



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

"Actividad antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia* var fruto ácido "

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

ARIDAITH PARRA REYES

Director: Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA 2022

COPIA DE ACTA DE REVISIÓN DE TESIS



UNIVERSIDAD DEL PAPAALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 14 de julio de 2021 a las 16 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Actividad antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia* var fruto ácido**" presentada por la alumna **Aridaith Parra Reyes**, con número de matrícula 14090066, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 14 de julio de 2021

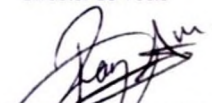
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



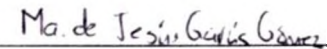
Dra. Alma Xochil Avila Alejandro
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



Dra. Delia Esther Páramo Calderón
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Maria de Jesús García Gómez
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Fernando Rivera Cabrera
Profesor Investigador
UAM-Iztapalapa
Revisor de Tesis

COPIA DE OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE TESIS



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de septiembre de 2021
Oficio No. JCIB/007/09/2021

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan


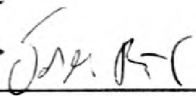
Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **Aridaith Parra Reyes** titulado "**Actividad antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia* var fruto ácido**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:


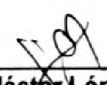
Presidente: Dra. María de Jesús García Gómez
Secretario: Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín
Vocal: Dra. Delia Esther Páramo Calderón
Primer suplente: Dr. Fernando Rivera Cabrera (UAM)
Segundo Suplente: Dr. Julián Mario Peña Castro

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dr. Julián Mario Peña Castro
Jefe de Carrera de Ingeniería en
Biotecnología
Universidad del Papaloapan

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan

**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

c.c.p. Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre, Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Andarh Parra Reyes, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

I. AGRADECIMIENTO

Al programa de jóvenes construyendo el futuro, por la beca otorgada con el número de folio: 3467407.

La Universidad del Papaloapan, por las facilidades brindadas durante el desarrollo del presente proyecto.

M en BE Alejandro Hernández López, por su excelente asesoría técnica en los experimentos y en la escritura de la tesis, por su orientación, por ser un profesor dedicado y apoyarme en todo momento, proporcionándome su atención y tiempo, por su paciencia, por brindarme parte de sus conocimientos en diversas áreas, por sus grandes consejos a nivel profesional y personal, por sus recomendaciones a lo largo de la realización de este proyecto y por último por creer en mis capacidades como estudiante y alentarme a seguir esforzándome.

Se agradece a LABIOTT el apoyo técnico, material y el acceso a sus instalaciones para la realización de este trabajo mediante el acuerdo LABIOTT /PPBIOT /2018-Bc-001. (LABIOTT es un emprendimiento en el modelo *business ángel* con recursos personales de M en BE Alejandro Hernández-López).

La directora de este trabajo, la Dra. Alma Xochil Ávila Alejandre. Por darme la confianza y creer en mi capacidad como estudiante para realizar este trabajo de investigación, por la paciencia, su disposición en tiempo, esfuerzo, por sus grandes consejos y recomendaciones a nivel profesional y personal, por su excelente asesoría técnica en los experimentos y en la escritura de la tesis y por sus recursos propios para financiar esta tesis. Gracias porque creer en mí y alentarme a no rendirme y esforzarme lo más que pueda.

Mi comité revisor de tesis conformado por: Dra. Delia Esther Páramo Calderón, Dr. Óscar Abelardo Ramírez Marroquín, Dra. María de Jesús García Gómez y el Dr. Fernando Rivera Cabrera (UAM-Iztapalapa). Por su tiempo, dedicación y apoyo en las revisiones, comentarios, así como consejos para mejorar mi escrito de tesis.

Amigos, Alexis Flores Méndez, Amairani Gallardo Ramírez, Janette Martínez Fernández, Azucena Pérez Carbajal, Keyla Ninive López Luévano, Rosa Elia Agüero Padilla, Karen Itzel Díaz Cruz,

Zenaida Zuñiga Sierra, Elizabeth Medina, Mayra Cruz Hernández, Karelía Quijano Santiago, Jorge Fransisco Garcia Carrasco y Maximiliano López Morales por su apoyo incondicional y la amistad que me han brindado.

II. DEDICATORIA

Desde que tengo memoria mi familia me ha acompañado en esta etapa de mi vida, siempre dándome las herramientas necesarias para poder avanzar en mi educación y también para formarme como una persona con valores, principios, justicia y sobre todo con humildad. Claro no siendo perfecta, pero a mi manera manejo cada una de sus enseñanzas y consejos. Para mí, mi familia lo es todo, mi madre Norma Reyes Camacho es la mujer más admirable del mundo la cual me ha enseñado lo que es ser una persona bondadosa y preocuparse por el bienestar de los demás, me ha enseñado a ser una mujer fuerte, con coraje y muy trabajadora, mi padre Gilberto Parra Ramos es un hombre admirable que me ha enseñado lo que es ser una persona fuerte que resiste cualquier adversidad, trabajadora y honesta, mis padres son lo más importante para mí y nunca podre devolver en esta vida y la otra lo que ellos me han dado son dos pilares que me ayuda a sostenerme y a seguir avanzando, y ellos me han enseñado a creer en mí y no rendirme por más difícil que sé a la situación, los amo. En esta trayectoria de mi carrera me enfoque tanto en mis estudios que no supe equilibrar mi vida académica con lo personal y no valoraba los instantes que pasaba con las personas que quería por lo que el universo me dio una mano para darme cuenta separando de mí uno de mis tres pilares, abuelita Lucina Reyes Camacho en donde quieras que estes en este pequeño universo sé que me vez avanzando, siempre me viste estudiando para lograr algo que era importante para mí y siempre viste por mi salud, porque estaba tan metida en mi meta y en mi vida de adolescente, tu me diste tantas enseñanzas entre ellas valorar a cada una de las personas que están en nuestras vidas y disfrutarlas hasta que llegue el momento de despedirnos, siempre te querré, hasta que todo lo que existe en el infinito se vuelva en la nada. Le agradezco a mi abuelita Emma Ramos Beatriz porque a pesar de la distancia todos los días me escribía mensaje dándome los buenos días, ánimo y frases muy motivadoras para no rendirme y a pesar de no haber convivido mucho con ella siempre la llevaré en mi corazón con mucho amor. A mis abuelitos Alberto Parra Santos y Everardo Reyes Barragán que se fueron muy pronto de esta vida, sin embargo, pude tener la dicha de pasar momentos agradables con ellos en mi niñez y ver que eran hombres muy trabajadores y que a pesar de su edad ellos se esforzaban para seguir trabajando en lo que amaban siempre los querré. Mis hermanos Gilberto, Ivan de Jesus y Yuren Yair, gracias por su apoyo, sus fechorías que me hacían reír y

me hacían despejar la mente sé que ustedes también están logrando y lograrán los objetivos que se propongan. Por último pero no menos importante a mi acompañante de vida Diego Feliciano Cruz, la persona que conoce totalmente mis virtudes y todos mis defectos, gracias por tu apoyo incondicional, por ser honesto en todo momento, por tu paciencia y por creer en mí cuando yo no lo hacía, por tus buenos consejos, por hacerme ver que todo llega a su tiempo y a no desesperar a no preocuparme por situaciones que aún no han ocurrido y a disfrutar los momentos más sencillos, a no rendirme cuando creo que todo está perdido y ayudarme a obtener mas valentía y optimismo, a dejar de lado el miedo por ello y más te amo.

III. ÍNDICE DE CONTENIDO

IV. ÍNDICE DE FIGURAS	IX
V. ÍNDICE DE TABLAS	X
VI. ABREVIATURAS	XI
VII. RESUMEN	XII
VIII. ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Enfermedades infecciosas y bacterias causantes.....	3
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.2 <i>Aeromonas spp</i>	4
2.1.3 <i>Pseudomonas spp.</i>	4
2.1.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.2 Antibióticos.....	5
2.2.1 Importancia y problemas del uso incorrecto de los Antibióticos	7
2.3 Bacterias resistentes.....	7
2.3.1 Causa de la resistencia de las bacterias a los antibióticos	8
2.3.2 Estrategias para el control de las bacterias resistentes	8
2.4 Las plantas medicinales como agentes antimicrobianos	9
2.4.1 Compuestos antimicrobianos de plantas medicinales.....	10
2.5 Método de difusión en disco (Kirby Bauer).....	11
2.6 <i>Byrsonima crassifolia</i>	12
2.6.1 Características biológicas	13
2.6.2 Usos medicinales y actividad biológica	13

3. ANTECEDENTES.....	15
3.1 Actividad antimicrobiana en <i>Byrsonima crassifolia</i>	15
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. HIPÓTESIS	18
6. OBJETIVOS	18
6.1 Objetivo principal	18
6.2 Objetivos secundarios	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1 Diagrama experimental	19
7.2 Material biológico.....	19
7.3 Obtención de extractos de <i>B. crassifolia</i>	21
7.3.1 Extracción por Ultrasonido (UE)	22
7.3.2 Extracción Asistida por Ultrasonido y Prensado (UPAE)	23
7.4 Reactivación de cepas	24
7.5 Actividad antimicrobiana (Kirby-Bauer) de extractos de <i>B. crassifolia</i>	24
7.5.1 Preparación de las soluciones de extractos (solución stock)	24
7.5.2 Preparación de los discos	24
7.5.3 Preparación y barrido de la solución de inóculo	24
7.5.4 Ensayo de Kirby Bauer	25
7.5.5 Lectura e interpretación de resultados	25
7.6 Análisis estadístico.....	25
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
8.1 Reactivación de cepas	26
8.2 Obtención de extractos de <i>B. crassifolia</i>	28
8.3 Actividad antimicrobiana (Kirby-Bauer) de extractos de <i>B. crassifolia</i>	30

9. CONCLUSIONES.....	40
10. PERSPECTIVAS.....	41
11. REFERENCIAS	42
12. ANEXOS.....	51

IV. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general de la estrategia experimental.....	19
Figura 2. Mapa de ubicación de <i>B. crassifolia</i> . El punto rojo muestra la ubicación del sitio de colecta del material vegetal (Google Earth).....	20
Figura 3. A) Hojas secas, B) Hojas seleccionadas en buen estado y C) Segmentos de corteza. ...	20
Figura 4. Harinas obtenidas de hoja y corteza de <i>B. crassifolia</i> . A) Hojas trituradas B) Harina de hoja molida, C) Harina de corteza molida.	21
Figura 5. Obtención de extractos de <i>B. crassifolia</i> : A) Sonicación, B) Filtración y C) Concentración de los extractos.....	23
Figura 6. A) Sonicación y B) Destilación del producto extraído.	23
Figura 7. Resultados de las pruebas de tinción de Gram de las bacterias empleadas.	27
Figura 8. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>E.coli</i>	30
Figura 9. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>E.coli</i>	30
Figura 10. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Aeromonas spp.</i>	32
Figura 11. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Aeromonas spp.</i>	32
Figura 12. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Pseudomonas spp.</i>	34
Figura 13. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Pseudomonas spp.</i>	34
Figura 14. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
Figura 15. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37

V. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a las prácticas médicas.....	6
Tabla 2. Libros y códigos de plantas medicinales.....	9
Tabla 3. Principales compuestos antimicrobianos provenientes de plantas y sus mecanismos de acción antimicrobiana	10
Tabla 4. Actividad antimicrobiana en <i>Byrsonima crassifolia</i>	15
Tabla 5. Condiciones del rotavapor para el secado de los extractos.....	22
Tabla 6 . Caracterización parcial de las bacterias empleadas.....	26
Tabla 7. Caracterización de la sensibilidad a algunos antibióticos de <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
Tabla 8. Rendimiento de los extractos de hoja y corteza obtenidos por el método de extracción por UE y por el método UPAE.....	29

VI. ABREVIATURAS

CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
AN	Agar Nutritivo
D.O	Densidad óptica
DDM	Método de Difusión en Disco
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EMB	Eosina Azul de Metileno
IDEM	De la misma manera
IPGRI	Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos
LB	Luria Bertani
N/D	No determinado
pH	Potencial de Hidrógeno
SEE	Soporte + Etanol Evaporado
UE	Extracción por Ultrasonido
UPAE	Extracción Asistida por Ultrasonido y Prensado
UV	Ultravioleta

VII. RESUMEN

La problemática de la resistencia bacteriana a los antibióticos conlleva a la búsqueda de nuevas estrategias para su control, presentándose a las plantas medicinales como una fuente de metabolitos secundarios, los cuales le proporcionan a la planta actividades biológicas como la actividad antimicrobiana. En México existen diversas especies frutícolas nativas y uno de estos son el nanche, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Roque et al., 2012). Es un árbol, de la familia de las Malpigiáceas, distribuido en las zonas subtropicales de México. Se ha reportado variabilidad en los árboles, el fruto y la pulpa, distinguiéndose tres sabores del fruto: dulce, ácido y agridulce, de acuerdo a las variedades silvestres denominadas “changunga” y a las domesticadas “nanche” (Bayuelo-Jiménez et al., 2006; Medina-Torres et al., 2004). El fruto dulce del nanche es usado como alimento y el árbol de frutos ácidos tiene aplicaciones agroforestales o decorativas. Las hojas y corteza del árbol han sido utilizadas en la medicina tradicional de México, en el tratamiento de diarrea, disentería, inducción del parto, en el flujo vaginal y estomatitis entre otros (Medina-Torres et al., 2012; Martínez-Vázquez et al., 1999). Debido al uso de *B. crassifolia* en la medicina tradicional, es de interés investigar sus actividades biológicas. Reportándose un estudio sobre la actividad antioxidante en hojas y corteza del árbol variedad ácida (Roldan Sabino et al., 2018) y valiéndonos de la presencia de las variedades del árbol en el municipio de Tuxtepec y la subutilización de la variedad de fruto ácido, reportado por el grupo de investigación de la UNPA, Zúñiga-Sierra, (2019). En el presente trabajo, se planeó determinar la actividad antimicrobiana de las hojas y corteza de la variedad ácida. Donde se obtuvieron de cada material biológico extractos con diferente polaridad (etanólico, diclorometánico y hexánico) por el método de Extracción por Ultrasonido (UE), obteniéndose también un extracto etanólico de cada material biológico por el método de Extracción Asistida por Ultrasonido y Prensado (UPAE). El extracto con mayor rendimiento fue el extracto etanólico de hoja con 4.72 %, seguido por el de corteza con 2.31 % obtenidos por UE. En cuanto al rendimiento de los extractos etanólicos UPAE Y UE, los extractos por UPAE fueron los que tuvieron un rendimiento mayor de 6.56 %. El estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de hoja y corteza, mostró que la mayor actividad se concentraba en los extractos etanólicos. Los extractos etanólicos de hoja y corteza obtenidos por el método UPAE y el método UE actuaron de una manera similar contra cada una de las bacterias.

