línea vertical en la gráfica corresponde a la desviación estándar.

7.3.2. Efecto de los extractos de corteza

El extracto de hexano presentó actividad inhibitoria con las tres concentraciones sobre *S. aureus* AC, la concentración más alta provocó los mayores diámetros de inhibición con un promedio de 8.33 mm (Figura 24, Anexo 5). El extracto también fue activo sobre *B. subtilis* con la concentración más alta con un promedio de 7.66 mm (Figura 24, Anexo 5).

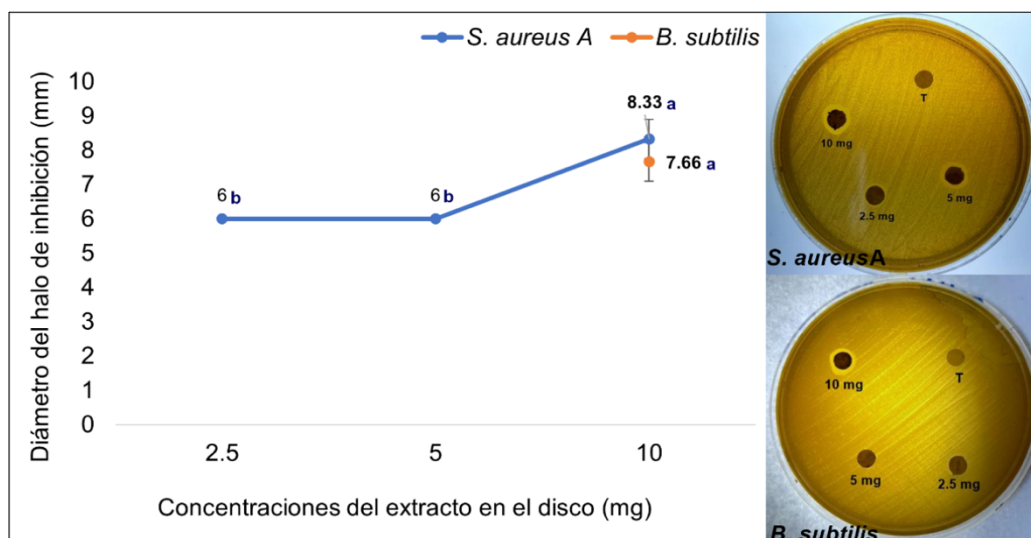


Figura 27. Halos de inhibición producidos por el extracto de hexano de corteza de *Diospyros digyna*. La línea vertical en la gráfica corresponde a la desviación estándar.

El efecto de las concentraciones del extracto sobre *S. aureus* AC y *B. subtilis* fue significativo ($P= 0.021$ y 0.034 , respectivamente) (prueba de Kruskal-Wallis, Anexo 7). Para *S. aureus* AC, la prueba de Dunn mostró que las comparaciones de las concentraciones 10 vs 2.5 mg/d y 10 vs 5 mg/d fueron estadísticamente significativas ($P_{adj}= 0.048$), mientras que la comparación entre 2.5 y 5 mg/d no mostró diferencia significativa ($P_{adj}= 1.000$), sin embargo, para *B. subtilis* las tres concentraciones no presentaron significancia estadística ($P > 0.05$; Anexo 7).

El extracto de acetato de etilo fue el de mayor actividad inhibitoria, inhibió con las tres concentraciones a *S. aureus* AC y *B. subtilis*, la concentración más alta (10 mg/d) presentó los mayores diámetros de inhibición, sobre la primera bacteria, los halos de inhibición fueron en promedio de 14.33 mm y para *B. subtilis* fue de 12.33 mm (Figura 23, Anexo 5). Este extracto también inhibió a *S. epidermidis*, solo en la concentración más alta y con potencia baja (halos de inhibición de 6.33 mm), (Figura 23, Anexo 5).

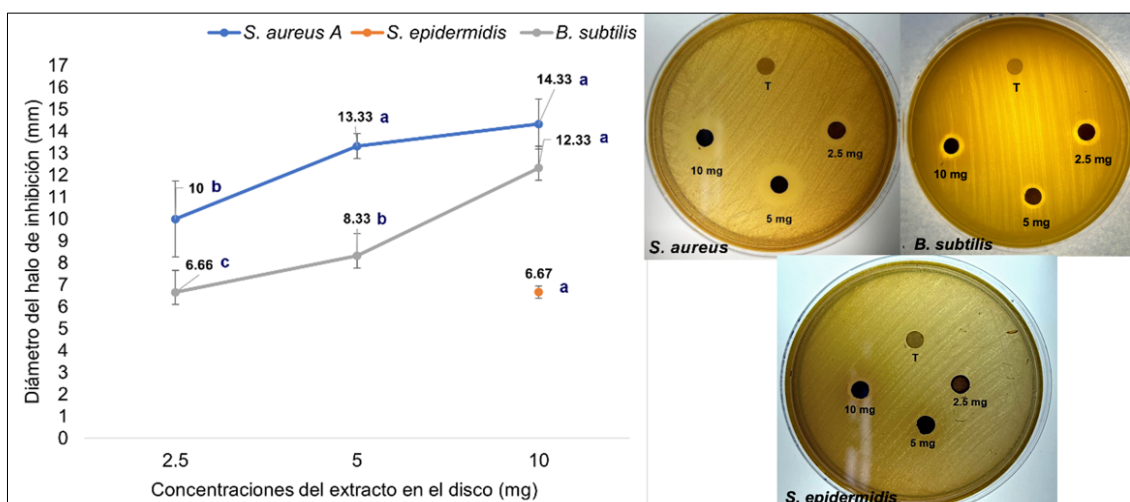


Figura 28. Halos de inhibición producidos por el extracto de acetato de etilo de corteza de *Diospyros digyna*. La línea vertical en la gráfica corresponde a la desviación estándar.

El efecto de las concentraciones sobre *S. epidermidis* y *S. aureus* AC fue significativo ($P= 0.021$ y 0.0001 , respectivamente), pero no para *B. subtilis* ($P= 0.581$) (prueba de Kruskal-Wallis y Tukey HSD, Anexo 7 y 8). Para *S. epidermidis*, la prueba de Dunn (Anexo 7) indicó que las comparaciones de las concentraciones 10 vs 2.5

mg/d y 10 vs 5 mg/d fueron estadísticamente significativas ($P_{\text{adj}} = 0.048$), mientras que la comparación entre 2.5 y 5 mg/d no mostró diferencia significativa ($P_{\text{adj}} = 1.000$). Para *S. aureus* AC, la prueba de Tukey HSD (Anexo 8) mostró que las concentraciones de 10 y 5 mg/d presentan un efecto significativamente mayor ($P < 0.05$) que la concentración de 2.5 mg/d ($P > 0.05$).

El extracto metanólico presentó actividad inhibitoria con la concentración más alta sobre *B. subtilis* y *S. Typhi* con un promedio de 6.33 y 6.66 mm en los halos de inhibición, respectivamente (Figura 25, Anexo 5).

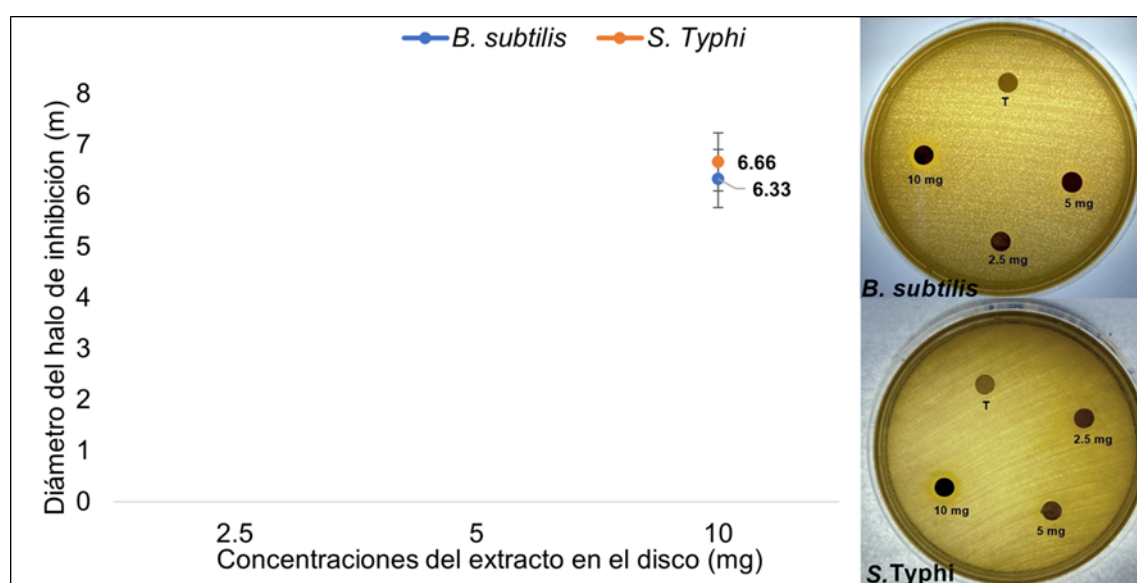


Figura 29. Halos de inhibición producidos por el extracto de metanol de corteza de *Diospyros digyna*. La línea vertical en la gráfica corresponde a la desviación estándar.

El efecto de las concentraciones sobre *B. subtilis* y *S. Typhi* fue significativo ($P = 0.021$ y 0.034 , respectivamente) (prueba de Kruskal-Wallis, Anexo 7). La prueba de Dunn (Anexo 7) arrojó que, para *B. subtilis*, las tres concentraciones no presentaron significancia estadística ($P > 0.05$), mientras que para *S. Typhi*, las concentraciones de 10 y 5 mg/d presentan un efecto significativamente mayor ($P < 0.05$) que la concentración de 2.5 mg/d ($P > 0.05$).

7.4. Porcentaje inhibición relativa (PIR)

Paralelo a la evaluación de la actividad antibacteriana, se determinó el efecto de la gentamicina (Sigma®) con las tres concentraciones con las que se evaluaron los extractos sobre las bacterias (Anexo 8).

Cuadro 4. Porcentajes de inhibición relativa (PIR) producidos por los extractos activos de hoja y corteza de *Diospyros digyna*.

Estructura vegetal	Extracto	Bacteria	Concentraciones mg/d		
			2.5	5	10
Hoja	Acetato de etilo	<i>B. subtilis</i>	-	-	17.1
Corteza	Hexano	<i>S. aureus</i> AC	20	20	26.87
		<i>B. subtilis</i>	-	-	20.7
	Acetato de etilo	<i>S. aureus</i>	33.33	44.43	46.22
		<i>S. epidermidis</i>	-	-	20.2
		<i>B. subtilis</i>	18	23.13	33.32
	Metanol	<i>B. subtilis</i>	-	-	17.1
		<i>S. Typhi</i>	-	-	15.82

El PIR del extracto de acetato de etilo de hojas sobre *B. subtilis* a 10 mg/d fue de 17.1 % (Cuadro 4), demostrando así una baja efectividad para inhibir el crecimiento de dicha bacteria. El PIR más alto fue el del extracto de acetato de etilo de corteza sobre *S. aureus* a 10 mg/d (46.22 %) (Cuadro 4), esto indica que la concentración más alta presenta mayor actividad.