VIII. ABSTRACT

The problem of bacterial resistance to antibiotics leads to the search for new strategies for its control, presenting medicinal plants as a source of secondary metabolites, which provide the plant with biological activities such as antimicrobial activity. In Mexico there are several native fruit species and one of these is the nanche, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Roque et al., 2012). It is a tree, of the Malpigiaceae family, distributed in the subtropical areas of Mexico. Variability has been reported in the trees, the fruit and the pulp, distinguishing three flavors of the fruit: sweet, sour and bittersweet, according to the wild varieties called "changunga" and the domesticated "nanche" (Bayuelo-Jiménez et al., 2006; Medina-Torres et al., 2004). The sweet fruit of the nanche is used as food and the acid fruit tree has agroforestry or decorative applications. The leaves and bark of the tree have been used in traditional medicine in Mexico, in the treatment of diarrhea, dysentery, labor induction, vaginal discharge and stomatitis, among others (Medina-Torres et al., 2012; Martínez-Vázquez et al. al., 1999). Due to the use of *B. crassifolia* in traditional medicine, it is of interest to investigate its biological activities. Reporting a study on the antioxidant activity in leaves and bark of the acid variety tree (Roldan Sabino et al., 2018) and using the presence of the tree varieties in the municipality of Tuxtepec and the underutilization of the acid fruit variety, reported by the UNPA research group, Zúñiga-Sierra, (2019). In the present work, it was planned to determine the antimicrobial activity of the leaves and bark of the acid variety. Where extracts with different polarity (ethanolic, dichloromethane and hexane) were obtained from each biological material by the Ultrasound Extraction method (UE), also obtaining an ethanolic extract of each biological material by the Ultrasound Assisted Extraction and Pressing method (UPAE). The extract with the highest yield was the ethanolic leaf extract with 4.72%, followed by the bark extract with 2.31% obtained by UE. Regarding the yield of the UPAE and UE ethanolic extracts, the extracts by UPAE were those that had a higher yield of 6.56%. The study of the antimicrobial activity of the leaf and bark extracts showed that the highest activity was concentrated in the ethanolic extracts. The ethanolic extracts of leaf and bark obtained by the UPAE method and the UE method acted in a similar way against each of the bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento de los antibióticos, se pensaba que estos eliminarían o suprimirían las enfermedades infecciosas, sin embargo, los microorganismos que las causan se están volviendo resistentes a los antibióticos. Las bacterias son uno de los microorganismos que generan más problemas de salud a nivel mundial, ya que han desarrollado mecanismos de resistencia frente a la presencia de los antimicrobianos, los cuales inhiben a las bacterias susceptibles, pero no tienen actividad sobre las bacterias resistentes, permitiendo su multiplicación, propagación y la transferencia de genes de resistencia por adquisición genética a la misma especie o diferentes especies bacterianas (Sibanda et al., 2007; Chopra, et al., 1997).

Uno de los factores que ha generado la resistencia de las bacterias a los antibióticos, ha sido su uso inadecuado en diversas áreas, como la medicina, la ganadería y la acuicultura, generando una presión selectiva sobre organismos sensibles y creando una resistencia en los demás microorganismos (Sibanda et al., 2007). Esta situación genera un problema de salud en el momento que, estos microorganismos se transfieren a los humanos y generan enfermedades infecciosas difíciles de tratar con los antibióticos actuales, llevando a los pacientes a problemas más graves e incluso a la muerte (Palaniappan y Holley, 2010; Sibanda et al., 2007).

Para controlar el problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos, se requieren de nuevas estrategias, siendo una opción la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos naturales que puedan bloquear o eludir los mecanismos de resistencia (Palaniappan y Holley, 2010; Sibanda et al., 2007). Estando presente los extractos crudos de plantas medicinales como una fuente para la obtención de antimicrobianos, debido a que las plantas medicinales son ricas en metabolitos secundarios como los taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, para los cuales se han reportado estudios *in vitro* donde se han probado sus propiedades antimicrobianas (Sibanda et al., 2007).

En México, se cuenta con diferentes árboles frutales, entre los cuales se encuentra *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth, conocido comúnmente como árbol de nanche (Roque et al., 2012). Perteneciente a la familia botánica de las Malpigiáceas, el árbol se encuentra ampliamente distribuido en la zona subtropical de México (Moreno, 2015). La especie frutícola *Byrsonima crassifolia* incluye árboles de frutos sabor dulce y árboles de frutos sabor ácido (Raya-Pérez et al.,

2010). En la región del Papaloapan, se encuentran ambas variedades (dulce y ácida) de *B. crassifolia*. En 2019, Zúñiga-Sierra realizó un estudio sobre las características fenotípicas y un mapa de distribución de *Byrsonima crassifolia* en el municipio de Tuxtepec, donde se observa que la mayoría de los árboles evaluados (90%), son semisilvestres, aunque en las colonias de mayor urbanización predominan los árboles con frutos dulces, mientras que las zonas periurbanas primordialmente los árboles de frutos ácidos. Los frutos son consumidos como alimento, los árboles son utilizados para reforestar áreas con suelos pobres y forrajeo (Moreno, 2015). La variedad de nanche de fruto dulce, tiene una gran importancia productiva a nivel comercial, ya que genera ingresos a la población por el uso y venta del fruto (Roldan-Sabino et al., 2018; Jaimes, 2009). Mientras que fuentes etnobotánicas han mencionado que *Byrsonima crassifolia* se encuentra entre las plantas más usadas para tratamientos de enfermedades gastrointestinales (Souza et al., 2017; Caceres et al., 1990). En diferentes estados de México por medio de la medicina tradicional, se ha reportado el uso de las hojas y corteza mediante infusiones y se le atribuyen propiedades antidiarreicas, astringentes, antiinflamatorias y antioxidantes (Moreno, 2015). Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de diferente polaridad en hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia* variedad frutos ácidos, del municipio de Tuxtepec, para aportar más información sobre las actividades biológicas del árbol y así en un futuro, se le pueda dar un valor agregado al árbol.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedades infecciosas y bacterias causantes

Las enfermedades infecciosas son trastornos que se manifiestan en los seres vivos y suelen ser resultado de una infección provocada por un microorganismo. Las enfermedades gastrointestinales son una de las más problemáticas, afecta más gravemente a las personas más vulnerables, como niños y ancianos (Hernández et al., 2011). Son una de las principales causas de consulta médica y una primera causa de muerte en diferentes partes del mundo. La incidencia y prevalencia de este grupo de enfermedades depende de las condiciones sanitarias de la persona y su nivel socioeconómico. Entre los organismos etiológicos que están involucrados se encuentran los hongos, levaduras, parásitos y sobre todo las bacterias, los cuales se transmiten, por vía fecal, oral, por el consumo de agua y alimentos contaminados (Hernández et al., 2011; Méndez, 1996). Las bacterias son microorganismos pertenecientes al reino procariota, del cual se derivan el grupo de las Eubacterias, bacterias unicelulares, adaptadas a vivir en cualquier ambiente, algunas de ellas pueden ocasionar enfermedades infecciosas a los humanos (Lucana y Huanca, 2014; Pírez, 2008; Garcés y Saravia, 2008). Entre ellas se encuentran: *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Bacillus thuringiensis* (Raymond y Federici, 2017; Hernández et al., 2011).

2.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por flagelos peritricos, se encuentra en el intestino grueso del humano y animales de sangre caliente, sin embargo, algunas cepas han adquirido genes que le permiten causar infecciones intestinales como la diarrea. Entre estas cepas de *E. coli* patógenas, se encuentran los grupos; enterotoxigénico (ETEC), enteroinvasivo (EIEC), enteropatogénico (EPEC), enterohemorrágico (EHEC). Estos grupos han sido detectados en diferentes productos como cárnicos, lácteos, pescados, mariscos, bebidas, hielo y leguminosas. La cepa enterohemorrágica (EHEC) produce dos tipos de toxina Shiga, Stx1 y Stx2, que ocasionan diarrea y colitis hemorrágica. La bacteria se presenta principalmente en niños menores de dos años y durante los primeros seis meses de vida. Se han reportado estudios sobre la presencia de *E. coli* enteropatógena (EPEC) en niños menores de cinco años internados por diarrea aguda en hospitales de la ciudad de México y Villa Hermosa, Tabasco (Bush y Pérez, 2020; Soto-Valera et al., 2016; Hernández et al., 2011).

2.1.2 *Aeromonas spp*

Aeromonas spp., es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo. Están distribuidos en diversos ambientes, sobre todo acuáticos, es proveniente de la familia *Aeromonadaceae*. Las *Aeromonas* han sido clasificadas en el grupo mesófilo (son móviles y están asociados con enfermedad en seres humanos) y los psicrófilos (no móviles y asociados a enfermedad en peces). No se describían como un patógeno clásico involucrado en los cuadros clínicos de las enfermedades gastrointestinales, pero en 1980 fue propuesta como un agente enteropatógeno emergente, estudiado por los padecimientos en las enfermedades extraintestinales, que ocasiona enfermedades diarreicas, afectando a niños menores de 6 años y adultos mayores de 60 años. Entre los países que han estudiado este agente se encuentra; España, Portugal y Medio oriente. En México no se han reportado estudios sobre este agente, sin embargo, ya existen datos acerca de este género sobre estudios de cepas aisladas de cuadros clínicos diarreicos en el estado de Hidalgo, y de muestras ambientales de aguas en playas del estado de Veracruz (Soto-Valera et al., 2016). Aun así, este género está subestimado en México. *Aeromonas* es causa potencial de gastroenteritis en seres humanos, debido a la producción de enterotoxinas, las cuales se han encontrado en pacientes con diarrea. Las principales fuentes de contaminación del microorganismo son el agua, los vegetales, comida de mar y comida de origen animal (Hernández et al., 2011).

2.1.3 *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas spp., es un bacilo Gram negativo, el cual es habitante común de aguas y suelos, esta bacteria se presenta en infecciones nosocomiales que generan infecciones en la piel y tejidos blandos a pacientes con quemaduras y en heridas profundas con punzocortantes llevando esto a una bacteriemia, la bacteria también puede ocasionar infecciones vías aéreas e infecciones urinarias (Bush y Pérez, 2020).

2.1.4 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva, con forma de bacilo y esporulante, aislada de una gran diversidad de ecosistemas como; el suelo, el agua, insectos muertos, hojas de árboles, diversas coníferas y mamíferos insectívoros, así como de tejidos humanos con necrosis severa (Palma et al., 2012). La bacteria se emplea para el control de plagas de insectos en la agricultura,

sin embargo, es allegada taxonómicamente a *B. cereus*, diferenciándose solo por la producción de la δ -endotoxina codificada por el plásmido de *B. cereus*, siendo inestable la manera de diferenciarse una de la otra, debido a la transmisión genética por parte de los plásmidos, considerando a *B. thuringiensis* una variante de *B. cereus* (Damgaard et al., 1997). La Autoridad Europa de Seguridad Alimentaria efectuó una revisión sobre *Bacillus thuringiensis*, debido a un incidente de intoxicación alimentaria, argumentaron que la bacteria representa un riesgo para la salud semejante al *B. cereus* (Raymond y Federici, 2017). Desde el punto de vista clínico *B. cereus* provoca enfermedades infecciosas como: bacteriemia, septicemia, infecciones del sistema nervioso, sistema respiratorio, meningitis, endocarditis, pericarditis, abscesos, infecciones oculares, diarreas y vómitos (Cortez-Sánchez et al., 2018; Pérez-Portuondo, 2012; Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2003).

Hasta principios del siglo XX no se contaba con un tratamiento eficaz y que atacara directamente a los microorganismos causantes de las enfermedades infecciosas, todo esto cambio con el descubrimiento de los antibióticos.

2.2 Antibióticos

Antibiótico es una palabra derivada de las palabras griegas anti “contra” y Bios “vida” (Camacho, 2010). Estrictamente los antibióticos pueden ser descritos como antimicrobianos, ya que los antimicrobianos son compuestos que los organismos como hongos y bacterias producen de manera natural, estos compuestos son capaces de inducir la muerte o detener el crecimiento del microorganismo (parásitos, hongos y bacterias), sin embargo, es mínimo el uso de compuestos de origen natural ante la gama de moléculas de origen sintético que suelen ocuparse en la actualidad, estos reciben el nombre de antibióticos (Bado et al., 2006).

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo (Bado et al., 2006). La clasificación de los antibióticos en las prácticas médicas se organiza de acuerdo a su efecto bactericida y bacteriostático, su mecanismo de acción y estructura química, algunos de estas particularidades se describen en la Tabla 1 (Camacho, 2010).

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos de acuerdo a las prácticas médicas (Camacho, 2010; Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana	Grupos antimicrobianos	Antimicrobianos representativos	Efecto
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	b-lactámicos Penicilinas ¹	Naturales: penicilina G, penicilina V	Bactericidas
		Resistentes a penicilinasas: cloxacilina, oxacilina, meticilina	
		Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina	
		Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina	
	Cefalosporinas	Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina	
		cefazolina, cefalotina ¹	
		cefuroxima, cefoxitina, cefotetán, cefaclor, cefamandol ²	
		cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima	
	Monobactams	cefepima, cefpiroma ³	
	Carbapenems	Aztreonam	
	Glucopéptidos	Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem	
		Vancomicina, teicoplanina	
Bacitracina	Bacitracina		
Isoxazolidinonas	Cicloserina		
Fosfonopéptidos	Fosfomicina	Bactericidas	
Alteración de la membrana citoplásmica	Polimixinas	Polimixina B, polimixina E (colistina)	
	Lipopéptidos	Daptomicina	
	Ionóforos	Tirocidinas	
Inhibición de la síntesis proteica	Ácido fusídico	Ácido fusídico	
	Aminoglucósidos	Gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina	Bactericidas
	Anfenicoles	Cloranfenicol, Tiamfenicol ¹	Bacteriostáticos
	Estreptograminas	Quinupristina-Dalfopristina	
	Lincosamidas	Clindamicina, lincomicina ¹	Bacteriostáticos
	Macrólidos	eritromicina, claritromicina, roxitromicina	Bacteriostáticos
		15 átomos carbono: azitromicina (azálidos)	
		espiramicina, josamicina, midecamicina	
	Cetólidos: telitromicina		
	Mupirocina	Mupirocina	
	Oxazolidinonas	Linezolid ⁴	
Tetraciclinas	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina	Bacteriostáticos	
Gliciliclinas	Tigeciclina		
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas	generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico ¹	Bactericidas
		Norfloxacin ²	
		ciprofloxacino, levofloxacino ³	
		moxifloxacino, gemifloxacino	
	Rifamicinas	Rifampicina ⁴	
	Nitroimidazoles	Metronidazol, ornidazol, tinidazol	
	Nitrofuranos	Nitrofurantoína, furazolidona	
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas,	Cotrimoxazol ¹	Bacteriostáticos
	Diaminopirimidinas Trimetoprima		

	Sulfametoxazol		
Inhibidores de b-lactámicas		Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam	

Los superíndices indican la generación de los antibióticos.