Del extracto de hexano de corteza, el PIR más alto fue sobre *S. aureus* al (26.87 %) a 10 mg/d (Cuadro 4), y para el extracto de metanol de corteza el PIR más alto fue de 17.1 % sobre *B. subtilis* a 10 mg/d (Cuadro 4), indicando que estos extractos, aún en las concentraciones más altas evaluadas, presentan poca actividad antibacteriana.

7.5. Prueba de concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM)

El extracto de acetato de etilo de hojas como el de hexano y metanol de corteza produjeron una CIM de 20 mg. mL⁻¹ sobre *B. subtilis* (Figura 26, Cuadro 5 y 6); para el extracto de acetato de etilo de corteza la CIM fue de 10 mg. mL⁻¹ (Figura 27, Cuadro 6).

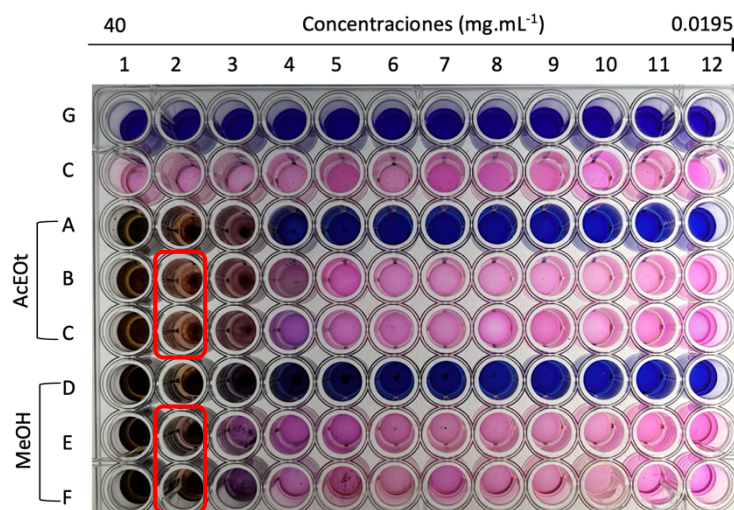


Figura 30. CIM del extracto de acetato de etilo (AcOEt) de hoja y metanol (MeOH) de corteza de *Diospyros digyna* sobre *B. subtilis*.

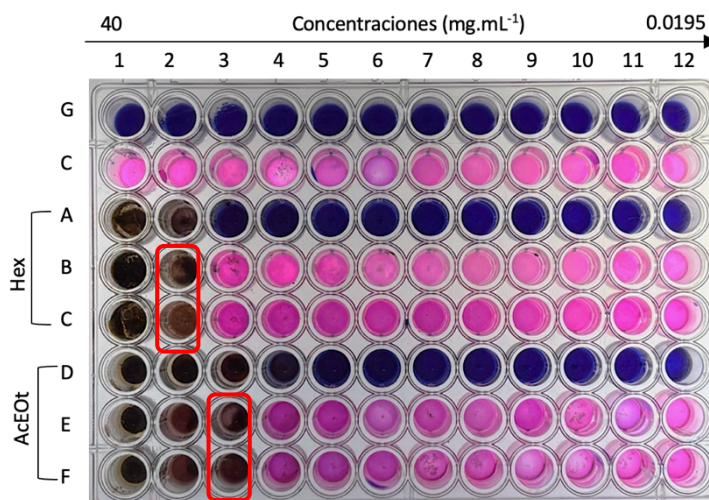


Figura 31. CIM del extracto de hexano (Hex) de corteza y acetato de etilo (AcOEt) de corteza de *Diospyros digyna* sobre *B. subtilis*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria y resazurina; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.019. *El recuadro rojo indica el corte de la CIM.

Para *S. aureus* AC, el extracto de hexano de corteza produjo una CIM de 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 28, Cuadro 6), mientras que para el de acetato de etilo de corteza fue de 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 28, Cuadro 6).

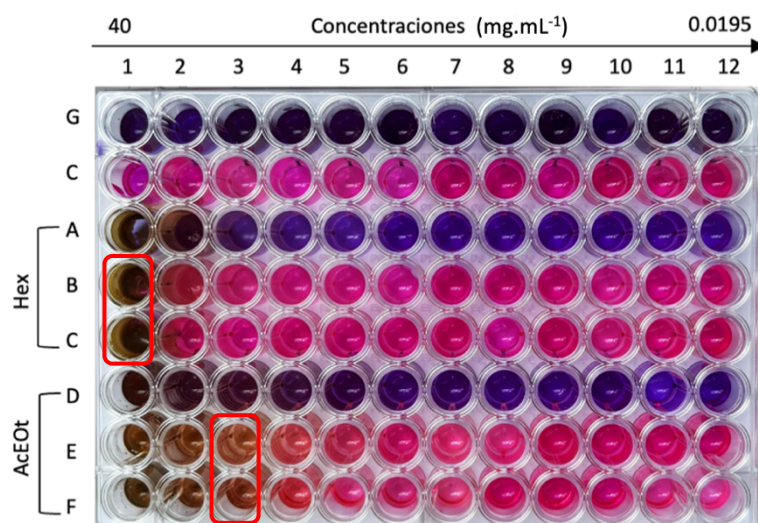


Figura 32. CIM del extracto de hexano y de acetato de etilo de corteza de *Diospyros digyna* sobre *S. aureus* AC.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria y resazurina; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195. *El recuadro rojo indica el corte de la CIM.

Para *S. epidermidis*, el extracto de acetato de etilo de corteza produjo una CIM de 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 29, Cuadro 6) y para *S. Typhi*, el extracto de metanol de corteza produjo una CIM de 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 29, Cuadro 6).

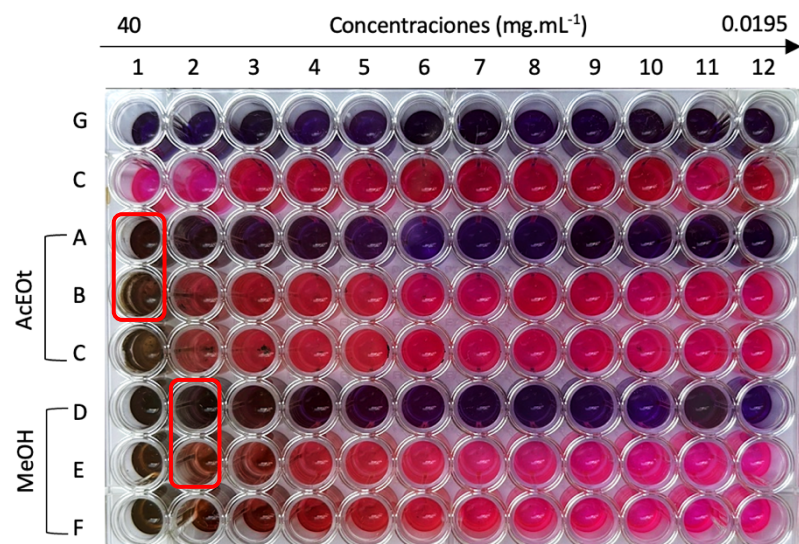


Figura 33. CIM del extracto de acetato de etilo sobre *S. epidermidis* y metanol de corteza de *Diospyros digyna* sobre *S. Typhi*.

G: gentamicina; C: caldo, bacteria y resazurina; A: prueba de esterilidad del extracto; B: extracto sobre bacteria (repetición 1); C: extracto sobre bacteria (repetición 2); D: prueba de esterilidad del extracto; E: extracto sobre bacteria (repetición 1); F: extracto sobre bacteria (repetición 2). Concentraciones ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$): 1=40, 2=20, 3=10, 4=5, 5=2.5, 6=1.25, 7=0.625, 8=0.312, 9=0.156, 10=0.078, 11=0.039, 12=0.0195. *El recuadro rojo indica el corte de la CIM.

En todos los casos la CIM fue diferente a la CBM, indicando que los extractos presentaron un efecto bacteriostático, es decir, hubo crecimiento bacteriano al realizar el subcultivo en un medio sin antibiótico de la CIM correspondiente. La excepción fue el extracto de acetato de etilo de corteza sobre *B. subtilis* con una CBM de $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Cuadro 6) con un efecto bactericida, es decir, las bacterias provenientes del ensayo de la CIM no crecieron en el subcultivo consiguiente.

Cuadro 5. Valores de CIM y CBM de los extractos activos de hojas de *Diospyros digyna*.

		CIM				CBM			
Extracto	Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)							
AcOEt	<i>B. subtilis</i>	40	20	10	5 a 0.0195*	40	20	10	5 a 0.0195*
		-	-	+	+	+	+	+	+

AcOEt: acetato de etilo; -: inhibición; +: crecimiento; *: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563, 0.0781, 0.0391 y 0.0195 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Cuadro 6. Valores de CIM y CBM de los extractos activos de corteza de *Diospyros digyna*.

		CIM				CBM			
Extracto	Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)							
		40	20	10	5 a 0.0195*	40	20	10	5 a 0.0195*
AcOEt	<i>S. aureus</i> AC	-	-	-	+	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	-	+	+	+
	<i>S. epidermidis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+
Hex	<i>S. aureus</i> AC	-	+	+	+	+	+	+	+
	<i>B. subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
MeOH	<i>B. subtilis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>S. Typhi</i>	-	-	+	+	+	+	+	+

AcOEt: acetato de etilo; Hex: hexano; MeOH: metanol: -: inhibición; +: crecimiento;

*: 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.1563, 0.0781, 0.0391 y 0.0195 mg. mL⁻¹.

7.6. Prueba de toxicidad sobre *Artemia salina*

El análisis estadístico de la prueba de toxicidad (Anexo 9) demostró que los extractos evaluados no son tóxicos puesto que presentaron una CL₅₀ alta; la excepción fue el extracto de acetato de etilo de corteza, que con una CL₅₀ de 972.09 µg.mL⁻¹ fue categorizado como moderadamente tóxico. El extracto hexánico (CL₅₀=2 247.37) y de acetato de etilo (CL₅₀=2 206.35) de hojas fueron los menos tóxicos de dicha estructura (Figura 30), mientras que el extracto metanólico (CL₅₀=5 841.35) y hexánico (CL₅₀=5 150.67) de corteza fueron los menos tóxicos de todo el estudio (Figura 31).

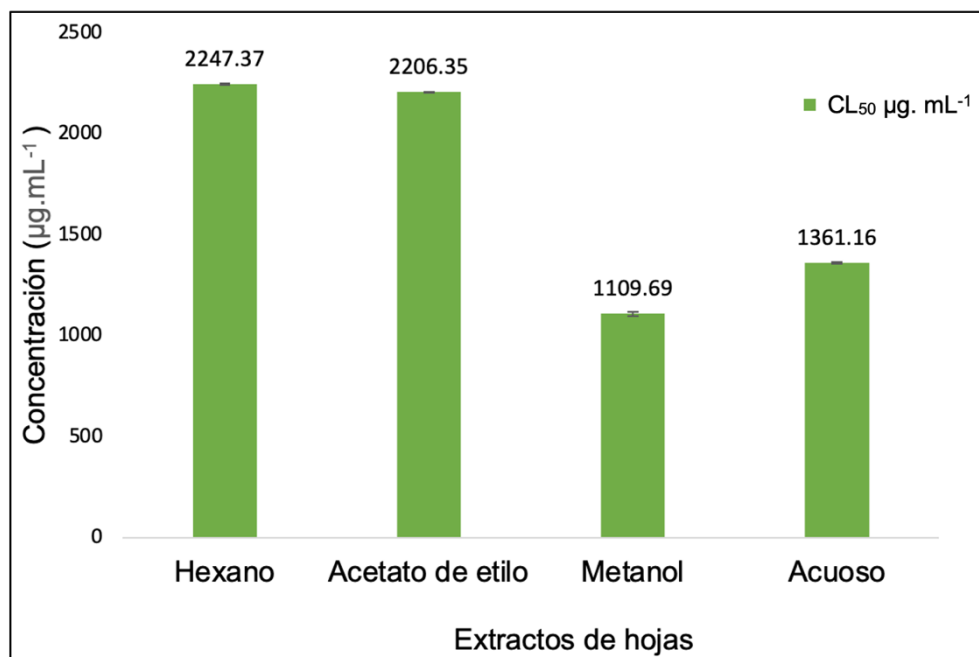


Figura 34. Toxicidad letal media de los extractos de hojas de *Diospyros digyna*. La línea vertical en la gráfica corresponde a la desviación estándar.

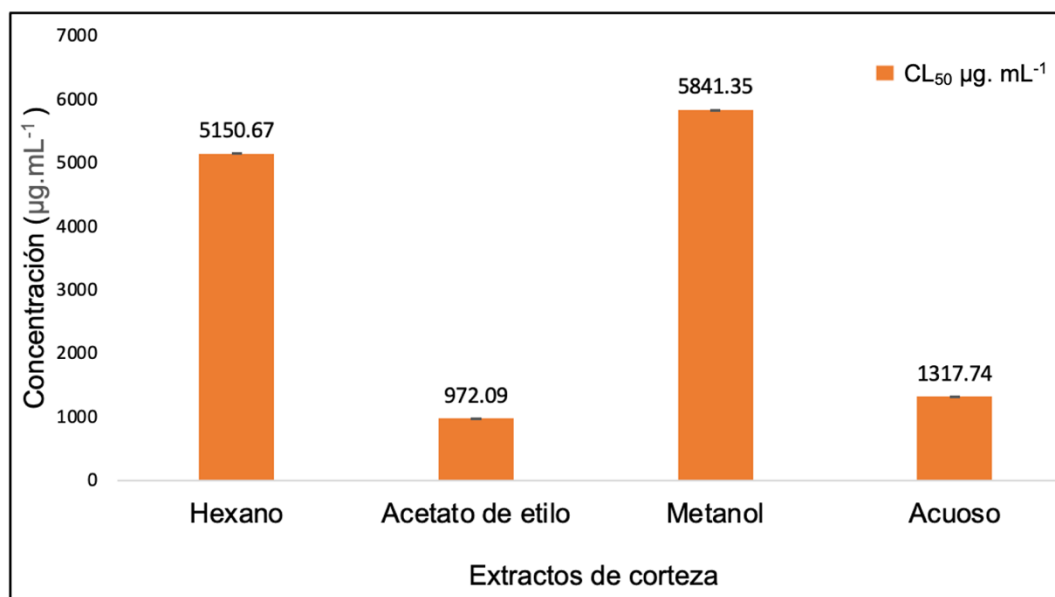


Figura 35. Toxicidad letal media de los extractos de corteza de *Diospyros digyna*. La línea vertical en la gráfica corresponde a la desviación estándar

VIII. DISCUSIÓN

Entre las plantas medicinales nativas de México se encuentra el zapote negro (*D. digyna*), muy apreciado en las comunidades rurales por las propiedades medicinales que se le atribuyen y por la fruta que produce (Andueza-Noh *et al.*, 2022). Para conocer los efectos biológicos de esta especie se evaluaron los extractos de hojas y corteza de tallos empleando disolventes de polaridad creciente (hexano, acetato de etilo, metanol y agua).

El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de acetato de etilo de corteza (16.34 %), seguido del hexánico (11.82 %) y del metanólico (10.41 %) de hojas (Figura 19, Anexo 1). Estas diferencias en el rendimiento o cantidad de sólidos totales de los extractos botánicos pueden deberse a factores como la temperatura, la forma y tiempo de extracción (Troung *et al.*, 2019).

Las hojas presentaron la mayor cantidad de MS (dos en el extracto de hexano, seis en el de acetato de etilo, cinco en el de metanol y acuoso), siendo identificados alcaloides, fenoles, flavonas, glucósidos, saponinas, taninos condensados y esteroides (Cuadro 2, Figura 20). El extracto hexánico de hojas fue el extracto de mayor rendimiento, sin embargo, fue el de menos grupos de metabolitos secundarios (esteroides y glucósidos). Si bien no existen reportes en la literatura especializada sobre la presencia de estos MS en dicho extracto, Huang *et al.* (2024) identificaron triterpenos en extractos de hojas, y Ramírez *et al.* (2019) además de triterpenos identificaron cumarinas, fenoles y flavonoides. Estas diferencias pueden deberse a factores como lo señalado por Gutiérrez (2002) quien menciona que la presencia y concentración de MS varía de acuerdo a la etapa de crecimiento o época del año, también depende de la hora y de la situación climática en el momento de la recolección de la planta, e incluso varía en determinadas situaciones ecológicas, también pueden hallarse restringidos a cierto órgano o a ciertas partes de la planta. Los terpenos no estuvieron presentes en ninguno de los extractos de hoja y alguno de los motivos antes anotados pueden ser el motivo.

Las cortezas fueron las de menos metabolitos (dos en el extracto de hexano, cuatro en el de acetato de etilo, cinco en el de metanol y dos en el acuoso), se identificaron alcaloides, fenoles, flavonas, glucósidos, saponinas, taninos condensados, esteroides y quinonas, los primeros siete coindican con los identificados en hojas. En los extractos de acetato de etilo y de metanol, tanto de hoja como de corteza, se identificaron más MS, en comparación con ambos extractos hexánicos que fueron los que presentaron menos grupos de MS, esto se puede deber a la polaridad de los solventes, Salas *et al.* (2023) indican que los solventes más polares son los que con frecuencia se usan para la extracción de MS porque son los que tienen fuertes interacciones con moléculas polares. De esta manera también se explica por qué en los extractos de acetato de etilo, metanol y acuoso de hoja se identificaron fenoles, pero no en el de hexano, ya que estos tres solventes son polares, siendo el metanol y agua los de mayor polaridad en este estudio, a diferencia del hexano que es apolar, además, es importante considerar que los fenoles son moléculas polares y se reporta que con frecuencia se emplea metanol y agua para extraerlos debido a su naturaleza química (Hernández *et al.*, 2016). Caso contrario de los esteroides, los cuales, generalmente, son moléculas apolares y estuvieron presentes en los extractos hexánicos.

No hay reportes bibliográficos sobre grupos de MS identificados en extractos de corteza, sin embargo, Atin *et al.* (2022) identificaron en extractos etanólicos de *Diospyros celebica* alcaloides, flavonoides, glucósidos, terpenos, esteroides y quinonas. Zreen *et al.* (2022), también identificaron taninos, fenoles y saponinas en los extractos metanólicos de *Diospyros malabarica*. Los grupos de MS reportados en ambas especies coinciden con los identificados en la especie de estudio, únicamente los terpenos no se identificaron en los extractos de corteza de *D. digyna*.

Los resultados de la actividad antibacteriana mostraron que el extracto de acetato de etilo, tanto de hojas como de corteza, fueron los de mayor actividad inhibitoria (Cuadro 3), permitiendo observar que las concentraciones de los extractos tienen potencias inhibitorias sobre el crecimiento de las bacterias ensayadas.

Los extractos de hojas fueron los que menor actividad presentaron, siendo activo únicamente el extracto de acetato de etilo en la concentración más alta (10 mg/d) sobre *B. subtilis*. Si bien no se encontraron reportes en la literatura especializada sobre el efecto antibacteriano de extractos de hojas y corteza de la especie en estudio, la excepción es el trabajo realizado por Dinda *et al.* (2006) quienes reportan que la diospirodina y el nonaacetato aislados de los extractos de acetato de etilo de hoja fueron activos frente a *B. subtilis*, la diospirodina fue activa a 250, 125 y 70 µg/d, mientras que el nonaacetato demostró actividad a 250 y 125 µg/d, concentraciones más bajas en comparación con las de este estudio.

De los extractos de corteza, el de acetato de etilo fue el más activo, inhibiendo a *S. aureus* AC, *B. subtilis* y *S. epidermidis*. Mientras que el extracto metanólico inhibió a *B. subtilis* y *S. Typhi* en la concentración más alta para ambas bacterias. Esto concuerda con el estudio de Dinda *et al.* (2006) quienes reportan que la diospirodina y nonaacetato aislados de los extractos de acetato de etilo y metanol son activos frente a *B. subtilis* y *S. aureus* a 250 y 125 µg/d.

Por otra parte, el extracto hexánico inhibió el crecimiento de *S. aureus* AC y *B. subtilis*. El hecho que existan extractos capaces de inhibir a *S. aureus* AC resulta de interés para esta investigación, considerando que es una de las principales bacterias resistentes a los antibióticos, lo que representa una amenaza significativa para la salud pública (Giono *et al.*, 2021).

Otras especies del género *Diospyros* también tienen propiedades antibacterianas. Borges *et al.* (2007) evaluaron fracciones de extractos hexánicos, metanólicos y acuosos de hojas y corteza de *Diospyros anisandra* a 250 µg/mL sobre *B. subtilis* y *S. aureus*. En ese estudio los resultados mostraron que ninguna de las fracciones de hojas presentó actividad antibacteriana, por otra parte, la fracción de hexano de corteza tuvo actividad sobre *B. subtilis* y *S. aureus* (halos de inhibición de 23 y 43 mm respectivamente), para la de metanol fue de 23 mm para *B. subtilis* y 34 mm para *S. aureus*, el acuoso no mostró actividad. Esto coincide con lo obtenido, ya que los extractos de hexano y metanol de *D. digyna* fueron activos sobre *B. subtilis*,

de esta manera, se observa que los extractos de corteza del género *Diospyros* son los que presentan mayor efecto antibacteriano en comparación con las hojas, mostrando mayor actividad sobre *B. subtilis* y *S. aureus*.

En relación al porcentaje de inhibición relativa (PIR), el valor más alto del extracto de acetato de etilo de hoja fue de 17.1 % sobre *B. subtilis* y para los de la corteza el de hexano y acetato de etilo fueron de 26.87 y 46.22 % sobre *S. aureus* AC, respectivamente, y para el de metanol de 17.1 % sobre *B. subtilis* en todos los casos a 10 mg/d. Ramírez y Díaz (2007) mencionan que una acción antibacteriana se considera alta cuando la PIR es >70 %, intermedia entre el 50-70 % y baja cuando es <50 %, esto indicaría que todos los extractos activos de *D. digyna* poseen actividad inhibitoria baja.