2.2.1 Importancia y problemas del uso incorrecto de los Antibióticos

Actualmente los antibióticos están entre los medicamentos más vendidos a nivel mundial con un valor de mercado de entre 7 y 22 mil millones de dólares. Uno de los primeros problemas que se dieron por el uso de los antibióticos fueron las reacciones adversas que estos provocaban al ser usados. Por otro lado, el uso inadecuado de los antibióticos tanto en el área de la medicina, la ganadería y la acuicultura, causó la aparición de bacterias resistentes y multirresistentes a los antibióticos (Maguiña, 2013; Sibanda et al., 2007).

2.3 Bacterias resistentes

El origen de la resistencia de las bacterias a los antibióticos proviene de la genética y la fisiología innata que se hereda a través de las especies y la inclinación de las bacterias a intercambiar el material genético de manera espontánea en las especies y géneros. Esta estrategia genética combinatoria ha resultado en la acumulación de fenotipos de resistencia a múltiples fármacos en muchas especies de bacterias (Wright y Sutherland et al., 2007). Las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* y *Pseudomona aeruginosa*, fueron las primeras en presentar resistencia y posteriormente las Gram positivas. En los últimos años se han reportado que la resistencia de *Aeromonas* obtenida de truchas a antibióticos β -lactamas, también se ha reportado la resistencia de *Bacillus* obtenida del río Almendares a diferentes antibióticos como Eritromicina, Penicilina, cefalexina, cloranfenicol, ceftriaxona, cefotaxima (Maguiña, 2013; Martínez et al., 2010). La Sociedad Estadounidense de Enfermedades Infecciosas, ha identificado que bacterias como *Staphylococcus aureus* son resistente a la meticilina. Los aislamientos de esta bacteria se han incrementado de 0% a 70% en Japón y Corea, 40% en Bélgica, 39% en Gran Bretaña y 28% en Estados Unidos, en un tiempo de 10 a 15 años. Por ello, resulta urgente tener mayor conocimiento en la aplicación adecuada de los diversos antibióticos existentes (Maguiña, 2013).

2.3.1 Causa de la resistencia de las bacterias a los antibióticos

El mal manejo irracional de los antibióticos es una de las causas que ha permitido que las bacterias presenten resistencia, presentando un problema muy grave a nivel mundial. El manejo irracional de los antibióticos comenzó en hospitales, luego a nivel comunitario y finalmente en áreas como la ganadería y acuicultura para una mejor producción. Por esa razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la actual multirresistencia de diversos gérmenes entre ellos las bacterias, como uno de los grandes problemas en salud pública (Maguiña, 2013; Sibanda et al., 2007).

Las causas de que las bacterias incrementen la resistencia a antibióticos incluyen (Palaniappan y Holley, 2010):

- La producción animal intensiva en la ganadería y la acuicultura, donde los antibióticos se usan como aditivos, a niveles sub-terapéuticos para promover el crecimiento, aumentar la eficiencia del alimento y prevenir infecciones (Palaniappan y Holley, 2010).
- Uso excesivo de antibióticos en medicina humana sin seguridad diagnóstica, por presión del paciente o del entorno médico, “negligencia” (Maguiña, 2013).
- La automedicación, por iniciativa del entorno familiar o su propio diagnóstico, sin acudir con un médico (Fajardo et al., 2013).

2.3.2 Estrategias para el control de las bacterias resistentes

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es uno de los problemas clínicos más importantes en la medicina moderna, ya que si no se controla puede llevar al surgimiento de epidemias de enfermedades infecciosas para las cuales no hay tratamiento, afectando al sector de la salud, debido a que afecta el tratamiento contra las enfermedades infecciosas, por esta razón se necesita de nuevas estrategias terapéuticas para tratar este problema (Wright y Sutherland et al., 2007).

Algunas de las estrategias que se han propuesto incluyen (Wright y Sutherland et al., 2007):

- Inhibidores de los mecanismos de resistencia y los virus microbianos se caracterizan por estrategias que también están generando nuevos productos químicos que pueden extender la vida de los antibióticos existentes.

- La identificación de bacterias productoras de antibióticos proporciona acceso a nuevos organismos y nuevos productos químicos bioactivos. En este sentido las bacterias marinas han demostrado ser fuentes de varios productos naturales antitumorales y antibióticos nuevos. (Wright y Sutherland et al., 2007).
- Finalmente, las plantas medicinales se han utilizado durante milenios en el tratamiento de infecciones. Los esfuerzos para aislar agentes activos en plantas han llevado a la identificación de varios agentes antibacterianos (Gibbons, 2004)

2.4 Las plantas medicinales como agentes antimicrobianos

Se requieren de nuevas estrategias terapéuticas para resolver o controlar la resistencia a los antibióticos (Wright y Sutherland et al., 2007). Una de estas estrategias es la identificación de compuestos antimicrobianos naturales provenientes de plantas medicinales, las cuales han sido utilizadas durante milenios como fuentes en el tratamiento de infecciones, para curar los dolores internos y externos, generándose documentos medicinales con numerosas recetas de hierbas y extractos como se aprecia en la Tabla 2 (Gibbons et al., 2004).

Las plantas medicinales son consideradas como tal, cuando genera en sus órganos compuestos que les proporcionan a las plantas actividades biológicas, siendo utilizadas en la medicina tradicional con fines terapéuticos (fitoterapia moderna) o para la semisíntesis químico-farmacéutica (Maguiña, 2013; Avello y Cisternas, 2010). Las plantas medicinales se han utilizado desde épocas antiguas, como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Libros y códices de plantas medicinales (Ferdes, 2018; Sánchez-Ruiz et al., 2012).

Libro y códices	Año	Número de recetas
Papiro de Ebers	Data del siglo XV a. C.	800 recetas con hierbas y diferentes extractos.
Sistema ayurvédico (ciencia de la vida y la ciencia de la longevidad)	2500 y 500 a. C en la India	Uso de hierbas medicinales y extractos, y otras dietas especiales, para un estilo de vida mejor
<i>Libro Pen-tsao</i>	China y el Lejano Oriente, fechado en el siglo VII d.C.	400 hierbas medicinales utilizadas en jugos, infusiones y pomadas
Documento Hippocratium	Corpus Grecia	Presenta los efectos beneficiosos de más de 400 especies de plantas.
Claudio Galeno	130-200 D.C., en la antigua Roma	Estudió 450 plantas y las formulaciones de medicamentos para plantas.
Paracelso	1493-1541	Afirmó que las sustancias específicas extraídas de las plantas están involucradas en el tratamiento de la enfermedad

Códice Florentino	Fray Bernardino de Sahagún franciscano	Costumbres prehispánicas de Mesoamérica de los rituales de la medicina y descripción de plantas medicinales.
-------------------	--	--

Con el desarrollo de la medicina moderna se popularizó el uso de fármacos sintéticos, sin embargo, no se ha olvidado el uso de plantas medicinales, especialmente en países en vías de desarrollo, debido a su disponibilidad, bajo costo y fácil conservación/almacenamiento, por lo tanto, siempre ha sido de interés examinar a nivel laboratorio las actividades biológicas que se le atribuyen (Ferdes, 2018; Avello y Cisternas, 2010).

2.4.1 Compuestos antimicrobianos de plantas medicinales

Las plantas cuentan con metabolitos secundarios, los cuales se podrán identificar solo en la etapa de crecimiento o también al momento que la planta presenta un estrés, debido a un ataque de microorganismos o la falta de nutrientes. La composición de los metabolitos varía dependiendo de los órganos y tejidos de la planta (Ferdes, 2018).

Los metabolitos secundarios más abundantes que se han reportado en las plantas medicinales son; Los Fenoles, los Alcaloides, los compuestos Organosulfurados, las Saponinas, y los Aceites Esenciales (Khameneh et al., 2019; Ferdes, 2018; Khorshidiana et al., 2018; Pisoschi et al., 2018; Djilani y Dicko, 2012). De las diferentes clases de metabolitos secundarios ya mencionados, se han determinado compuestos con actividad antimicrobiana provenientes de las plantas medicinales. El posible mecanismo de acción de los compuestos se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales compuestos antimicrobianos provenientes de plantas y sus mecanismos de acción antimicrobiana (modificado de Khameneh et al., 2019; Ferdes, 2018; Pisoschi et al., 2018; Djilani y Dicko, 2012).

Clase	Subclase	Compuesto	Plantas	Mecanismo
Fenólicos	Fenoles simples	Baicaleína (flavona)	Las raíces de <i>Thymus vulgaris</i>	Inhibidor de la bomba de eflujo
		Galato de epigallocatequina (EGCG)	Té verde	ADN girasa
		Ácido 3-p-trans-cumaroil-2-hidroxiquinico (CHQA)	<i>Cedrus deodara</i>	Daño a la membrana citoplasmática
		Sophoraflavanona B (flavonoide)	<i>Rhus verniciflua</i>	Interacción directa con peptidoglucano
	Flavonoides	Catequinas		Formar proteínas solubles y extracelulares complejas para unirse a la pared celular bacteriana.

				Alteran las membranas celulares.
	Taninos	Procianidinas	hojas, raíces y tallos	Inactiva enzimas y las proteínas transportadoras de la envoltura celular
	Quinonas	Hipericina		Complejo con pared celular
				Inactivación de enzimas
				Inactivación y pérdida de funciones proteicas bacterianas
				Toxicidad a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).
Alcaloides		Piperina	<i>Piper nigrum</i> y <i>Piper longum</i>	Inhibidor de la bomba de eflujo
		Berberina	<i>Berberis</i>	Inhibidor de la división celular debido a la inhibición de la proteína de división celular FtsZ, inhibidor de la síntesis de proteínas y ADN
		Tomatidina	Tomate, la papa y la berenjena	Inhibidor de la ATP sintetasa
Compuestos Organosulfurados		Alicina	<i>Allium sativum</i> (ajo)	Inhibidor de la síntesis de proteínas y ADN
		Sulforafano	<i>Diploaxis harra</i>	Destrucción de la membrana bacteriana, Inhibidor de la ATP sintetasa, ADN e inhibidor de la síntesis de proteínas
		Allyl ITCs (AITCs)	<i>Aarmoracia rusticana</i>	Daña la integridad de la pared celular
Glucósidos	Saponinas	Sarsapogeninas	Yuca	Permeabilización de la membrana
Aceites Esenciales	Aceites		flores, raíces, cortezas, hojas, semillas, frutas y madera	Alteración de la membrana citoplasmática
				La interrupción del flujo de electrones
	Terpenos		Farnesol	Alteración de la membrana celular
			Carvacrol	Inhibición de la bomba de eflujo.
Terpenoides		Capsaicina		Disrupción de membrana

Continuamente se siguen analizando plantas medicinales a través de diferentes métodos biológicos, entre las que se destaca el método de difusión en disco (DDM) o también llamado método de Kirby Bauer.

2.5 Método de difusión en disco (Kirby Bauer)

El método de difusión en disco (DDM), se conoce como método de difusión en agar (ADM) o simplemente, método de difusión en disco de agar, es uno de los métodos más flexible para analizar la susceptibilidad de los microorganismos frente a los agentes antimicrobianos (extractos de plantas, compuestos aislados y fármacos cotidianos). La prueba fue desarrollada en 1940 y publicada por Bauer y sus compañeros en 1966. Actualmente es el método oficial

utilizado en muchos laboratorios de microbiología clínica, para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de rutina (Balouiri et al., 2016; Horváth et al., 2016).

El método descrito por Bauer estandarizo las variables de: tamaño del disco, tamaño del inóculo, temperatura, tiempo de incubación y los resultados se reportaban cualitativamente como; susceptibles, intermedios o resistentes, sin embargo, el método descrito por Bauer, ha sido ampliado y mejorado continuamente por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) en los Estados Unidos. En este procedimiento, las placas de agar (placa de 150 mm de diámetro) se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. Posteriormente, sobre la superficie del agar que tiene al microorganismo antagónico se colocan discos de papel de filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro), impregnados con una concentración estandarizada de un agente antimicrobiano, después de ello las placas de agar se incuban en condiciones adecuadas. Posterior a la incubación, si los antimicrobianos son eficaces, se desarrolla una zona de inhibición alrededor del disco de papel filtro, midiéndose los diámetros de la presencia o ausencia de una zona de inhibición alrededor de los discos. El diámetro de la zona de inhibición, describe la potencia antimicrobiana (Balouiri et al., 2016; Horváth et al., 2016; Tenover et al., 2012; Christenson et al., 2012).

2.6 *Byrsonima crassifolia*

En México existen diversas especies frutícolas nativas y uno de estos frutales es el nanche, *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Roque et al., 2012). El nanche es un árbol o arbusto, de la familia botánica de las Malpigiáceas, se encuentra distribuido en las zonas subtropicales de México, el vocablo nanche proviene del náhuatl *nanzinxócotl* que significa fruto ácido de las madres o ancianas. Incrementado su uso debido a que se utiliza como alimento en este caso la variedad de fruto dulce, medicina herbolaria de las hojas y corteza, los árboles para reforestar áreas con suelos pobres y forrajeo (Moreno, 2015; Medina-Torres et al., 2012; Martínez-Vázquez et al., 1999). El nanche presenta una amplia distribución geográfica, se encuentra en toda la zona tropical que va desde el sur de Tamaulipas, este de San Luis potosí, Veracruz, Tabasco, Yucatán y Quintana Roo, en el vértice del golfo, Sinaloa, Nayarit, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, en el vértice del pacífico (Moreno, 2015).

2.6.1 Características biológicas

El nanche (*Byrsomina crassifolia*), es un árbol pequeño hasta de tres metros de altura con un tronco tortuoso y puede ramificarse desde el suelo. La corteza externa es agrietada y escamosa, se desprende en placas rectangulares, su color es desde un gris parda a moreno claro, en el interior es de color crema rosado, fibrosa y amarga. Las hojas son decusadas simples, aovadas a elípticas, son de color verde oscuro y casi glabras en el haz y presentan abundantes tricomas en el envés (Medina-Torres et al., 2012). Se han reportado una gran variabilidad en el tamaño, forma y color de fruto, así como sabor y consistencia de la pulpa (Medina-Torres et al., 2004). Estas diferencias son utilizadas para clasificar a los cultivos del nanche, con base en el sabor del fruto se distinguen tres grupos: dulce, ácido y agridulce, sin embargo, esto va cambiando a medida que el cultivo ha sido domesticado; reportándose la variedad silvestre denominada “changunga”, presentando frutos con sabor ácido y la variedad domesticada denominada “nanche” presentando frutos de sabor dulce (Bayuelo-Jiménez et al., 2006; Medina-Torres et al., 2004).