Los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) indican que el extracto de acetato de etilo representa la potencia de los extractos de *D. digyna*, ya el de hoja produjo una CIM de 20 mg. mL⁻¹ para *B. subtilis* y para el de corteza fue de 10 mg. mL⁻¹ tanto para *B. subtilis* como para *S. aureus* AC, siendo una potencia mas baja en comparación con los extractos metanólicos y acuosos de corteza de *Diospyros melanoxylon*, que redujeron el crecimiento a 3 mg. mL⁻¹ (CIM casi tres veces menor) sobre *S. aureus*, algo más cerca a la del extracto fue el de metanol (CIM de 6 mg. mL⁻¹) sobre *S. epidermidis* (Rath *et al.*, 2009). Estas cercanías en potencia muestran que parece ser común que las especies de *Diospyros* produzcan moléculas con actividad antimicrobiana; en tanto que las diferencias puede deberse a una mayor diversidad de sustancias activas (incluyendo moléculas exclusivas) o a concentraciones disimiles de ella.

Que algunos extractos no hayan sido activos no es raro, al contrario, es común, por lo menos de *D. melanoxylon*, el extracto acuoso no produjo inhibición en algunas bacterias cuando los otros extractos sí. Con *D. digyna* sucedió lo mismo, mientras que el extracto de acetato de etilo inhibió a *B. subtilis*, el acuoso no. Esto indica que las sustancias activas se extraen mejor con un disolvente que con otro. Además, las diferencias entre un mismo tipo de extracto también brinda información sobre el

panorama metabólico del género, el extracto metanólico de corteza de *D. digyna* no presentó inhibición sobre *S. aureus* y *S. epidermidis*, a diferencia de los de *D. melanoxylon*; ello también se refleja en la potencia, este mismo extracto de ambas especies presentaron efecto inhibitorio sobre *S. Typhi*; pero con potencias diferentes mientras que la CIM de la especie de estudio fue de 20 mg. mL⁻¹, el de *D. melanoxylon* fue de 3 mg. mL⁻¹, indicando la diversidad en número o en abundancia de los principios activos entre ellos.

Todos los extractos con actividad antibacteriana demostraron ser activos frente a *B. subtilis*, lo cual resulta relevante tomando en cuenta que es la bacteria Grampositiva mejor caracterizada. La susceptibilidad de esta bacteria a los extractos se puede deber a que las bacterias Grampositivas no presentan resistencia a la entrada de agentes antimicrobianos porque carecen de una membrana externa, por lo tanto, las moléculas entran con mayor facilidad (Calvo y Martínez, 2009).

Los grupos de MS presentes en los extractos de hojas fueron alcaloides, fenoles, glucósidos, saponinas, taninos condensados y esteroides, siendo algunos de ellos o el conjunto de los mismos los responsables de la susceptibilidad de *B. subtilis*. Zouine *et al.* (2024) mencionan que varios flavonoides, alcaloides, esteroides y terpenos tienen la capacidad de causar alteraciones tanto en la pared celular bacteriana como en la permeabilidad de la membrana citoplasmática.

El extracto de acetato de etilo de hojas y corteza contienen fenoles en buena intensidad, lo que pudiera indicar, su participación en la actividad antibacteriana. Kirmusaoglu (2018) menciona que los fenoles, inicialmente, afectan la membrana celular, ya que hay una alta correlación entre la toxicidad y la hidrofobicidad de estas moléculas, debido a que cambian la permeabilidad, lo que provoca la fuga del contenido celular o interfirieren con las proteínas de la membrana, lo que resulta en la alteración de su estructura.

Los glucósidos y los taninos condensados son grupos de MS presentes en todos los extractos activos (con excepción del extracto de hexano de corteza). Los glucósidos son estrategias químicas útiles contra bacterias Grampositivas y

Gramnegativas debido a que pueden cambiar la permeabilidad de la membrana plasmática, causando daño y pérdida del contenido citoplasmático (Zou y Fang, 2021). Por otra parte, Huang *et al.* (2024) indican que la actividad antibacteriana de los taninos condensados está correlacionada con la presencia de fracciones galilo y gálico en las unidades de flavan-3-ol. Los mecanismos de acción antibacteriana de los taninos condensados incluyen la inhibición de las toxinas bacterianas, la matriz extracelular, la transferencia de plásmidos, la síntesis de la pared celular y la disrupción de la membrana. Kabeer *et al.* (2020) añaden que los taninos inhiben el crecimiento bacteriano mediante la quelación del hierro y la inhibición de las vías biosintéticas de los ácidos grasos. También, los taninos actúan como inhibidores del quorum sensing (mecanismo de regulación de la expresión genética) y atenúan la expresión genética de varios factores de virulencia, como biopelículas, enzimas, adhesinas y motilidad.

Los alcaloides son otro grupo de MS presentes en los extractos de acetato de etilo de hoja y metanólico de corteza, de acuerdo a Yan *et al.* (2021), los alcaloides inhiben el crecimiento bacteriano a través de varios mecanismos, incluyendo la inhibición de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos bacterianos, la modificación de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, el daño de la membrana celular y la pared celular, la inhibición del metabolismo y la inhibición de las bombas de eflujo.

Los flavonoides presentes en el extracto de acetato de etilo y metanólico de corteza son otros posibles responsables, al respecto Xie *et al.* (2015) mencionan que hidroxilos específicos en los anillos aromáticos son los cruciales para su actividad antibacteriana. Algunos mecanismos antibacterianos son la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la función de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de la porina en la membrana celular, alteración de la permeabilidad de la membrana y atenuación de la patogenicidad. Específicamente los flavonoides de tipo flavona tienen la capacidad de inhibir el quorum sensing (la formación de biopelículas) y los genes de virulencia (Socorro *et al.* 2022).

Las saponinas como las identificadas en los extractos de acetato de etilo de hojas y metanólico de corteza, poseen propiedades similares a las de los detergentes y pueden aumentar la permeabilidad de las membranas celulares bacterianas, esta actividad puede facilitar la entrada de agentes antibacterianos a través de la membrana de la pared celular bacteriana (Imrad *et al.*, 2018), además, pueden alterar la morfología de la superficie de la membrana e incluso destruir su integridad (Li y Monje (2023)

Los esteroides como en los extractos antibacterianos de acetato de etilo de hoja y hexánico de corteza, de acuerdo con Dogan *et al.* (2017) poseen enlaces de peróxido y vinilo en sus estructuras, que los hace similares a los que se encuentran normalmente en las células y pueden reemplazar a estas sustancias en la membrana celular, ocasionando alteraciones en las mismas.

Los grupos de MS identificados poseen actividad antibacteriana limitada, ya que tuvieron el efecto de inhibir a cuatro de las diez bacterias ensayadas, ello encuentra explicación que las bacterias poseen mecanismos que las hacen resistentes a los agentes antibacterianos o que los extractos inactivos tienen principios activos en menor número o abundancia. Fuente *et al.* (2015) indican que el principal mecanismo causante de resistencia bacteriana es la inactivación de los agentes antimicrobianos a través de la hidrólisis mediada por enzimas. La inactivación enzimática es causada por la acción de hidrolasas y transferasas sintetizadas por ciertos patógenos como una estrategia de defensa bacteriana. También se consideran los mecanismos que modifican el sitio blanco de los agentes antibacterianos, los cuales pueden ser modificados por una mutación genética. Por otra parte, Vaou *et al.* (2021) mencionan que la entrada de agentes antibacterianos está controlada principalmente por las porinas, que son proteínas capaces de formar canales abiertos que permiten el transporte pasivo de moléculas a través de las membranas de bicapa lipídica. La variación en la estructura de las porinas da como resultado la alteración de la permeabilidad de la membrana y es un mecanismo para escapar de los agentes antibacterianos. Este tipo de resistencia a los antibacterianos se encuentra con frecuencia en bacterias Gramnegativas. Además, este tipo de bacterias poseen una

cubierta externa más compleja que las Grampositivas, tanto química como estructuralmente (Molinedo *et al.*, 2014), siendo alguna de estas las posibles razones por las cuales los extractos activos presentaron mayor actividad sobre las bacterias Grampositivas, pero no sobre las Gramnegativas.

Aún cuando fueron encontrados tipos de MS con propiedades antibacterianas, es de relevancia tomar en cuenta que la actividad general de los extractos botánicos puede resultar de mezclas de compuestos con actividad sinérgica, aditiva o antagónica, lo cual interviene en su efecto biológico (Caesar y Cech, 2019). Esta es otra de las posibles razones por las cuales unos extractos fueron capaces de inhibir a ciertas bacterias y otros no, incluso aquellos que fueron activos.

Aunque los metabolitos secundarios se utilizan principalmente por su actividad biológica beneficiosa, como lo es su actividad antibacteriana, la toxicidad de algunos de ellos puede limitar su uso. La evaluación de la toxicidad de cualquier compuesto que pueda usarse en humanos es de vital importancia (Madariaga *et al.*, 2018). Los resultados en esta investigación indican que los extractos evaluados son considerados como no tóxicos, con excepción del extracto de acetato de etilo de corteza, que fue considerado como moderadamente tóxico, esto de acuerdo a la escala de toxicidad de McLaughlin (1998). Es decir, la menor potencia antibacteriana, aunque limitada en potencia, tiene a su favor una baja toxicidad.

El hecho que los extractos antibacterianos no sean tóxicos y debido a la escasez de estudios sobre los extractos de hojas y corteza de *D. digyna* permite seguir explorando la actividad biológica de estos, ya que de acuerdo con Ávalos *et al.* (2014) se ha incrementado el interés por el uso de plantas medicinales como una alternativa para obtener nuevos fármacos, debido a su gran variedad y complejidad de sus metabolitos secundarios.

IX. CONCLUSIONES

- El extracto que presentó mayor rendimiento fue el de acetato de etilo de corteza (16.34 %), seguido del hexánico de corteza (11.82 %) y metanólico de hojas (10.41 %).
- Las hojas y las cortezas tuvieron en común siete de diez tipos de compuestos secundarios ensayados (alcaloides, esteroides fenoles, flavonas, glucósidos, saponinas y taninos condensados). Las cortezas adicionalmente presentaron quinonas.
- De los extractos de hojas, únicamente el de acetato de etilo presentó actividad inhibitoria sobre *B. subtilis*, mientras que el extracto de acetato de etilo de corteza fue el que presentó mayor actividad, inhibiendo a *S. aureus* AC, *S. epidermidis* y *B. subtilis*, por otra parte, el extracto hexánico de corteza no permitió el crecimiento de *S. aureus* AC y *B. subtilis*, mientras que el extracto metanólico inhibió *B. subtilis* y *S. Typhi*.
- El PIR más alto fue el del extracto de acetato de etilo de corteza sobre *S. aureus* a 10 mg/d (46.22 %), seguido del extracto de hexano sobre *S. aureus* a 10 mg/d (26.87 %) y del extracto de metanol sobre *B. subtilis* a 10 mg/d (17.1 %).
- El extracto de acetato de etilo de corteza presentó la concentración más efectiva, puesto que produjo una CIM de 10 mg. mL⁻¹ sobre *B. subtilis* y *S. aureus* AC, seguido del extracto de acetato de etilo de hojas con una CIM de 20 mg. mL⁻¹ sobre *B. subtilis* y del extracto de metanol de corteza con una CIM de 20 mg. mL⁻¹ sobre *S. Typhi*.
- Los extractos evaluados resultaron ser no tóxicos, la excepción fue el extracto de acetato de etilo de corteza que fue catalogado como moderadamente tóxico.
- La investigación realizada aporta información sobre los grupos de metabolitos secundarios presentes en las hojas y cortezas de *Diospyros digyna*, así como el efecto de los mismos sobre su efecto inhibitorio sobre las bacterias ensayadas y el efecto tóxico de los extractos sobre *Artemia salina*, tomando en cuenta que el zapote negro es apreciado tanto por sus propiedades nutricionales como medicinales.

X. RECOMENDACIONES

- Realizar otros métodos de extracción para determinar si es viable el aislamiento de otros grupos de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.
- Utilizar otras especies de bacterias con el fin de aumentar el conocimiento inhibitorio de *Diospyros digyna*.
- Emplear mayores concentraciones de los extractos para determinar si se pueden obtener mayores resultados inhibitorios.
- Difundir el conocimiento sobre las propiedades nutricionales y medicinales del zapote negro para lograr un mayor consumo y aprovechamiento sustentable.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Abbas, R., Chakkour, M., Zein El Dine, H., Obaseki, E., Obeid, S., Jezzini, A., Ghssein, G., y Ezzeddine, Z. 2024. General overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the role of siderophores in its pathogenicity. *Biology*. 13 (2): 78.
- Abud, K., Bustos, L. y Covo, E. 2015. Actividad antimicrobiana de los compuestos fenólicos sulfonados en el sistema de conductos radiculares. Revisión sistemática. *Ciencia y Salud*. 7 (2): 53-60.
- Adao, C. 2012. *Salmonella* Typhi. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/microscopic-view-salmonella-enterica-serotype-typhi-2367685719>. Consultado el 12 de febrero del 2025.
- Ahmad, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach, C., Sotto, A., Lavigne, J. y Molle, V. 2021. *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*. 13 (10): 677.
- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D. y Benítez, R. 2016. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 45 (3): 438-469.
- Andueza-Noh, R., Garruña-Hernández, R., Matos-Díaz, L., Cituk-Chan, D. y Pinzón-López, L. 2022. Caracterización molecular de dos genotipos de zapote negro (*Diospyros nigra*) cultivados en Yucatán, México. *Ciencia y Tecnología ITESCAM Calkiní*. 1 (1): 26-36.
- Anónimo. 2011. Certificado de Tuxtla Gutiérrez como ciudad segura. 87 pp. Recuperado de https://isccc.global/files/custom/Community/tuxtla_gutierrez_chiapas_sp_201pdf. Consultado 03 de mayo de 2025.

- Anónimo. 2025. Alcaloides. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Cuba. Recuperado de <https://instituciones.sld.cu/medicinaturalssp/alcaloides/>. Consultado el 20 de abril del 2025.
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria C., E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3):119-145.
- Ávalos, J., Treviño, J., Verde, J., Rivas, C., Oranday, A., Moran, J., Serrano, L. y Morales, M. 2014. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 45 (4): 39-44.
- Alfaro, M. 1984. Medicinal plants used in a Totonac community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. 11 (2): 203–221.
- Atin, D., Hudatul, A., Anggraini, D. y Majiidu, M. 2022. Metabolite profiling of ebony (*Diospyros celebica* Bakh) leaves and wood extracts using LC-MS/MS. *Indonesian Journal of Chemistry*. 22 (2): 352-360.
- Balam, Díaz, J. S. 2024. Los alcaloides: escudos de las plantas. *Desde el Herbario CICY*. 16: 101-104.
- Bartnik, M. y Facey, P. 2024. Glycosides. Chapter 7. Pharmacognosy. Second Edition. Academic Press. Elsevier Inc. Pp. 103-165.
- Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. 2025. Zapote negro, zapote prieto. www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx. Consultado el 03 mayo de 2025.

- Braz, V., Melchior, K. y Moreira, C. 2020. *Escherichia coli* as a multifaceted pathogenic and versatile bacterium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10: 548492.
- Borges, R., Canche, C., Peña, L., Said, S. y Molina, G. 2007. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia*. 78 (5): 370-372.
- Burgstedt, C. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/yellow-colored-multiple-antibiotic-resistant-pseudomonas-1586570263>. Consultado el 12 de febrero del 2025.
- Caesar, L. y Cech, N. 2019. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+1 does not equal 2. *Natural Product Reports*. 36 (6): 869-888.
- Calvo, J. y Martínez, L. 2009. Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27 (1): 44-52.
- Carrillo, D. y Galván, D. 2022. Actividad antimicrobiana de extractos de *Taraxacum officinale* y *Agave lechuguilla*. *BioTecnología*. 22 (1): 26-44.
- Cervantes, E., García, R. y Salazar, P. 2014. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. 61 (1): 28-40.
- Chan, I., Borges, R. y Ayora, G. 2023. Quinones as promising compounds against respiratory viruses: a review. *Molecules*. 28 (4): 1981.
- Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H. y Chen, X. 2023. A Review of classification, biosynthesis, biological activities and potential applications of flavonoids. *Molecules*. 28 (13): 4982.

- Cheung, G., Bae, J., y Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 12 (1): 547–569.
- Correa, A. y Silva, V. 2023. Phenolic compounds in bacterial inactivation: a perspective from Brazil. *Antibiotics*. 12 (4): 645.
- Crane, J. H. y Balerdi, C. F. 2006. Black sapote growing in the Florida home landscape. Recuperado de <https://journals.flvc.org/edis/article/view/116176/114345>. Consultado 15 de diciembre de 2024.
- Cruz, R. 2025. Los Flavonoides. iideNut. Bioquímica Clínica Nutricional. Recuperado de <https://www.iidenut.org/instituto/2022/10/14/los-flavonoides-clasificacion-e-impacto-en-la-salud/#:~:text=Los%20alimentos%20c%C3%ADtricos%20co.> 21 de abril de 2025.
- Dahlem, M., Nguema, R., Catto, A. y Raimundo, J. 2022. Quinones as an efficient molecular scaffold in the antibacterial/antifungal or antitumoral arsenal. *International Journal of Molecular Sciences*. 15 (22): 14108.
- Dinda, B., Bhattacharya, A., Chandra, U., Arima, S., Takayanagi, H. y Harigaya, Y. 2006. Antimicrobial C-Glucoside from aerial parts of *Diospyros nigra*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. 54 (5): 679-681.
- Dogan, A., Otlu, S., Celebí, O., Aksu, P., Gülmez, A., Can, A. y Mutlu, N. 2017. An investigation of antibacterial effects of steroids. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 41 (2): 302-305.
- Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa. México. 229 pp.
- Dumitrascu, M. 2011. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*. 2 (4): 119-122.

- Espinoza, J. 2014. Determinación cuantitativa de alcaloides en doce plantas medicinales y su actividad expectorante. Tesis de pregrado. UTMACH, Unidad Académica de Ciencias Química y de la Salud. Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador. 80 pp.
- Errington, J. y Aart, L. 2020. Microbe profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology (Reading, England)*.166 (5): 425–427.
- Fideicomiso de Riesgo compartido. 2017. Zapote Negro, fruta mexicana con gran sabor y tradición popular. Gobierno de México. Recuperado de <https://www.gob.mx/firco/articulos/zapote-negro-fruta-mexicana-con-gran-sabor-y-tradicion-popular?idiom=es>. Consultado 10 de diciembre de 2024
- Fitzgerald, M., Heinrich, M. y Booker, A. 2020. Medicinal plant analysis: a historical and regional discussion of emergent complex techniques. *Frontiers in Pharmacology*. 10: 1480.
- Florián, A. 2024. Innovación en fitoterapia: desarrollo de la medicina natural en la farmacia. *PMFarma*. Recuperado de <https://www.pmfarma.com/articulos/3902-innovacion-en-fitoterapia-desarrollo-de-la-medicina-natural-en-la-farmacia.html> Consultado 03 de enero de 2025.
- Foulkes, D., McLean, K., Haneef, A., Fernig, D., Winstanley, C., Berry, N. y Kaye, S. 2019. *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms*. 7 (12): 707.
- Fuente, N., Villarreal, J., Díaz, M. y García, A. 2015. Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 46 (2): 7-16.

- Franza, T. y Gaudú, P. 2022. Quinones: more than electron shuttles. *Research in Microbiology*. 173 (6): 10.
- Frey, M., Vahabi, K., Cankar, K., Lackus, N., Padilla, F., Ro, Rieseberg, L., Spring, O. y D., Tissier, A. 2024. Sesquiterpene lactones insights into biosynthesis, regulation and signalling roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 43 (3): 131-157.
- Galán, J. 2016. Typhoid toxin provides a window into typhoid fever and the biology of *Salmonella* Typhi. Recuperado de <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1606335113>. Consultado el 17 de agosto del 2024.
- Gallegos, M. 2015. Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo, Ecuador. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ecuador.
- Gallegos, P., Bañuelos, R., Delgadillo, L., Meza, C. y Echavarría, F. 2019. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, terpineno y timol. *Agroecosystems*. 22: 241-248.
- Galo, Y., Dauda, S., Emmanuel, A., Bhutto, Y. 2018. Phytochemical screening and antimicrobial activity of leaf and stem bark aqueous extracts of *Diospyros mespiliformis*. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 22 (3): 1-8.
- García, J., Ramírez, B., Robles, G., Zañudo, J., Salcedo, A. y García, J. 2012. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*. 39: 82-94.

- García, R., Axayacatl, J., Segura, S. y Basurto, F. 2015. Análisis panbiogeográfico de *Diospyros* spp. (Ebenaceae) en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6 (1): 187-200.
- Gideskog, M., Falkeborn, T., Welander, J. y Melhus, A. 2023. Source control of Gram-negative bacteria using self-disinfecting sinks in a swedish burn centre. *Microorganisms*. 11 (4): 965.
- Gil-Rodríguez, J. R., Herrera-Rojas, M. F., Mitre-Velasco, Y. y Santamaría-Rivas, C. 2020. Compuestos activos en plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. *RD-ICUAP*. 6 (1): 175-200.
- Gimeno, E. 2004. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *Offarm*. 23 (6): 80-84.
- Giono, S., Santos, J., Morfín, M., Torres, F. y Alcántar, M. 2021. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*. 156 (2): 172-180.
- Gutiérrez, M. 2002. Estudio de los extractos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y de las metodologías de extracción, en la determinación de la actividad de atracción o repelencia sobre *Macrociphum rosae*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Gongora, G., Lizardi, J., Lopez, Y., Lopez, M. y Quihui, L. 2023. Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de *Yucca*: una revisión. *Biotechnia*. 25 (1): 147-155.
- Hassanpour, S., Maheri-Sis, N., Eshratkhah, B. y Baghbani Mehmandar, F. 2011. Plants and secondary metabolites (tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion*. 1 (1): 47-53.