En un estudio realizado por el grupo de investigación de Microbiología de la UNPA, Zúñiga-Sierra, (2019), reportó un estudio sobre las características fenotípicas y un mapa de distribución de *Byrsomina crassifolia* en el municipio de Tuxtepec, Oaxaca. Reportó que la mayoría de los árboles evaluados (90%) son semisilvestres, también mencionó que las colonias más urbanizadas tenían en su mayoría árboles con frutos dulces, mientras que las zonas periurbanas, primordialmente tenían árboles de frutos ácidos. Indicó que, en congruencia con lo reportado por Raya-Pérez et al., (2010) y Bayuelos-Jiménez et al., (2006), los descriptores morfométricos como el largo de las hojas, ancho de las hojas, tipos y partes de las hojas no proporcionan elementos para discriminar entre nanche dulce y ácido, los únicos parámetros que mostraron diferencia entre la variedad dulce y la variedad ácida, fueron, el peso de las hojas y el diámetro de las hojas. Siendo mayores ambas características para el árbol con frutos ácidos.

2.6.2 Usos medicinales y actividad biológica

El nanche es utilizado en las regiones de México, América central y Sudamérica desde la época precolombina. Fue utilizado en la medicina tradicional por diversos grupos étnicos de México como: los nativos Mixe de Oaxaca y los Zoques, Tzeltal y Tzotzil de Chiapas; aún hoy en día, se

encuentra entre las diez plantas más utilizadas para trastornos gastrointestinales en el estado de Oaxaca, como tratamiento de diarrea y disentería, para inducción del parto, para el flujo vaginal y el tratamiento de estomatitis (Martínez-Vázquez et al., 1999). En diferentes regiones de la península de Yucatán se ha descrito el uso de las hojas y la corteza para el tratamiento del dolor de dientes, vaginitis, diarrea, bronquitis y asma. En Centroamérica, se han utilizado para el tratamiento de trastornos inflamatorios, también se han utilizado para el tratamiento de resfriados, infecciones cutáneas y mordeduras de serpiente (Muñiz-Ramírez et al., 2014). Tradicionalmente, se consume vía oral por la decocción en agua de la corteza o las hojas. La decocción de la corteza del árbol, se vende en los mercados regionales de México, con las siguientes indicaciones: facilitar la digestión, limpiar el estómago, estimular el apetito, “purgar el vientre de la mujer tras el parto”, inducir la secreción y “dar fortaleza a la mujer” (Moreno, 2015).

Por lo tanto, gracias a los reportes de la medicina tradicional, acerca de las propiedades curativas de las diferentes partes del árbol de *B. crassifolia*, ha surgido el interés de realizar estudios científicos para verificar las distintas actividades biológicas que se les atribuyen. Se ha reportado que los extractos de la hoja tienen actividad antioxidante, antifúngica, actividad fotoquimioprotectora contra el estrés oxidativo de la piel inducida por la radiación UVB, los aceites de hoja presentan actividad antimicrobiana (Roldan Sabino et al., 2018; Souza et al., 2018; Souza et al., 2017; Vazquez- Cahuich et al., 2013; Cáceres et al., 1993). Las semillas tienen efectos hipoglucémicos debido a lactonas sesquiterpénicas, actividad antiviral contra el virus del herpes simple, efectos antidepresivos, actividad antiinflamatoria, efectos antihiperoglucémicos y antihiperlipidémicos en fruta y semilla, efecto antiproliferativo del fruto, efecto antioxidante contra radicales de oxígeno y nitrógeno, efecto protector contra radicales peróxido (ROO) en eritrocitos humanos, actividad antimicrobiana de la semilla y del fruto, efecto de curación de heridas del fruto y semillas (Gutiérrez y Ramírez, 2016; Moreno, 2015; Mariutt et al., 2014; Muñiz-Ramírez et al., 2014; Pío-León et al., 2013; Muniz-Ramírez et al., 2013; Pérez-Gutiérrez y Muñiz-Ramírez, 2013; Herrera-Ruiz et al., 2011; Pérez- Gutiérrez et al., 2010; López et al., 2001). Actividad antimicrobiana en tallos y raíces (Martínez-Vázquez et al., 1999). Actividad antimicrobiana en corteza y actividad antiinflamatoria (Maldini et al., 2009; Rivero-Cruz et al. 2009; Cáceres 1990).

3. ANTECEDENTES

3.1 Actividad antimicrobiana en *Byrsonima crassifolia*

Se han hecho estudios de la actividad antimicrobiana de las diferentes partes del árbol *B. crassifolia*, sin embargo, no existe puntualización si el material biológico es de la variedad de frutos dulces o ácidos. Fuentes etnobotánicas mencionadas por Medina-Torres et al., (2012), mostraron que entre las plantas más usadas para tratamientos gastrointestinales esta *Byrsonima crassifolia*. Fue examinada in vitro junto con otras plantas contra cinco enterobacterias patogénicas al hombre: *Escherichia coli* (infecciones urinarias y diarreas), *Salmonella enteritidis* (fiebre tifoidea), *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri* (disentería) y la planta que mostró mayor actividad antimicrobiana fue *Byrsonima crassifolia*.

Como se mencionó, se han reportado estudios sobre la actividad antimicrobiana de las raíces, tallos, frutos y semillas del árbol de *B. crassifolia*. Algunos de estos reportes se aprecian en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana en *Byrsonima crassifolia*.

Parte de la planta	Tipo de extracto	Actividad	Referencia
Corteza	Extracto hidroetanólico por maceración	Inhibición de <i>Escherichia coli</i> enteropatógeno, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i>	Caceres et al., 1990
Raíces y Tallos	Extracto hexánico, acetato de etilo y metanol por maceración	Los extractos de acetato de etilo de raíces y tallo, y los extractos metanólicos de raíces fueron efectivos contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Micrococcus luteus</i>	Martínez-Vázquez et al., 1999
Las semillas del fruto	Extracto de hexano por maceración	Inhibición de <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778, <i>B. megaterium</i> ATCC 12872, <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>Sarcinia lutea</i> ATCC 9341. Gram negativas: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>Salmonella paratyphi</i> ATCC 6539, <i>S. typhi</i> ATCC 43971, <i>Shigella boydii</i> ATCC 9207, <i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313, <i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33654, <i>V. parahemolyticus</i> ATCC 43996.	Muñiz-Ramírez et al., 2014

Frutos	Extracto hexánico, clorofórmico y metanólico por maceración	Inhibición de <i>Streptococcus</i> A-3, <i>Streptococcus</i> A-4, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212, <i>Staphylococcus aureus</i> 1, <i>Staphylococcus aureus</i> 2, <i>Staphylococcus aureus</i> 3, <i>Staphylococcus aureus</i> 4, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, <i>Escherichia coli</i> A011, <i>Escherichia coli</i> A019, <i>Escherichia coli</i> A055, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Salmonella</i> grupo A-1, <i>Salmonella</i> grupo A-2, <i>Salmonella</i> grupo PDY A-1, <i>Salmonella</i> grupo B, <i>Salmonella</i> grupo D <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Píon-León et al., 2013
Corteza	Extracto metanólico y partición soluble en diclorometano por maceración	Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> 327, <i>Escherichia coli</i> ipm 389, 442, ATCC, <i>Klebsiella pneumoniae</i> 425, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 339, <i>Candida albicans</i> 54, <i>Staphylococcus aureus</i> 375, 310, ATCC. <i>Enterococcus faecium</i> 379, <i>Phorphyromonas gingivalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	Rivero-Cruz et al., 2009

En el caso de las raíces, al ser usadas limitan la utilización del árbol completo. Los frutos y semillas también son limitados, debido a la producción que se tiene a nivel comercial, también debido a que el fruto solo se obtiene por temporada. Existen otros órganos que forman parte del árbol, como la hoja y la corteza, los cuales se encuentran en abundancia, siendo escasos los estudios de actividad antimicrobiana.

Las investigaciones que se han realizado han sido en partes del árbol de *B. crassifolia*, sin ser indicado de que variedad provienen los materiales biológicos de los antecedentes. Los extractos de los estudios mencionados en la Tabla 4 fueron obtenidos por métodos de maceración tradicional, por lo que resulta interesante determinar la actividad antimicrobiana en hojas y corteza del árbol de variedad fruto ácido usando un método de extracción por ultrasonido y prensado.

4. JUSTIFICACIÓN

Los árboles *Byrsonima crassifolia* de fruto dulce son una alternativa de producción frutícola, por ello son sujetos a la explotación comercial. Aunque las investigaciones muestran que existe actividad antimicrobiana de extractos orgánicos de raíces y tallos del árbol (Martínez-Vázquez et al., 1999), el uso de raíces limita la utilización del árbol completo. Muñiz-Ramírez et al., (2014), realizó una investigación sobre el efecto antimicrobiano de semillas del fruto, obteniendo el diterpeno 1 del extracto de semillas del fruto, indicando una posible aplicación a futuro, sin embargo, esta opción está limitada no solo porque la producción que el fruto tiene a nivel comercial, también porque solo se obtiene por temporada.

En el municipio de San Juan Bautista Tuxtepec se encuentran ambas variedades, la variedad con frutos ácidos esta subutilizada, por lo que el objetivo de este trabajo es determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia* de frutos ácidos para darle un valor agregado.

5. HIPÓTESIS

Se ha reportado actividad antimicrobiana en diversas partes que conforman el árbol de *B. crassifolia* de fruto dulce y dado que no existen diferencias anatómicas considerables, con respecto con los árboles de fruto ácido es posible que éstos, también contengan metabolitos, con actividad antimicrobiana.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo principal

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia* variedad fruto ácido.

6.2 Objetivos secundarios

- Obtener tres extractos con diferente polaridad tanto de hoja como de corteza de *B. crassifolia* variedad fruto ácido por el método de ultrasonido.
- Obtener un extracto etanólico de hoja y corteza por el método extracción asistida por ultrasonido y prensado (UPAE)
- Determinar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos por el método de difusión en agar (Kirby Bauer).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diagrama experimental

En la Figura 1, se muestra el diagrama de la estrategia experimental de este estudio, presentando en orden cada uno de los métodos empleados para llevar a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas y corteza del árbol de *Byrsonima crassifolia*.

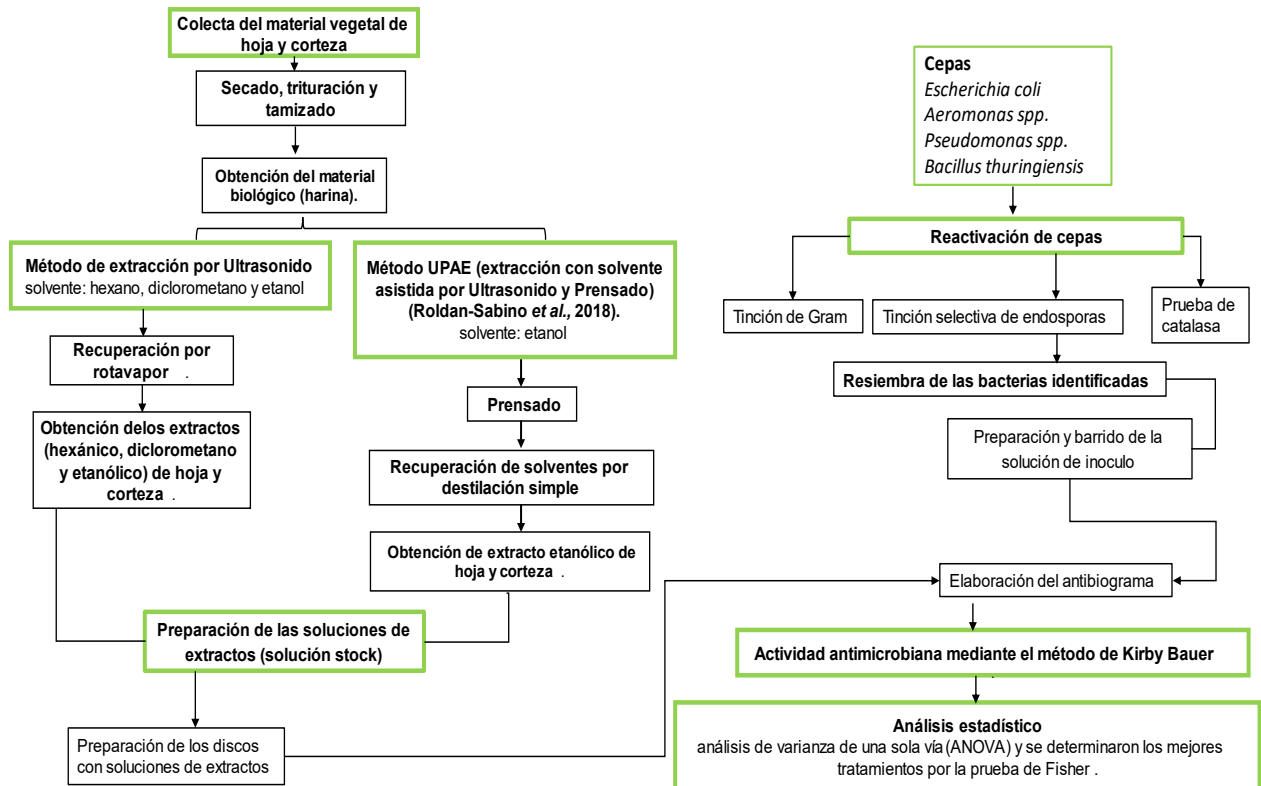


Figura 1. Diagrama general de la estrategia experimental. Del lado izquierdo se muestra el procesamiento del material biológico hasta la preparación de los discos y del lado derecho se muestran los procesos de reactivación.

7.2 Material biológico

Se colectaron muestras de las hojas y corteza del árbol de *Byrsonima crassifolia*, ubicado en las inmediaciones de la Universidad del Papaloapan campus Tuxtepec, Oaxaca con las coordenadas 18.014107, -96.166519 (Figura 2). La colecta se realizó durante la época de fructificación del árbol durante el mes de agosto del 2016 y del 2017.



Figura 2. Mapa de ubicación de *B. crassifolia*. El punto rojo muestra la ubicación del sitio de colecta del material vegetal (Google Earth).

Se cortaron ramas de aproximadamente 30 cm de largo y se apartaron las hojas en buen estado (Figura 3 B). Después de la selección, se pesaron y se colocaron en una malla de plástico, distribuyéndose para su secado. El secado de las hojas (Figura 3 A), se realizó mediante aire forzado natural, con un flujo de $0.0103 \text{ m}^3/\text{s}$ por aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente de $30 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Roldan-Sabino et. al., 2018).

La corteza de las ramas se desprendió con ayuda de un objeto punzocortante, obteniéndose segmentos pequeños de corteza que se pesaron y se secaron de la misma manera (IDEM) que las hojas, durante un tiempo de 24 horas (Figura 3 C).

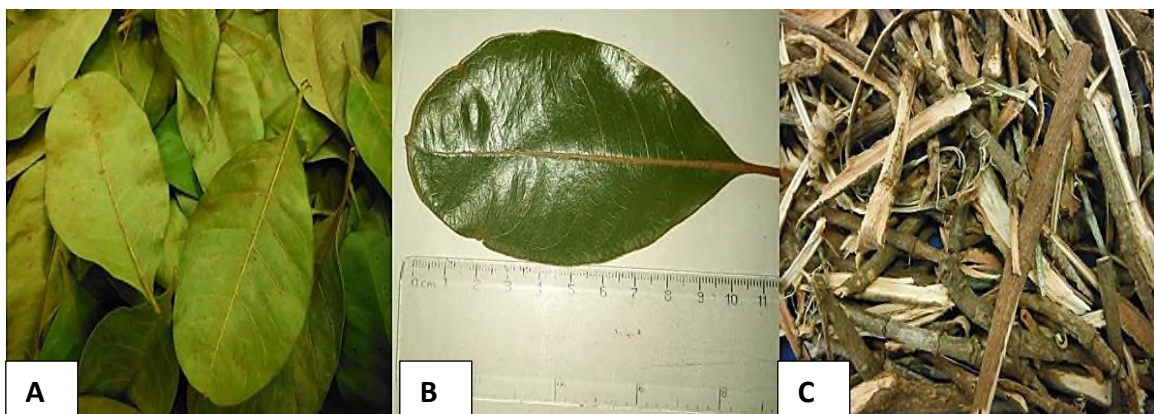


Figura 3. A) Hojas secas, B) Hojas seleccionadas en buen estado y C) Segmentos de corteza.

Posteriormente, las hojas y la corteza ya secas se pesaron nuevamente, obteniendo la humedad del material biológico con la fórmula 1, 2 y 3. La hoja obtuvo una humedad de 104.25% y la corteza 129.23%. Ambos materiales se trituraron (Figura 4 A) y se molieron por separado en una licuadora industrial. Posteriormente, se tamizaron por separado con una criba de 6.5 hilos/cm (0.5 mm). Las harinas obtenidas se pesaron y almacenaron para su posterior uso, en bolsas selladas y protegidas de luz y humedad a temperatura ambiente como se observa en la Figura 16 B y C (Roldan-Sabino et al. 2018).

$$\text{Humedad\%: } \frac{P_{\text{agua muestra}}}{P_{\text{seco muestra}}} \times 100 \quad (1)$$

$$P_{\text{agua muestra}}: P_{\text{recipiente + muestra húmeda}} - P_{\text{recipiente + muestra seca}} \quad (2)$$

$$P_{\text{seco muestra}}: P_{\text{recipiente + muestra seca}} - P_{\text{recipiente}} \quad (3)$$

P: peso

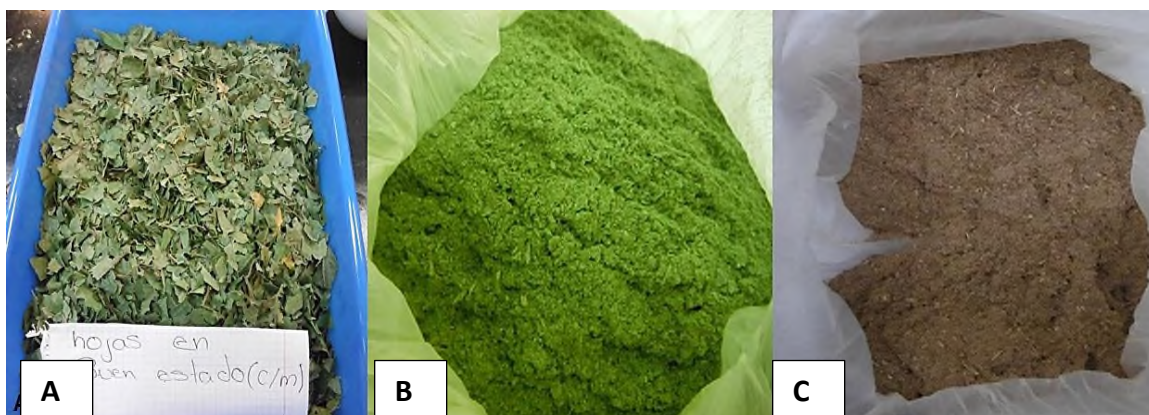


Figura 4. Harinas obtenidas de hoja y corteza de *B. crassifolia*. A) Hojas trituradas B) Harina de hoja molida, C) Harina de corteza molida.

7.3 Obtención de extractos de *B. crassifolia*

Se obtuvieron extractos de hoja y corteza utilizando dos métodos de extracción: el método de extracción por ultrasonido (UE) y el método Ultrasound assisted extraction and pressing (UPAE), (Roldan-Sabino et al. 2018). El método de extracción UPAE en un estudio previo del grupo de trabajo. Se demostró que favorece la cantidad de sólidos totales extraídos sin afectar la actividad antioxidante de los compuestos extraídos. Sin embargo, no se sabe si tendrá el mismo efecto sobre la extracción de compuestos con actividad antibiótica por lo que es necesario revisar si existen diferencias entre el método de extracción UPAE con respecto del UE.

7.3.1 Extracción por Ultrasonido (UE)

La harina de hojas se dividió en cuatro partes en matraces Erlenmeyer de 250 ml, a los cuales se les añadió disolvente en cada matraz (proporción 1:4 p/v), se pesaron 37 g de harina y se le añadió 150 ml del solvente por cada parte. Para la harina de corteza se agregaron 86.5 g y se añadieron 300 ml de solvente en una sola parte (porción 1:3 p/v). El orden de los disolventes fue el siguiente: hexano, diclorometano y etanol. En cada caso, la mezcla se sonicó como se aprecia en la Figura 5 A, durante 10 minutos con 5 minutos de descanso para controlar el aumento de la temperatura, esto se repitió hasta un tiempo de sonicación de 40 minutos a temperatura de entre 30 a 32 °C (Rojas et al., 2019). Inmediatamente, los 4 lotes se filtraron a través de papel filtro Whatman número 1 y un embudo, la solución se recuperó en un matraz bola previamente pesado y se concentró en rotavapor (Muñoz et al., 2015) como se muestra en la Figura 5 B y C, usando las condiciones descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones del rotavapor para el secado de los extractos.

Material vegetal (harina)	Solventes	Temperatura (°C)	Presión (mbar)	Tiempo (minutos)
Hoja	Hexano	40	264	40
	Diclorometano	40	850	40
	Etanol	30	97	30
Corteza	Hexano	40	264	40
	Diclorometano	40	850	40
	Etanol	30	97	30

El bagazo de los cuatro lotes se secó para evaporar el residuo del solvente y posteriormente fue sometido a extracción, secuencialmente, con cloruro de metilo y con etanol, repitiendo el procedimiento ya descrito. Al final del proceso, se pesaron los matraces balón con el extracto y se recuperaron los extractos, añadiéndoles 2 ml del solvente respectivo. Los extractos se pasaron a frascos ámbar y se almacenaron protegidos de la luz a 4 °C, para su posterior uso. El rendimiento de cada extracción se calculó con la siguiente fórmula (4):

$$\% \text{ Rendimiento: } \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso inicial de la harina}} \times 100 \quad (4)$$

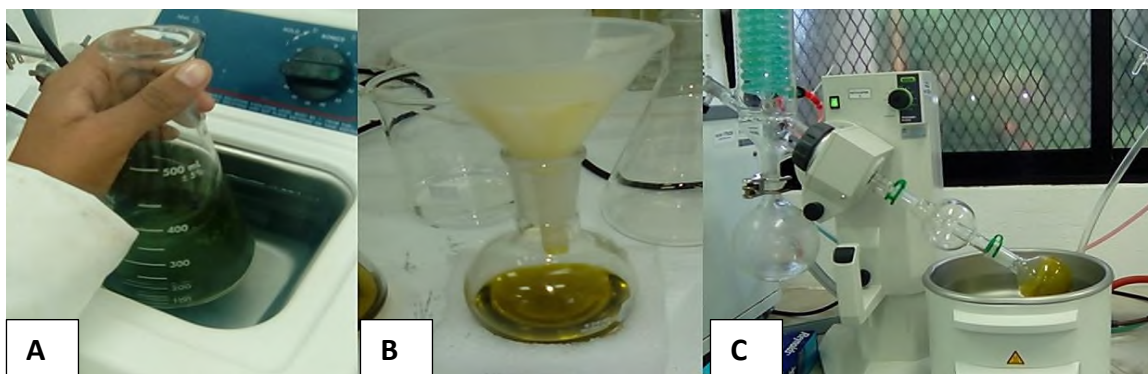


Figura 5. Obtención de extractos de *B. crassifolia*: A) Sonicación, B) Filtración y C) Concentración de los extractos.

7.3.2 Extracción Asistida por Ultrasonido y Prensado (UPAE)

Para la obtención de extractos etanólicos de hoja o corteza se utilizó el método UPAE propuesto por Roldan-Sabino et al. (2018). En el que, a 4 g de la harina de hoja o corteza, se le añadieron 16 ml de etanol, (proporción 1:4 p/v harina /etanol), este proceso se hizo por triplicado para hoja y corteza. Posteriormente, la mezcla se sometió a sonicación en un baño ultrasónico (limpiador ultrasónico BAKU BK-3550) por un tiempo de 20 minutos a temperatura ambiente por etapas de 5 minutos para controlar el aumento de la temperatura (Figura 6 A). A continuación, se realizó la separación por prensado en el cual el producto de extracción se recuperó usando un proceso de prensado con una jeringa de vidrio de 50 ml y un filtro de tamaño de poro fino de 6.5 hilos/cm (0.5 mm). Una vez filtrado el producto de extracción de hoja o corteza en un matraz balón, este se llevó a un kit de destilación simple (GL207, GLASSCO, MEXICO). El extracto se concentró a través de la evaporación del solvente (Figura 6 B). Ya obtenido el extracto se recuperó y se secó a 50 °C por 12 horas a peso constante y se obtuvo el rendimiento de sólidos extraídos, el cual se calculó usando la fórmula (4).

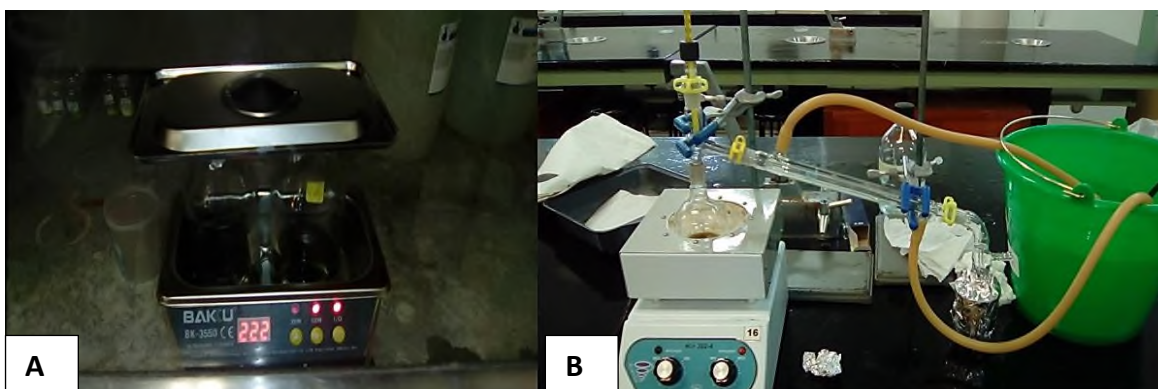


Figura 6. A) Sonicación y B) Destilación del producto extraído.

7.4 Reactivación de cepas

Se utilizaron cepas de *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Bacillus thuringiensis*, estos microorganismos no fueron adquiridos a través de la American Type Collection (ATCC). Las cepas se reactivaron por resiembra en los medios de cultivo Agar Nutritivo (AN) y Luria Bertani (LB) y se realizaron algunas pruebas para verificar la identidad y pureza del inóculo. Entre ellas la tinción de Gram observada a 100 X (Rodríguez y Arenas 2018; Coico, 2005), tinción de esporas con verde malaquita observada a 100 X (Ragazzo-Sánchez et al., 2011)., pruebas de catalasa en tubo para cada una de las bacterias y resiembra de la bacteria *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*, en medio Eosina y Azul de Metileno (EMB) para la identificación.

7.5 Actividad antimicrobiana (Kirby-Bauer) de extractos de *B. crassifolia*.

La actividad antimicrobiana se realizó por el método de Kirby-Bauer (Bauer, 1966) con algunas modificaciones (Rodríguez et al. 2018).

7.5.1 Preparación de las soluciones de extractos (solución stock)

De cada uno de los extractos de hoja y corteza se prepararon soluciones de la siguiente manera: se añadieron 10 mg de extracto y 1 ml de etanol al 95%. Las soluciones se almacenaron (protegiéndolas de la luz a 4° C) para su posterior uso.

7.5.2 Preparación de los discos

Para la preparación de los sensi-discos se utilizaron discos de papel filtro 1 de un diámetro de 5 mm, etiquetados con su respectiva muestra, a cada disco se le añadió la cantidad de 70 µl de solución stock (10 mg/ml) de extracto de hoja o corteza correspondiente. También se prepararon los sensi-discos de control positivo con solución de Gentamicina de la cual se añadieron 6 µl para una concentración final de 10 µg/disco y se prepararon sensi-discos de control negativo de etanol al 95% añadiendo 7 µl, Soporte + Etanol Evaporado, SEE (Rodríguez et al. 2018; Bauer, 1966).

7.5.3 Preparación y barrido de la solución de inóculo

De cada una de las bacterias empleadas se preparó una solución de inóculo microbiano, añadiendo una azada de cada una de las bacterias en 1.2 ml de solución salina. De la solución de

inóculo se añadieron 100 μ L en una celda y se leyó en el espectrofotómetro UV-VIS (GENESYS modelo 10S) a 600 nm ajustando la D.O a 0.5. Posteriormente, se realizaron barridos de las soluciones del inóculo de las respectivas bacterias, efectuados de la siguiente manera: se retiraron 100 μ L de solución de inóculo y se adicionaron en una caja Petri con 20 ml de medio sólido dependiendo la bacteria, haciéndose un barrido en todo el medio (Rodríguez et al. 2018; Bauer, 1966).

7.5.4 Ensayo de Kirby Bauer

Una vez listo el barrido se montaron los discos con soluciones de cada extracto, añadiendo 4 discos más un disco con Gentamicina (control positivo) y otro con etanol al 95% (control negativo). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada bacteria. Las cajas se incubaron durante 24 a 36 h a 37 ± 0.5 °C (Rodríguez et al. 2018; Bauer, 1966).

7.5.5 Lectura e interpretación de resultados

Una vez cumplido el tiempo de incubación se observó la presencia de los halos de inhibición. La lectura de los halos de inhibición se realizó midiendo el diámetro (mm) con un calibrador digital Vernier. La interpretación de los resultados del antibiograma se reportó como actividad antimicrobiana de los extractos de acuerdo al diámetro del halo de inhibición.