- Hernández, L. y Vásquez, M. 2009. Atlas de riesgo del municipio del Tuxtla Gutiérrez. Secretaría de Desarrollo Social. México.
- Hernández, G., Espinosa, T., Hernández, G., Reyes, B. y Guerra, D. 2016. Influence of Polar Solutions on the Extraction of Phenolic Compounds from Capulín Fruits (*Prunus serotina*). *Journal of the Mexican Chemical Society*. 60 (2): 73-78.
- Herrera, M. 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana, metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*. 34: 33-41.
- Huang, I., Wang, Z., Wang, F., Wang, S., Wang, D., Gao, M., Li, H., Song, M. y Zhang, X. 2024. Triterpenoids from the leaves of *Diospyros digyna* and their PTP1B inhibitory activity. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 29 (7): 1640.
- Huang, R., Zhang, F., Xuzhe, R., Ma, C. y Mingxin, M. 2024. The mechanisms of condensed tannins inhibit *Pediococcus pentosaceus*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 11 (1): 1.
- Imrad, M., Ahhmed, A., Hyuk, J., Soo, J., Yong, M. y Deog, J. 2018. Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of Gram Positive and Gram Negative bacteria, a comprehensive study *in vitro* and *in vivo*. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*. 26: 1-23.
- iNaturalist Mx. 2025. Zapote negro (*Diospyros nigra*). Recuperado de <https://mexico.inaturalist.org/taxa/343829-Diospyros-nigra>. Consultado el 20 de abril del 2025.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010. Compendio de información geográfica municipal, Tuxtla Gutiérrez. Recuperado de https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/07/0101.pdf. Consultado el 5 de mayo del 2024.
- Jain, C., Khatana, S. y Vijayvergia, R. 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 10 (2): 494-504.
- Jiménez-Gonzalez, O. y Guerrero-Beltrañ, A. 2021. *Diospyros digyna* (black sapote), an undervalued fruit: A review. *ACS Food Science Technology*. 1 (1): 3-11.
- Jiménez, G. y Vélez, A. 2012. Tinción de Gram de tejido: alcances y limitaciones. *Medicina y Laboratorio*. 18 (11): 557-573.
- Jiménez, R., Valdés, S., Olalde, V. y García, J. 2018. Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36 (2): 256-275.
- Juárez, R., Aguilar, J., Juárez, M., Bugarín, R., Juárez, P. y Cruz, E. 2012. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias*. 2 (3): 119-129.
- Kabeer, A., Yang, Q., Kim, G., Li, H., Zhu F. y Liu, H. 2020. Tannis as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*. 14 (1): 95.107.
- Kaper, J., Nataro, J. y Mobley, T. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140.

- Kaspersen, H., Urdahl, A., Alming, F., Ilang, H., Hetland, M., Bernhoff, E., Löhr, I. y Sunde, M. 2023. Population dynamics and characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from healthy poultry in Norway. *Frontiers in Microbiology*. 18: 1423.
- Kaulitzki, S. 2006. *Bacillus subtilis*. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/bacillus-subtilis-41650822>. Consultado el 12 de febrero del 2025.
- Kaur, J. y Jain, S. 2012. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research*. 23 (5): 35-54.
- Kauri, R. y Arora, S. 2015. Alkaloids important therapeutic secondary metabolites of plant origin. *Journal of Critical Reviews*. 2 (3): 1-8.
- Khan, M. y Shamim, S. 2022. Understanding the mechanism of antimicrobial resistance and pathogenesis of *Salmonella enteric* serovar Typhi. *Microorganisms*. 10 (10): 2006.
- Kirmusaoglu, S. 2018. Bacterial pathogenesis and antibacterial control. Intech. Londres.
- Kon, K. 2015. *Escherichia coli*. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/3d-rendering-escherichiacoli-commonly-known-2388852669>. Consultado el 12 de febrero del 2025.
- Kon, K. 2015. *Klebsiella pneumoniae*. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/bacteria-klebsiella-3d-illustration-gramnegative-rodshaped-584511661>. Consultado el 12 de febrero del 2025.

- Kon, K. 2015. *Staphylococcus aureus*. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/bacteria-methicillinresistant-staphylococcus-aureus-mrsa-multidrug-2229114271>. Consultado el 12 de febrero del 2025.
- Kon, K. 2015. *Staphylococcus epidermidis*. Recuperado de <https://www.shutterstock.com/es/image-illustration/staphylococcus-bacteria-genus-grampositive-known-causing-2381181307>. Consultado el 12 de febrero del 2025.
- Kot, B., Piechota, M., Szweda, P., Mitrus, J., Wicha, J., Gruzewska, A. y Witeska, M. 2023. Virulence analysis and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalised patients in Poland. *Scientific Reports*. 13 (44): 1-12.
- Lafuente, L. 2018. Desarrollo de nuevas metodologías de síntesis de glicósidos, *N*- y *O*-*N*-sustituidos, a partir de glicales. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata. Argentina. 195 pp.
- Lamont, R., Hajishengallis, G. y Jenkinson, H. 2015. Microbiología e inmunología oral. Editorial El manual moderno. México. Pp. 535
- Li, J. y Monje, V. 2023. In vitro and In Silico studies of antimicrobial saponins: a review. *Processes*. 11 (10): 2856.
- Macías, V., Álvarez, J. y Suárez, H. 2010. Terpenos con actividad biológica anti VIH. *Duazary*. 7 (2): 257-273.
- 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.
- Madariaga, A., Hernández, R., Noriega, K., Osnaya, A. y Martínez, K. 2018. Toxicity of secondary metabolites. *Physical Sciences Reviews*. 4 (2): 15.

- Mahmood, A., Wasel, A., Abumadi, S., Thaher, D., Jaghama, W., Karaman, R., Scrano, L. y Bufo, S. 2024. Antibacterial activity and antifungal activity of monomeric alkaloids. *Toxins*. 16 (11): 489.
- Martín, D. 2018. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9 (1): 82-104.
- Martínez, M. y Benito, P. 2005. Biological activity of quinones. *Studies in Natural Products Chemistry*. 30: 303-366.
- Marrelli, M. 2021. Medicinal plants. *Plants*. 10 (7): 1355.
- Mazur, M. y Masłowiec, D. 2022. Antimicrobial activity of lactones. *Antibiotics*. 11 (10): 1327.
- Merino-Sánchez, L., Romero-Luna, H., García-Barradas, O., Mendoza-López, M. y Jiménez-Fernández, M. 2021. Physicochemical and antioxidant changes of black sapote (*Diospyros digyna*, Ebenaceae) during on-tree fruit development *Acta Botánica Mexicana*. 129: 2032.
- Meyer, G., Sarmiento, O. I., Ramírez, R. I. y Guevara, O. 2018. Estimación del contenido de fenoles totales en aceite esencial de Caléndula (*Calendula officinalis* L) obtenido mediante OAH. *Revista ION*. 31 (1): 7-12.
- Miranda, M. y A. Cuéllar. 2001. Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba.
- Miranda, M. 2002. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba.

- Miranda-Martínez, M. 2006. Farmacognosia y productos naturales. Universidad de la Habana. La Habana, Cuba.
- Montoya-Inzunza, L. A. y Gutiérrez-Grijalva, E. P. 2021. Taninos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Recuperado de <https://www.ciad.mx/taninosantinutrientes-o-moleculas-con-potencialbenefico/>. Consultado el 20 de abril de 2025.
- Morera, J. 1992. El zapote. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Costa Rica.
- Morfín, R., Rangel, S. y Rodríguez, E. 2002. Infecciones producidas por bacterias Grampositivas. Controversias relacionadas al desarrollo de resistencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22 (2): 46-50.
- Molinedo, M. y Gonzáles, C. 2014. Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 49: 2609-2613.
- Navarrete, V. 2024. El poder del zapote. Recuperado de https://elpoderdelconsumidor.org/2024/08/el-poder-de-el-zapote/?__cf_chl_tk=QnueOnGhZ42LY4UokK_r3yvXc2Rt08QQxoiSh_XC4yk-1736722792-1.0.1.1_3J5iCyz6q0qHLosLSeS.wl4qS8LejZb4SCwoLOXK5Y. Consultado: 15 de diciembre de 2024.
- Noriega-Rivera, P. F. 2021. Terpenes and terpenoids, Recent advances. *IntechOpen*. Pp: 4-13. Recuperado de <https://pure.ups.edu.ec/es/publications/terpenes-in-essential-oils-bioactivity-and-aplications>. Consultado 20 de diciembre de 2024.
- Olivas, F., Wall, A., González, G., López, J., Álvarez, E. y Rosa, L. 2015. Taninos: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 31 (1): 55-66.

- Oluwatosin, A., Yougasphree, N., Johnson, L., Temitope, A., Venkataramgowda, S., Yaser, D. y Antar, E. 2022. Phytochemical screening and biological activities of *Diospyros villosa* (L.) de winter leaf and stem bark extracts. *Horticulturae*. 8 (10): 945.
- Otto, M. 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nature reviews. Microbiology*. 7 (8): 555–567.
- Otto, M. 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol*. 34 (2): 201-2014.
- Pacheco L. 1981. Ebenaceae. Flora de Veracruz. Fascículo 16. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB). Xalapa, Veracruz.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B., Lin, T. y Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 37 (1): 177-192.
- Pasachova, J., Ramírez, S. y Muñoz, L. 2019. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*. 17 (32): 25-38.
- Parada, R. 2023. Glucósidos. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/glucosidos/>. Consultado el 15 de julio 2025.
- Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S. y Vázquez, R. 2019. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección del tracto urinario. *Revista Chilena de Infectología*. 36 (2): 180-189.
- Paz, J., González, R., Ramírez, G. y Moreno, R. 2017. Mapa de susceptibilidad a procesos gravitacionales en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/321275494_Mapade_susceptibilida

d_a_procesos_gravitacionales_en_Tuxtla_Gutierrez_Chiapas_Mexico.

Consultado el 5 de mayo de 2024.

Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. 2002. Microbiología. 5ª ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España. España.

Pino, O. y Lazo, F. 2010. Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 25 (1): 34-43.

Plummer, D. 1981. Bioquímica práctica 2ª ed. Editorial McGrawHill Latinoamerica. Bogotá, Colombia. 345 pp.

Rahman, S., Ismail, M., Khurram, M., Ullah, I., Rabbi, F. y Iriti, M. 2017. Bioactive steroids and saponins of the genus *Trillium*. *Molecules*. 22 (12): 2156.

Rami, E., Singh, A. y Favzulazim, S. 2021. An overview of plant secondary metabolites, their biochemistry and generic applications. *Journal of Phytopharmacology*. 10 (5): 421-428.

Ramírez, L. y Díaz, H. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica*. 33 (XIII): 397-400.

Ramírez, E., Rodríguez, R., Salcedo, E., Ramírez, E., Molina, J., Tiessen, A., Ordaz, J., Martínez, N., Délano, J. y Zañudo, J. 2019. Seasonal changes in the metabolic profiles and biological activity in leaves of *Diospyros digyna* and *D. rekoi* "Zapote" trees. *Plants (Basel)*. 8 (11): 449.

Rath, S., Mohapatra, N., Dubey, D., Panda, S., Thatoi, H. y Dutta, S. 2009. Antimicrobial activity of *Diospyros melanoxylon* bark from Similipal Biosphere Reserve, Orissa, India. *African Journal of Biotechnology*. 8 (9): 1924-1928.