7.6 Análisis estadístico.

El análisis de las diferencias entre las medias de diámetro de los halos de inhibición se realizó por el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), donde se determinaron los mejores tratamientos mediante la prueba de Fisher usando el programa MINITAB 16.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Reactivación de cepas

Los microorganismos utilizados en la presente investigación no fueron adquiridos a través de la American Type Collection (ATCC), sin embargo, fueron previamente identificados y caracterizados en sus sensibilidades a antibióticos por parte del grupo de trabajo. Previo a su uso se realizaron algunas pruebas de caracterización parcial, con el fin de corroborar la identidad y adicionalmente asegurarse de trabajar con un cultivo axénico. Los resultados de esta actividad se muestran en la Tabla 6 y la Figura 7. Las muestras de *Escherichia coli*, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.*, mostraron únicamente bacilos Gram negativos (Figura 7 A, B, C). En el caso de la bacteria *Bacillus thuringiensis* se corroboró la presencia de esporas, como se muestra en la Figura 7 D (Bozzetta et al., 2017). También se realizó la prueba catalasa para cada una de las bacterias, como se observa en la Tabla 6 solo dos bacterias dieron positivo en burbujas de oxígeno, *Bacillus thuringiensis* y *Aeromonas spp.*, estos resultados concuerdan con Bozzetta et al., (2017) y Castro-Escarpulli et al., (2002). Para la confirmación de identidad de *Escherichia coli* y *Pseudomonas spp.*, se realizó una resiembra en medio EMB. *E. coli* presentó las siguientes características morfológicas: colonias grandes, un tono rosa púrpura en las colonias y no presentando el característico verde metálico, por tratarse de una cepa DH5- α . *Pseudomonas spp.*, presento: colonias irregulares y un tono incoloro, esto de acuerdo a lo reportado por Becton Dickinson, (2013).

Tabla 6 . Caracterización parcial de las bacterias empleadas.

Bacteria	Tinción de Gram	Tinción de Esporas (Verde Malaquita)	Prueba Catalasa
<i>Escherichia coli</i>	Negativa	Negativa	Negativa
<i>Aeromonas spp.</i>	Negativa	Negativa	Positiva
<i>Pseudomonas spp.</i>	Negativa	Negativa	Negativa
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Positiva	Positiva	Positiva

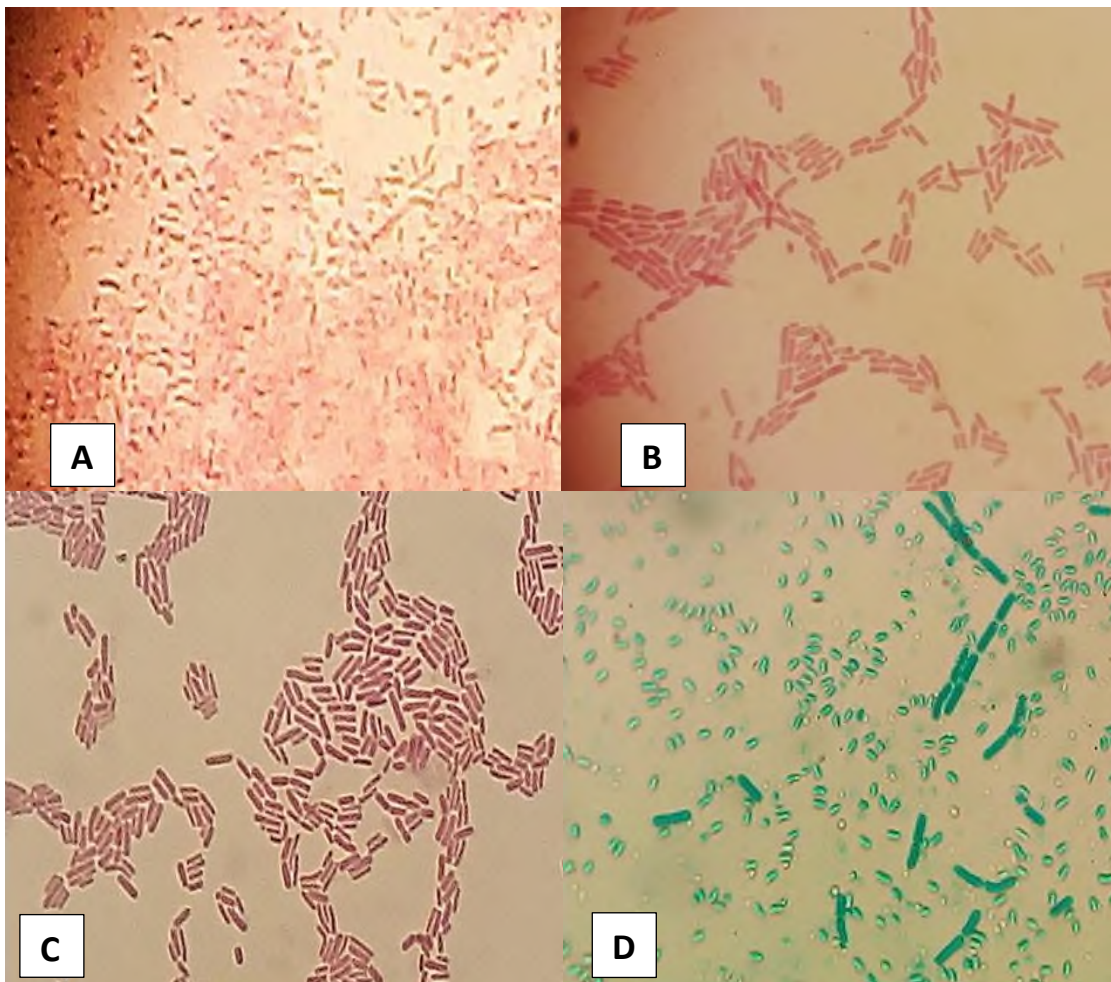


Figura 7. Resultados de las pruebas de tinción de Gram de las bacterias empleadas. Se muestran las bacterias tras la tinción de Gram: A) *Escherichia coli* (negativa), B) *Aeromonas spp.* (negativa), C) *Pseudomonas spp.* (negativa). D) *Bacillus thuringiensis* tinción de las esporas con verde malaquita. Aumento 100X.

En el grupo de trabajo se realizó previamente un ensayo sobre la sensibilidad a antibióticos de *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis*, dos de las bacterias empleadas en este trabajo. En el caso de *Escherichia coli* mostró sensibilidad en todos los antibióticos utilizados como se observa en la Tabla 7, mientras que *Bacillus thuringiensis* presentó sensibilidad a los antibióticos Clindamicina, Eritromicina, Gentamicina y Claritromicina, mostró resistencia a Ceftriaxona y Ampicilina como se aprecia en la Tabla 7.

Tabla 7. Caracterización de la sensibilidad a algunos antibióticos de *Escherichia coli* y *Bacillus thuringiensis*

Antibióticos	<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus thuringiensis</i>	
	Diámetro de inhibición (mm)	Categoría	Diámetro de inhibición (mm)	Categoría
Clindamicina	22.02	+	34	+**
Eritromicina	21.78	+	23.86	+
Gentamicina	34.77	+	23.86	+
Claritromicina	28.16	+*	21.66	+*
Ceftriaxona	42.19	+	9.8	+++***
Ampicilina	58.88	+	11.73	+++

+ = sensible (≥ 20 mm); ++ = intermedio (15-20 mm); +++ = resistente (≤ 15 mm).

*: Considerados inherentemente resistentes; **: Considerados sensibles, aunque a la fecha no se han encontrado antecedentes bibliográficos; ***: considerados resistentes por el diámetro del halo, aunque no existen reportes.

8.2 Obtención de extractos de *B. crassifolia*

Los resultados del rendimiento de cada uno de los extractos obtenidos por el método de extracción por ultrasonido (UE) y el método de extracción asistida por ultrasonido y prensado (Ultrasound assisted extraction and pressing) UPAE, se muestran en la Tabla 8. Es importante mencionar que no se efectuaron promedios, desviaciones, tampoco un análisis estadístico de los rendimientos, debido a que solo se obtuvo una extracción con cada uno de los disolventes empleados, para determinar cuál era más eficaz. Realizándose solo un cálculo de rendimiento, obteniendo como resultado los datos que se encuentran en la Tabla 8. En los extractos obtenidos por el método de UE, el extracto que obtuvo mayor rendimiento de extracción fue el extracto etanólico de hoja. Como se puede observar en la Tabla 8, se obtuvieron diferentes rendimientos para los extractos de hoja. El mayor rendimiento, se obtuvo en el extracto etanólico con 4.72 %, seguido por el diclorometánico con 1.35 % y finalmente el extracto hexánico con un rendimiento menor de 0.76 %. En los extractos de corteza, el extracto etanólico obtuvo el mayor rendimiento con 2.31 %, seguido por el extracto diclorometánico y finalmente el hexánico con un rendimiento de 1.15 %. Respecto al tipo de material biológico, al comparar ambos materiales, el rendimiento del extracto etanólico y diclorometánico de la hoja fueron mayores a los de la corteza, mientras que para el extracto hexánico, el rendimiento fue mayor en el extracto de corteza.

En el extracto etanólico de hoja y de corteza obtenidos por el método de extracción UPAE, ambos extractos presentaron un rendimiento de extracción similar. Presentando ambos mayores rendimientos, a diferencia de los extractos etanólicos de hoja y de corteza obtenidos por UE.

Tabla 8. Rendimiento de los extractos de hoja y corteza obtenidos por el método UE y por el método UPAE.

Material biológico (harina)	Extractos	Tipo de extracción			
		UE		UPAE	
		Peso extracto* (g/PS)	Rendimiento ** (%)	Peso extracto (g/PS)	Rendimiento (%)
Hoja	Etanólico	7	4.72	0.2626	6.56
	Diclorometánico	2	1.35	N/D	N/D
	Hexánico	1	0.67	N/D	N/D
Corteza	Etanólico	2	2.31	0.2627	6.56
	Diclorometánico	1	1.15	N/D	N/D
	Hexánico	1	1.15	N/D	N/D

*Peso del residuo sólido

**Calculado sobre peso seco de la harina.

En general, la extracción con disolventes separa un compuesto a partir de una mezcla sólida o líquida, aprovechando las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla, por lo que podemos decir que los rendimientos obtenidos se verán influenciados por el tipo de disolvente. Sin embargo, no se puede descartar que la eficiencia de la extracción puede verse influenciada por factores como el tamaño de partícula, el cual a su vez está relacionado con el tipo de tejido vegetal. Los rendimientos obtenidos en este estudio pueden explicarse debido a las diferencias entre las partículas de harina obtenidas en cada tejido, lo cual pudo influir la interacción con el disolvente y por lo tanto la extracción de los compuestos. Las cortezas, al igual que la madera, están formadas químicamente por los componentes típicos de la pared celular: celulosa, lignina y por sustancias extraíbles, que se forman a partir del metabolismo secundario de las plantas y que contienen compuestos variados como terpenos, grasas, ceras, fenoles y azúcares, entre otros (Fengel y Wegener, 1989). En el caso de las hojas, los componentes son muy similares, excepto que la proporción de lignina es mucho menor.

8.3 Actividad antimicrobiana (Kirby-Bauer) de extractos de *B. crassifolia*.

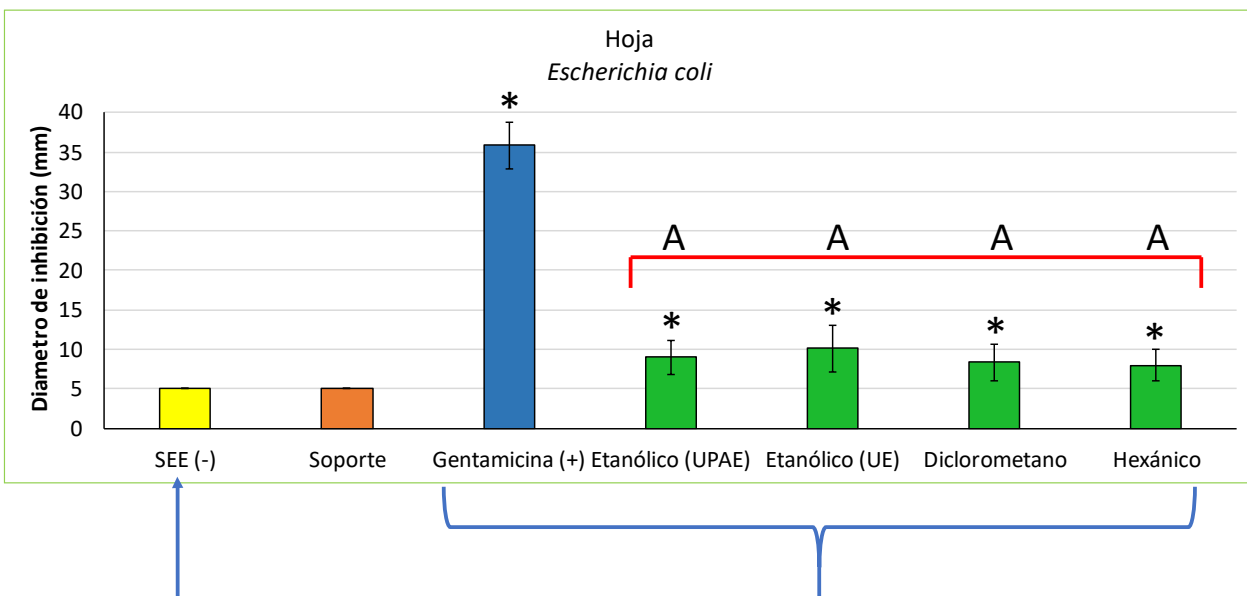


Figura 8. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *E. coli*. Todos los extractos presentaron diámetros significativamente mayores ($p \leq 0.05$) con respecto del control - (SEE). El control + (10 μg de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

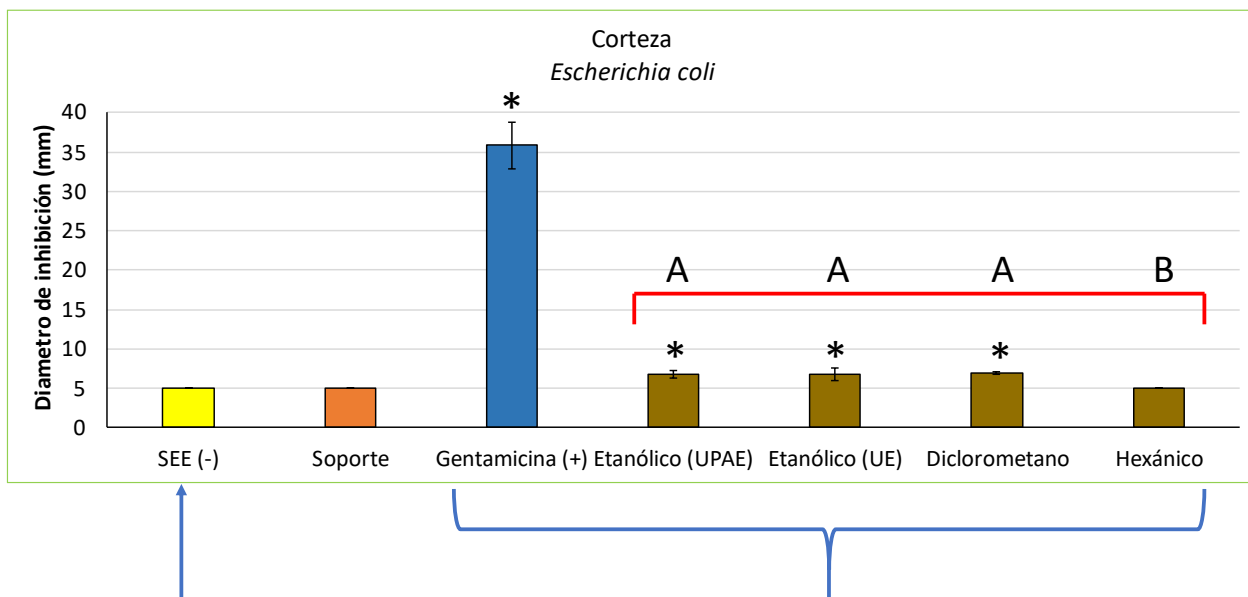


Figura 9. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *E. coli*. Todos los extractos excepto el extracto hexánico presentaron diámetros significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control- (SEE). El control + (10 μg de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

En la Figura 8, se muestra el efecto de la exposición de *Escherichia coli* a los diferentes extractos de hoja, todos los extractos presentaron diámetros significativamente mayores ($p \leq 0.05$) con respecto del control - (SEE). Los diferentes extractos no mostraron diferencias entre ellos.

Por otra parte, en la Figura 9, se muestra el efecto cuando se expuso a *Escherichia coli* a los diferentes extractos de corteza, se encontró que todos los extractos excepto el hexánico, presentaron diámetros significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control- (SEE). Los diferentes extractos no mostraron diferencias entre ellos ($p \geq 0.05$).

El efecto de los extractos crudos puede deberse tanto a la composición de estos como a la sensibilidad que presenta la bacteria por diferentes antibióticos. La cepa empleada como se muestra en la Tabla 7, fue sensible a Gentamicina, Ceftriaxona, Ampicilina, Eritromicina, Clindamicina y Claritromicina, lo que coincide con algunos autores como Cantón et al., (2000). Lo que podría relacionarse con su respuesta a los extractos, y aunque es algo interesante no podemos descartar que sea solo un comportamiento de esta cepa en particular, ya que Figueira et al., (2011), estudiaron la sensibilidad de *E. coli* reportando resistencia a Eritromicina. Li et al., (2014), reportaron la resistencia por parte de *E. coli* a Ampicilina y Gentamicina. Por lo que sería interesante evaluarlo con otras cepas, ya que si *E. coli* es particularmente sensible a los extractos de *B. crassifolia*, sería importante continuar su estudio, ya que esta bacteria es una de las principales causantes de infecciones gastrointestinales y urinarias.

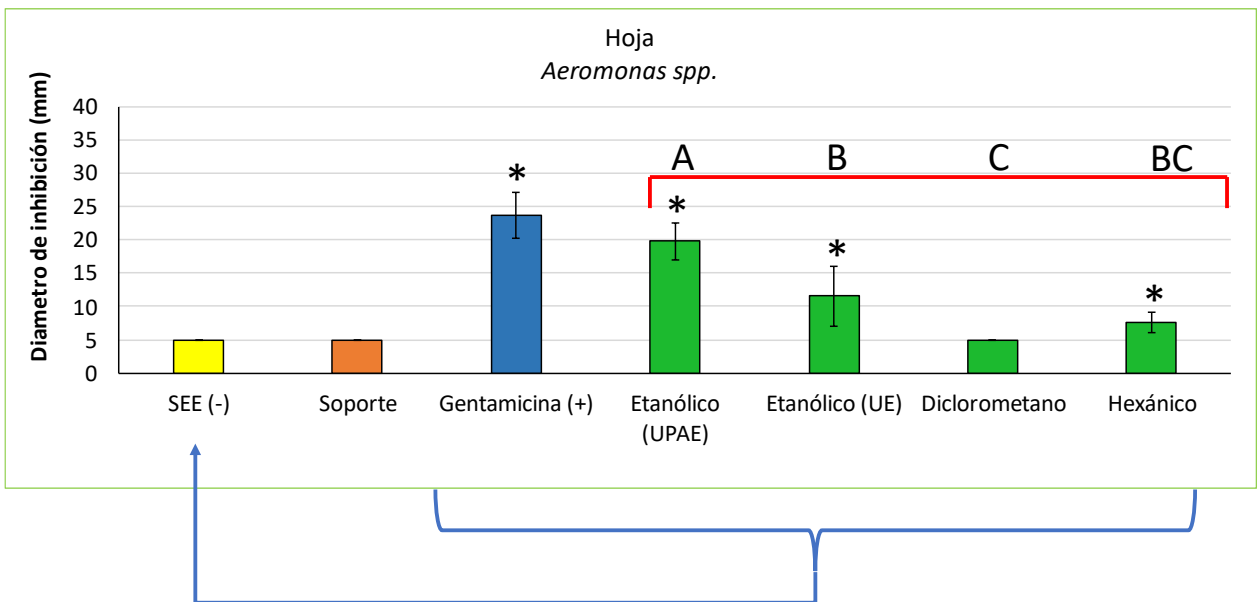


Figura 10. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Aeromonas spp.* Todos los extractos excepto el extracto diclorometánico presentaron diámetros significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control negativo (SEE). El control + ($10 \mu\text{g}$ de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos excepto el extracto etanólico UPAE.

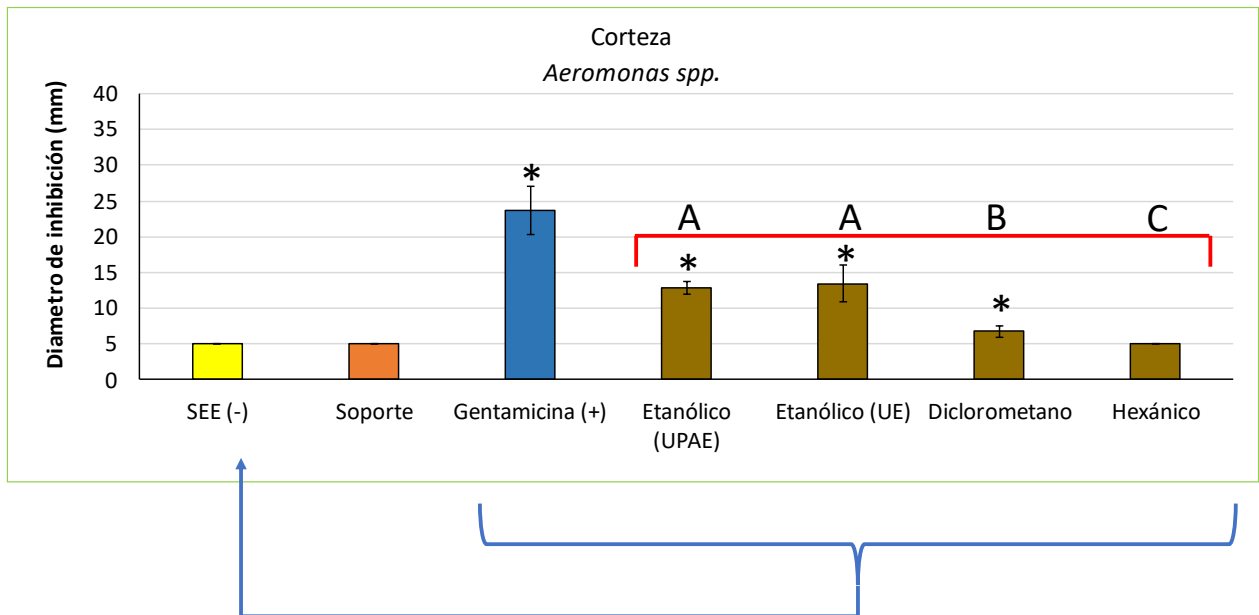


Figura 11. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Aeromonas spp.* Todos los extractos excepto el extracto hexánico presentaron diámetros significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control - (SEE). El control + ($10 \mu\text{g}$ de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

Cuando se expuso a *Aeromonas spp.*, a los diferentes extractos de hoja, todos los extractos excepto el diclorometánico, presentaron halos de inhibición significativamente mayores ($p \leq 0.05$),

con respecto del control negativo (SEE). Los diferentes extractos tuvieron un efecto diferencial, siendo mayor el efecto para el extracto etanólico UPAE ($p \leq 0.05$), seguido del extracto etanólico UE ($p \leq 0.05$) a su vez seguido del extracto hexánico ($p \leq 0.05$) como se observa en la Figura 10. Hay que destacar que, aunque el extracto hexánico muestra diferencias significativas con respecto del control negativo (SEE), no se muestran diferencias significativas con el extracto de diclorometánico ($p \geq 0.05$).

Por otro lado, cuando se expuso a *Aeromonas spp.*, a los diferentes extractos de corteza (Figura 11), se encontró que todos los extractos excepto el hexánico, presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) sobre el diámetro de los halos de inhibición con respecto del control - (SEE) de dicha bacteria. La mayor inhibición se presentó con los extractos etanólicos (UPAE Y UE), los cuales no mostraron diferencia entre ellos ($p \geq 0.05$), seguido del extracto diclorometánico ($p \leq 0.05$). Cabe destacar que el extracto hexánico no muestra diferencias significativas ($p \geq 0.05$) con respecto del control negativo (SEE).

Este efecto diferencial puede deberse tanto a la composición de los extractos como a la sensibilidad diferencial de la bacteria a cada uno de estos componentes, lo que podría dar pie a interpretar que los compuestos de polaridad intermedia y baja no muestran inhibición del crecimiento en esta bacteria en particular. Por otro lado, no existe un consenso en cuanto a la sensibilidad a *Aeromonas*, ya que se ha reportado que es común observar diferencias en la resistencia a los distintos fármacos debido a la expresión de los diferentes mecanismos de resistencia (Yi et al., 2014). Por otro lado, aunque la bacteria usada en este estudio no fue caracterizada hasta especie, lo que dificulta la discusión, esta si fue sensible a Gentamicina en nuestros experimentos, lo que coincide con el autor Figueira et al., (2011). Perretta et al., (2019), estudiaron la sensibilidad de *Aeromonas* aislada de peces, lo que coincide con la bacteria empleada en este estudio y ellos reportan un 100% de sensibilidad a Enrofloxacin, y resistencia a Ampicilina, aunque algunos autores como Bello-López et al., (2019), mencionan que el género en un gran número de especies es multirresistente a antibióticos.

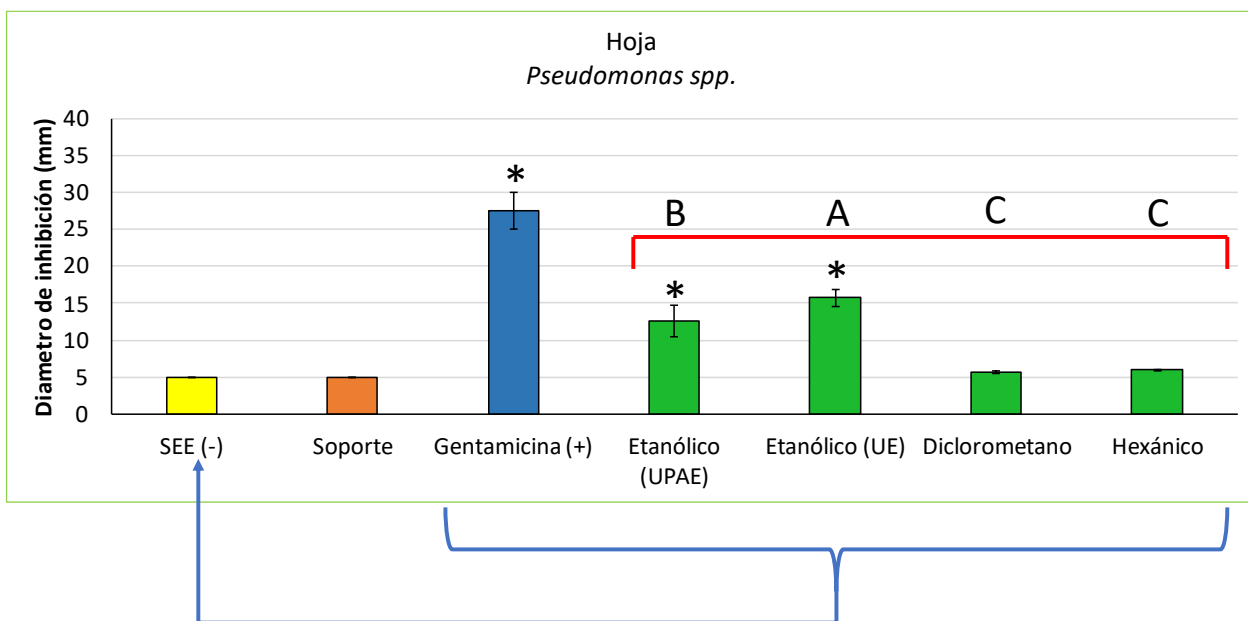


Figura 12. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas spp.* Los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron diámetros de inhibición significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control negativo (SEE), mientras que los extractos diclorometánico y hexánico no presentaron diferencias significativas. El control + ($10 \mu\text{g}$ de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