- Realpe, M., Hernández, C. y Agudelo, C. 2002. Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica*. 22 (2). 106-109.
- Redfern, J., Jinninmonth, M., Burdass, D. y Verran, J. 2014. Using Soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties. *Journal Microbiology & Biology Education*. 15 (1): 45-46
- Reichert, C., Salminen, H. y Weiss, J. 2019. *Quillaja* saponin characteristics and functional properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. 25 (10): 43-73.
- Royal Botanical Gardens Kew, 2000. Plants of the world online. Recuperado de <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:3227641#synoms> Consultado el 21 de mayo de 2024.
- Ruiz, E. y Suárez, M. 2015. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*. 46 (1): 9-24
- Salas, L., Moncayo, M., Guzmán, T. y Ramírez, M. 2023. Composición fitoquímica y actividad antioxidante en tres variedades de albahaca por efecto de distintos solventes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 13 (28): 113-123.
- Salem, M., Gohar Y., Camacho L., El Shanhorey N. y Salem A. 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.
- Sánchez y García-Figueroa, F. L. 2022. Fitoquímica. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 133 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.
- Sánchez, L. 2018. Determinación de la concentración de azúcares del zapote negro *Diospyros nigra* Jacq. y zapotillo negro *Diospyros rekoi* Standl. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México.
- 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. *Methods*. 4 (42): 321-324.
- Shamsudin, N., Ahmed, Q., Mahmood, S., Shah, S., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M., Parveen, H. y Zakaria, Z. 2022. Antibacterial effects of flavonoids and their structure-activity relationship study: a comparative interpretation. *Molecules*. 27 (4): 1149.
- Sharma, S., Pellett, S. y Morse, S. 2023. Special issue: Gram positive bacterial toxins. *Microorganisms*. 11 (8): 2054.
- Skovdal, S., Jorgensen, N. y Meyer, R. 2022. JMM profile: *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*. 71 (10): 15-20.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (3): 355-363.
- Severn, M. y Horswill, A. 2023. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature reviews. Microbiology*. 21 (2): 97–111.
- Socorro, M., Behrens, M., Moragas, C., Penedo, G., Silva, A. y Goncalves, C. 2022. Flavonols and flavones as potencial anti-inflammatory, antioxidant, and

- antibacterial compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022: 1-21.
- Sosa, J. y Chapoñan, J. 2022. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, según producción de beta lactamasas de espectro extendido, en urocultivos. Hospital III-1. Chiclayo, Perú 2020. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*. 15 (4): 598-603.
- Soto, M. y Rosales, M. 2016. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxyla*. *Maderas, Ciencia y Tecnología*. 18 (4): 701-714.
- Tagousop, C., Tamokou, J., Kengne, I., Ngnokam, D. y Voutquenne, L. 2018. Antimicrobial activities of saponins from *Melanthera elliptica* and their synergistic effects with antibiotics against pathogenic phenotypes. *Chemistry Central Journal*. 12 (97): 2-9.
- Tagousop, C., Tamokou, J., Endeguele, S., Ngnokam, D. y Voutquenne, L. 2018. Antimicrobial activities of glycosides from *Graptophyllum grandulosum* and their mechanism of antibacterial action. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18: 252-267.
- Tapia, J. 2013. El Ta'uch. Herbario CICY. *Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY)*. 5: 105-107.
- Tiwari, R. y Rana, C. 2015. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*. 3 (5): 661-670.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. 2017. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Editorial Medica Panamericana. México

- Truong, D., Nguyen, D., Ta, N., Bui, A., Do, T. y Nguyen, H. 2019. Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *In Vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*. 8178294: 1-9.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X. y Wu, M. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction Target Therapy*. 7 (199): 127.
- Uc-Cachón, A., Molina-Salinas, G., Dzúl-Beh, A., Rosado-Manzano, R., y Dzib Baak, H. 2023. Bacterias Gram-negativas de prioridad crítica en pacientes de las UCI de un hospital de tercer nivel. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 61 (5): 552–558.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C. y Bezirtzoglou, E. 2021. Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: a review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*. 27 (9): 2041.
- Vélez-Terranova, M., Campos Gaona, R. y Sánchez-Guerrero, H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 17: 489-499.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X. y Ren, L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. 22 (1): 132-49.
- Yahia, E. M. y Gutiérrez-Orozco, F. 2011. Black sapote (*Diospyros digyna* Jacq.). En: Yahia, E. M. (Ed). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits. Woodhead Publishing Limited. Oxford, Inglaterra. Pp. 244-250.

- Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B. y Li, M. 2021. Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*. 10 (3): 318.
- Yassin, N. y Ahmad, A. 2012. Incidence and resistotyping profiles of *Bacillus subtilis* isolated from azadi teaching hospital in Duhok City, Iraq. *Materia socio-medica*. 24 (3): 194–197.
- Zampini, I., Cudmani, N. y Isla, M. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 41 (3): 385-393.
- Zouine, N., Ghachtouli, N., Abed, S. y Ibensouda, S. 2024. A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: factors, mechanism insights and future prospects. *Scientific African*. 26: 258.
- Zou, Y. y Fang, W. 2021. Naturally derived glycosides with potential activity against *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 21 (27): 2500-2512.
- Zreen, Z., Hamid, A., Kiran, S., Farooq, T. y Suleiman, M. 2022. Estudio comparativo de extractos de *Diospyros malabarica* (Gaub) en diversos disolventes dependientes de la polaridad para la evaluación de fitoconstituyentes y actividades biológicas. *BioMed Research International*. 2: 1-16.

XII. ANEXOS

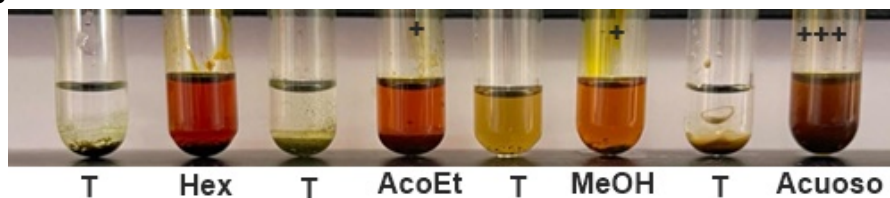
Anexo 1. Rendimiento de los extractos de hoja y corteza de *Diospyros digyna*.

Estructura vegetal	Disolventes	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
Hojas	Hex	4.16	11.82
	AcOEt	1.71	4.28
	MeOH	4.72	10.41
	Acuoso	4.52	4.52
Corteza	Hex	2.68	6.71
	AcOEt	6.53	16.34
	MeOH	2.81	7.03
	Acuoso	5.26	5.26

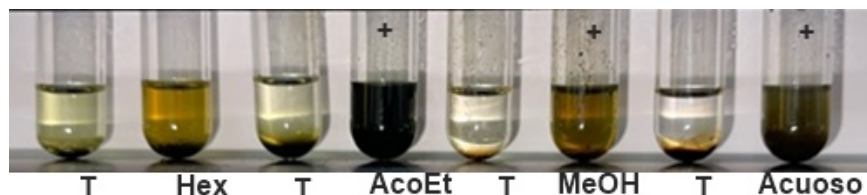
Disolventes: Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol.

Anexo 2. Pruebas de identificación de grupos de metabolitos secundarios de extractos de hojas de *Diospyros digyna*.

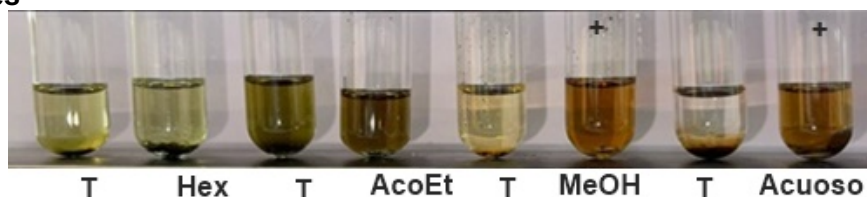
Alcaloides



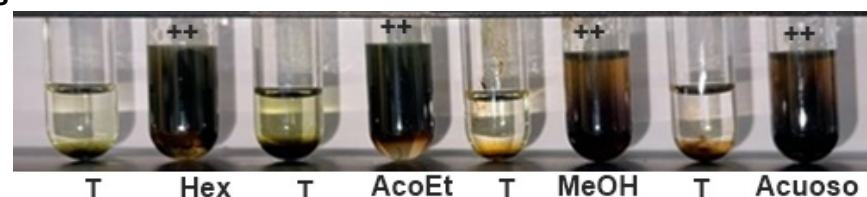
Fenoles



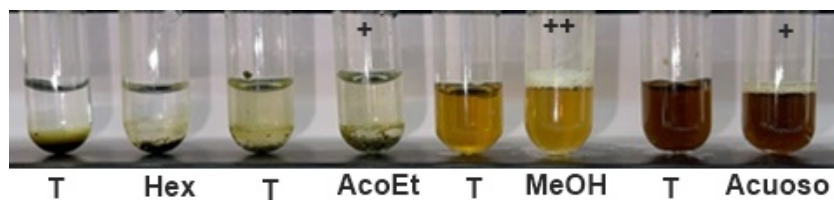
Flavonoides



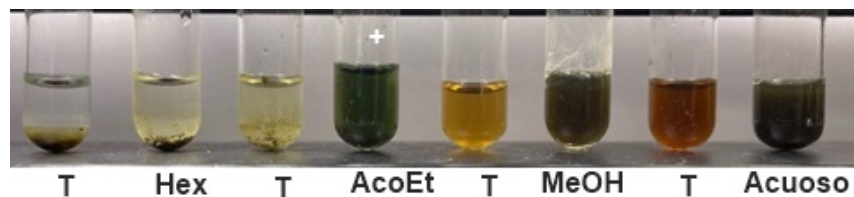
Glucósidos



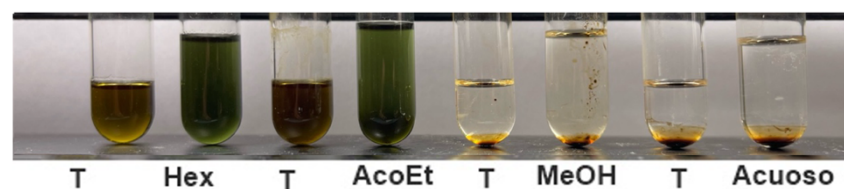
Saponinas



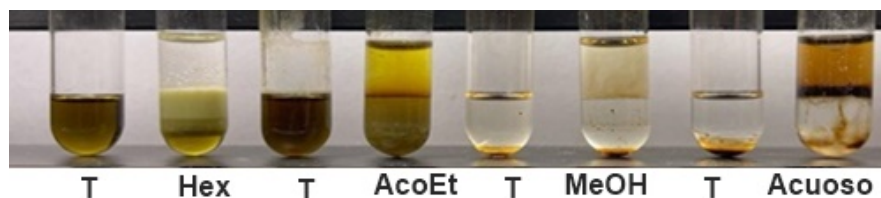
Taninos



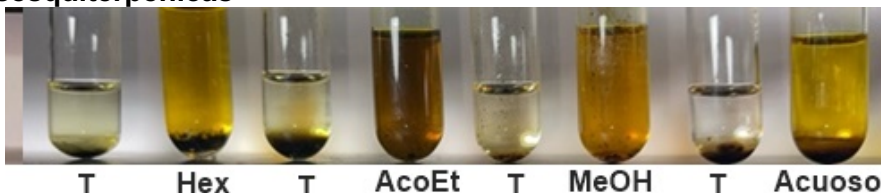
Terpenos



Quinonas



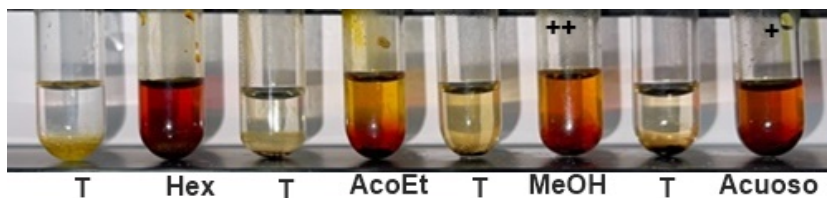
Lactonas sesquiterpénicas



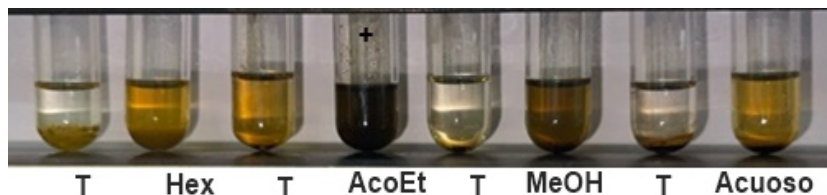
T: testigo; Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; H₂O: acuoso.

Anexo 3. Pruebas de identificación de grupos de metabolitos secundarios de extractos de corteza de *Diospyros digyna*.

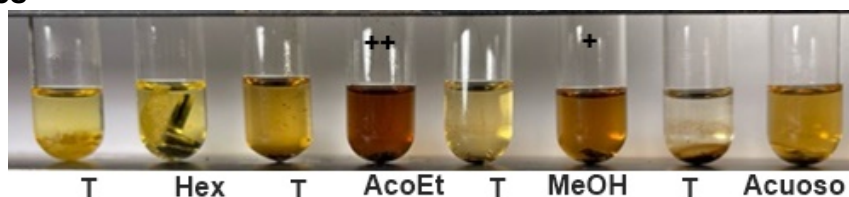
Alcaloides



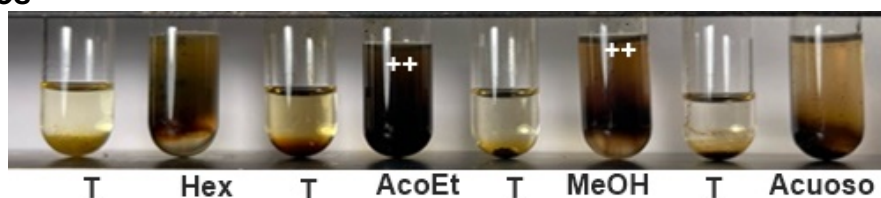
Fenoles



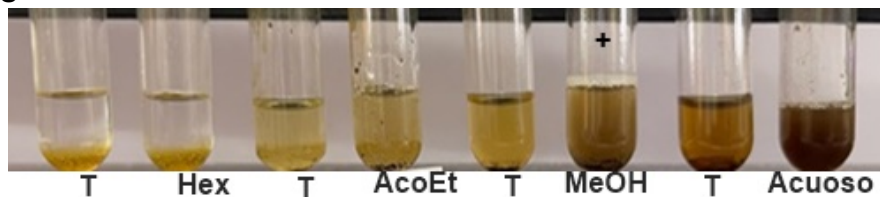
Flavonoides



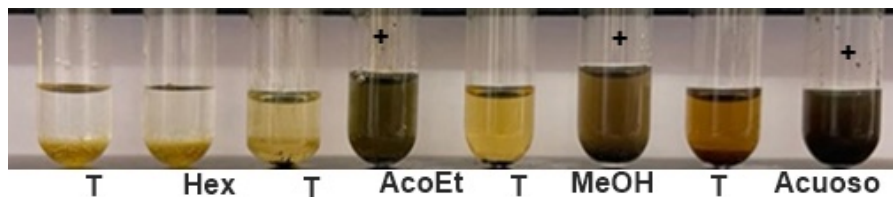
Glucósidos



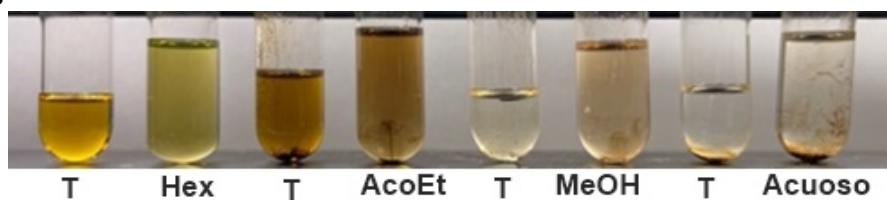
Saponinas



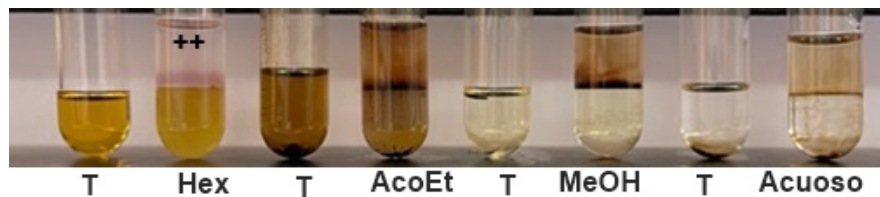
Taninos



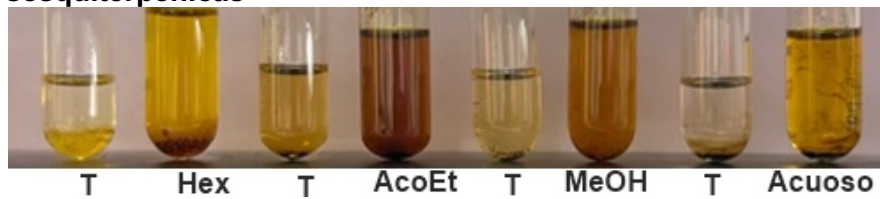
Terpenos



Quinonas



Lactonas sesquiterpénicas



T: testigo; Hex: hexano; AcOEt: acetato de etilo; MeOH: metanol; H₂O: acuoso.

Anexo 4. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición de los extractos de hojas de *Diospyros digyna*.

Hexano															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Acetato de etilo															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.33	0.57
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Metanol															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Acuoso															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R1: repetición 1; R2: repetición 2; R3: repetición 3; P: promedio; D.E: desviación estándar.

Anexo 5. Promedio y desviación estándar de halos de inhibición de los extractos de corteza de *Diospyros digyna*.

Hexano															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	6	6	6	6	0	6	6	6	6	0	8	8	9	8.33	0.57
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	7	8	7.66	0.57
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Acetato de etilo															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	12	9	9	10	1.73	14	13	13	13.33	0.57	15	13	15	14.33	1.15
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.33	0.57
<i>B. subtilis</i>	7	7	6	6.66	0.57	8	8	9	8.33	0.57	13	12	12	12.33	0.57
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Metanol															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	7	6.33	0.57
<i>S. Typhi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	6	7	6.66	0.57
<i>E. coli</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Acuoso															
Bacterias	Concentraciones (mg. mL ⁻¹)														
	2.5					5					10				
	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.	R1	R2	R3	P	D.E.
<i>S. aureus</i> AC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
<i>S. Typhi</i>	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>E. coli</i>	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
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R1: repetición 1; R2: repetición 2; R3: repetición 3; P: promedio; D.E: desviación estándar.

Anexo 6. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de hojas de *Diospyros digyna*. Prueba de Kruskal-Wallis y comparación entre las concentraciones por medio de la prueba de Dunn.

Tipo de extracto	Bacteria	Valor P	¿Significativo?	Prueba de Dunn			
Acetato de etilo	<i>B. subtilis</i>	0.034	Sí	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
				10 - 2.5	2.25	0.024	0.073
				10 - 5	2.25	0.024	0.073
				2.5 - 5	0	1.000	1.000

Anexo 7. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de corteza de *Diospyros digyna*. Prueba de Kruskal-Wallis y comparación entre las concentraciones por medio de la prueba de Dunn.

Tipo de extracto	Bacteria	Valor P	¿Significativo?	Prueba de Dunn			
Hexano	<i>S. aureus</i> AC	0.021	Sí	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
				10 - 2.5	2.40	0.016	0.048
				10 - 5	2.40	0.016	0.048
				2.5 - 5	0	1.000	1.000
	<i>B. subtilis</i>	0.034	Sí	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
				10 - 2.5	2.25	0.024	0.073
				10 - 5	2.25	0.024	0.073
				2.5 - 5	0	1.000	1.000
Acetato de etilo	<i>S. epidermidis</i>	0.021	Sí	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
				10 - 2.5	2.40	0.016	0.048
				10 - 5	2.40	0.016	0.048
				2.5 - 5	0	1.000	1.000
	<i>B. subtilis</i>	0.581	No	-			
Metanol	S. Typhi	0.021	Sí	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
				10 - 2.5	2.40	0.016	0.048
				10 - 5	2.40	0.016	0.048
				2.5 - 5	0	1.000	1.000

	<i>B. subtilis</i>	0.034	Sí	Comparación	Z	P.unadj	P.adj
				10 - 2.5	2.25	0.024	0.073
				10 - 5	2.25	0.024	0.073
				2.5 - 5	0	1.000	1.000

Anexo 8. Susceptibilidad de las bacterias a los extractos de corteza de *Diospyros digyna*. ANOVA simple y comparación entre las concentraciones por el método Tukey HSD al 95.0 de probabilidad.

Tipo de extractos	Bacteria	Valor P	¿Significativo?	Prueba de rangos múltiples Tukey HSD		
Acetato de etilo	<i>S. aureus</i> AC	0.0001	Sí	Comparación	Diferencia	+/- Límites
				10 - 2.5	-7.67	0.754
				10 - 5	-7.67	0.754
				2.5 - 5	0.75	0.754

Anexo 9. Halos de inhibición producidos por la gentamicina.

Bacterias	Concentraciones (mg/d)		
	2.5	5	10
<i>S. aureus</i> AC	30	30	31
<i>S. aureus</i>	31	31	31.33
<i>S. epidermidis</i>	31	31	31.33
<i>B. subtilis</i>	36	37	37
<i>E. coli</i> AC	36	37	37
<i>E. coli</i>	29.6	31	31.67
<i>S. Typhi</i>	34	35	35
<i>P. aeruginosa</i> AC	34	34	37.33
<i>P. aeruginosa</i>	32.67	32.67	32.67
<i>K. pneumoniae</i>	29	31	35.33

Anexo 10. Concentración letal media CL₅₀ de los extractos de hojas y corteza de *Diospyros digyna* sobre *Artemia salina*.

Estructura vegetal	Extractos	Concentración CL ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Desviación estándar	Categoría de toxicidad (McLaughlin <i>et al.</i> , 1998)
Hojas	Hexano	2 247.37	3.16	No tóxico
	Acetato de etilo	2 206.35	1.72	No tóxico
	Metanol	1 109.69	11.82	No tóxico
	Acuoso	1 361.16	4.13	No tóxico
Corteza	Hexano	5 150.67	2.54	No tóxico
	Acetato de etilo	972.09	8.2	Moderadamente tóxico
	Metanol	5 841.35	1.42	No tóxico
	Acuoso	1 317.74	5.26	No tóxico