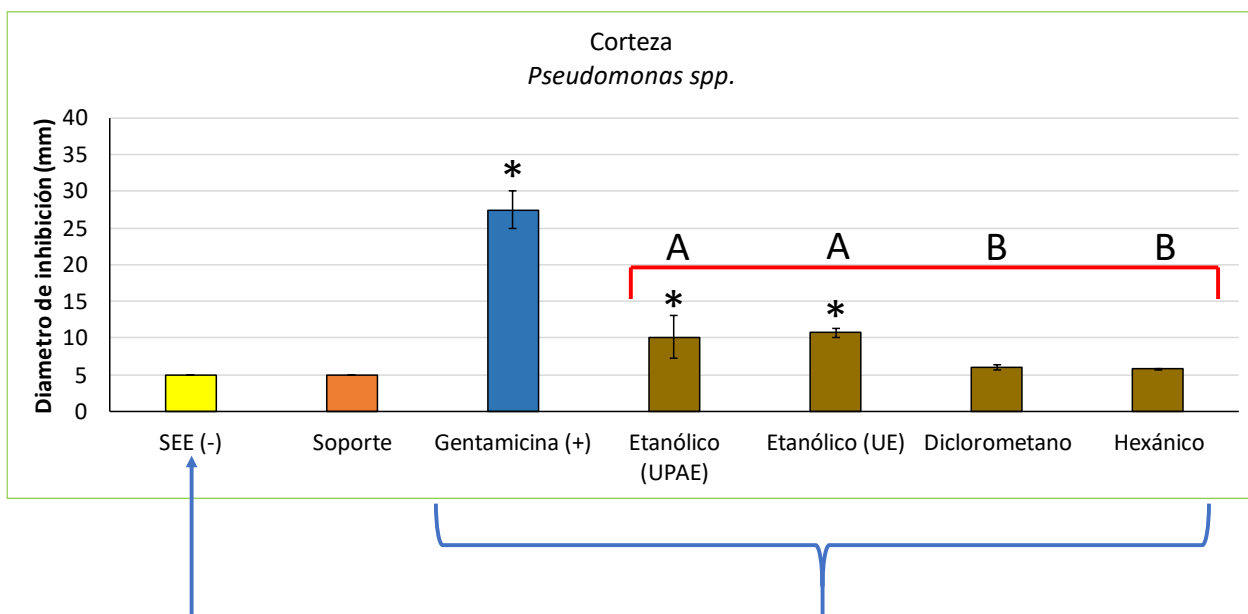


Figura 13. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas spp.* Los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron diámetros de inhibición significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control negativo (SEE), mientras que los extractos diclorometánico y hexánico no presentaron diferencias significativas. El control + ($10 \mu\text{g}$ de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

En la Figura 12, se muestra la exposición de *Pseudomonas spp.*, a los diferentes extractos de hoja, se encontró que solo los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) sobre el diámetro de los halos de inhibición con respecto del control negativo (SEE). Los extractos etanólicos tuvieron un efecto diferencial, siendo mayor para el extracto etanólico UE ($p \leq 0.05$). Por otro lado, el extracto diclorometánico y hexánico no generaron halos de inhibición. En la Figura 13, se muestra la exposición de *Pseudomonas spp.*, a los diferentes extractos de corteza, se encontró que solo los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$) sobre el diámetro de los halos de inhibición con respecto del control negativo (SEE), en este caso los extractos etanólicos (UPAE y UE) no mostraron diferencias entre ellos ($p \geq 0.05$). No se muestran diferencias significativas en los extractos diclorometánico y hexánico ($p \geq 0.05$) con respecto del control negativo (SEE).

Este efecto diferencial puede deberse tanto a la composición de los extractos como a la sensibilidad diferencial de la bacteria a cada uno de estos componentes, lo que podría ser interpretado a que los compuestos de intermedia y baja polaridad no muestran inhibición del crecimiento en esta bacteria en particular. *Pseudomonas spp.*, es un habitante común de ambientes acuáticos, la especie mejor caracterizada es *Pseudomonas aeruginosa*, la cual es sabido que es resistente a un gran número de antibióticos (Álvarez et al., 2005). La información sobre otras especies de este género es escasa (Vaz-Moreira et al., 2012). En nuestro caso la bacteria con la que trabajamos no fue caracterizada hasta especie, sin embargo, mostró sensibilidad a Gentamicina tal y como reportan autores como Meng et al., (2020) y Pérez-Monrás et al., (2006). Es de destacar que Poole, (2005), reporto la resistencia de *Pseudomonas* a Gentamicina. Este resultado contradictorio puede deberse a lo mencionado previamente acerca de los diferentes mecanismos de resistencia de esta bacteria. Debido a la capacidad del género *Pseudomonas* de generar variedades resistentes a antibióticos, existe un gran interés por evaluar su capacidad o su resistencia a extractos vegetales. La mayoría de los reportes mencionan que los extractos metanólicos y etanólicos son capaces de inhibir a *Pseudomonas* (Heredia-Ortiz et al., 2019; Vanegas- Arévalo 2020). Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este estudio (Figura 12 y 13). Aunque es de destacar que existe mucha variación en la sensibilidad de la bacteria, por ejemplo, Vanegas- Arévalo, (2020), analizó 48 extractos de plantas del género *Piper*

de las cuales únicamente 3 mostraron potencial inhibitorio contra diversas especies de *Pseudomonas*.

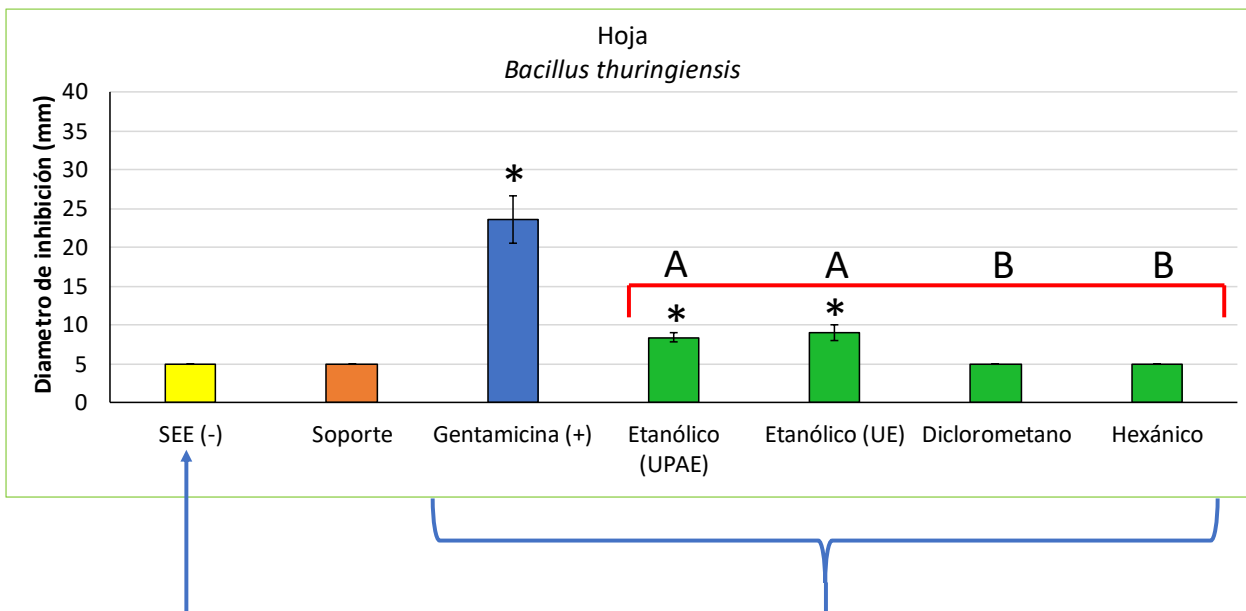


Figura 14. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de hoja sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Bacillus thuringiensis*. Los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron diámetros de inhibición significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control negativo (SEE), mientras que los extractos diclorometánico y hexánico no presentaron diferencias significativas. El control + (10 μg de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

En la Figura 14, se muestra la exposición de *Bacillus thuringiensis* a los diferentes extractos de hoja, se encontró que los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$), mayor con respecto del control negativo (SEE). Por otra parte, el extracto diclorometánico y hexánico no generaron halos de inhibición. Los extractos etanólicos (UPAE y UE) no mostraron diferencias entre ellos ($p \geq 0.05$).

Cuando se expuso a *Bacillus thuringiensis* a los diferentes extractos de corteza como se muestra en la Figura 15, se encontró que los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron un efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0.05$), mayor con respecto del control negativo (SEE). Por otra parte, el extracto diclorometánico y hexánico no generaron halos de inhibición. Los extractos etanólicos (UPAE y UE) no mostraron diferencias entre ellos ($p \geq 0.05$).

Este efecto de los extractos etanólicos puede deberse tanto a la composición de estos, como a la sensibilidad de la bacteria, lo que podría ser interpretado como que los compuestos de polaridad intermedia y baja no muestran inhibición del crecimiento en esta bacteria. El género *Bacillus* ha

generado enfermedades en los humanos (Cortez-Sánchez et al., 2017; Pérez-Portuondo, 2012). La bacteria usada en este estudio, fue caracterizada, presentando sensibilidad y resistencia a diferentes antibióticos como se muestra en la Tabla 7, siendo sensible a Clindamicina, Eritromicina, Gentamicina y Claritromicina, siendo resistente a Ceftriaxona y Ampicilina, lo que coincide con algunos autores como Cuellar-Gómez, (1996) y Control de Calidad de Bacteriología (B-3/12). (s.f).

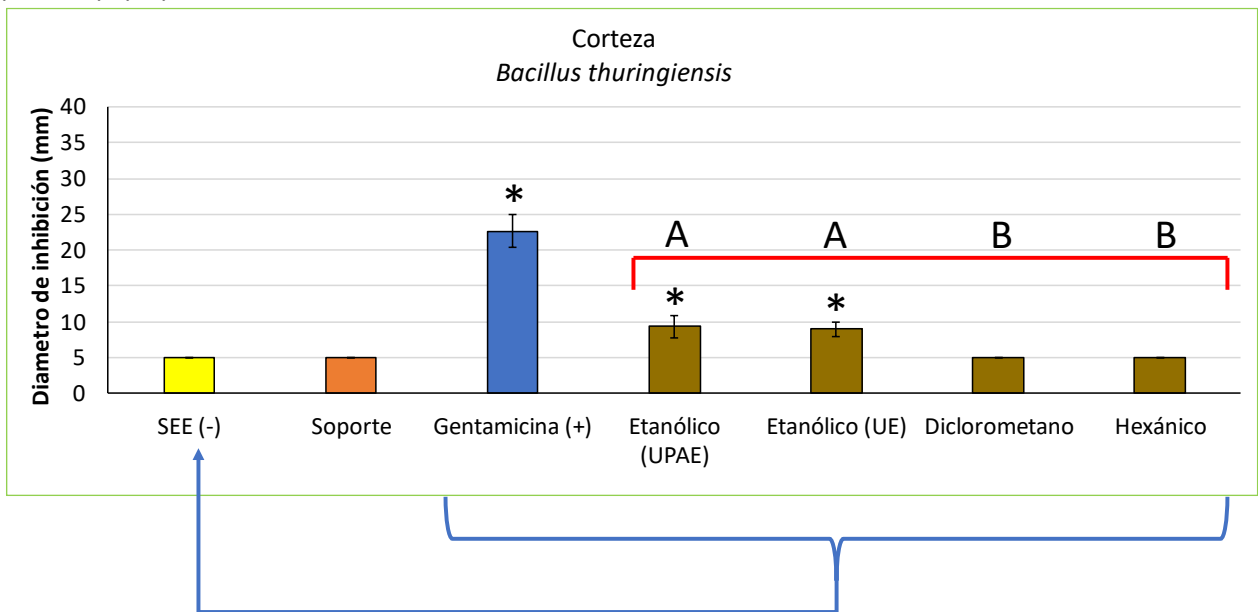


Figura 15. Efecto de la exposición de los diferentes extractos de corteza sobre el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Bacillus thuringiensis*. Los extractos etanólicos (UPAE y UE) presentaron diámetros de inhibición significativamente mayores ($p \leq 0.05$), con respecto del control negativo (SEE) mientras que los extractos diclorometánico y hexánico no presentaron diferencias significativas. El control + ($96 \mu\text{g}$ de Gentamicina) presentó una diferencia significativamente mayor que el control negativo, pero también mayor que el tratamiento con los diferentes extractos.

Los resultados de la Figura 8 a la 15, indican que los extractos etanólicos de hojas y corteza fueron los más eficaces contra las especies bacterianas empleadas, lo que concuerda en cierta parte con lo reportado por Caceres et al., (1990), que estudiaron los extractos etanólicos de hojas, corteza y madera de *B. crassifolia* contra bacterias Gram negativas, siendo los extractos de corteza los únicos en presentar la actividad frente a todas las bacterias. En otra investigación reportada por Rivero et al., (2009), estudiaron el extracto metanólico de corteza frente a bacterias Gram positivas y negativas, presentando inhibición contra todas las bacterias. También existen otros estudios de la actividad antimicrobiana en otras partes que conforman el árbol reportando más eficacia en los extractos polares, tal es el caso de lo reportado por Martínez-Vázquez et al., (1999), estudiaron extractos de acetato de etilo, metanólicos y hexánicos de raíces y tallos contra

bacterias Gram positivas y negativas, presentando al extracto de acetato de etilo de raíz como el más activo contra las bacterias, seguido del extracto de tallo y después los extractos metanólicos. Píon-León et al., (2013) estudiaron el extracto metanólico, clorofórmico y hexánico obtenidos del fruto de *B. crassifolia* contra bacterias Gram positivas y negativas, reportando que el extracto con mayor actividad fue el metanólico, el cual inhibió a las Gram positivas y el extracto hexánico a las Gram negativas.

La eficacia de la actividad antimicrobiana de los extractos polares se debe a la presencia de los diferentes compuestos que se encuentran en ellos. Rivero et al., (2009), identificando en el extracto metanólico de corteza los compuestos: β -amirina, Betulina, Ácido Betulinico, Ácido Oleico, Quercetina, Epicatequina, Ácido Galico y β -citosterol. Martínez-Vázquez et al., (1999), realizaron estudios fitoquímicos de los extractos de acetato de etilo y metanólicos de raíces y tallos, reportando la presencia de Saponinas, Taninos, Glicósidos y poca presencia de Flavonoides. Por último, aunque la eficacia de los extractos menos polares fue menor, esto pudo haber sido por la impureza del extracto crudo, ya que Muñiz et al., (2014) realizaron un estudio del compuesto Diterpeno Labdano obtenido del extracto hexánico, inhibió a bacterias Gram positivas y negativas. Es importante mencionar en la investigación actual no se realizó un estudio fitoquímico preliminar para identificar los compuestos que presenta la actividad antimicrobiana, sin embargo, Roldan-Sabino, (2019) realizó estudios fitoquímicos preliminares, reportando la presencia de fenoles, flavonoides en los extractos etanólicos de hoja y corteza del árbol de *B. crassifolia* variedad ácida, así como la presencia de Alcaloides en el extracto etanólico de hoja. Estos metabolitos ya han sido mencionados en la literatura que presenta mecanismos de acción frente a las dianas bacterianas como lo son la pared celular, la membrana plasmática, inactivando enzimas y proteínas necesarias para la síntesis proteica (Khameneh et al., 2019; Pisoschi et al., 2018; Ferdes, 2018; Djilani y Dicko, 2012).

En este estudio se obtuvieron extractos de hoja y corteza utilizando dos métodos de extracción: el método de extracción por ultrasonido (UE) y el método Ultrasound assisted extraction and pressing (UPAE). El método de extracción UPAE en un estudio previo del grupo de trabajo, demostró que favorece la cantidad de sólidos totales extraídos sin afectar la actividad antioxidante de los compuestos extraídos (Roldan-Sabino et al. 2018). Sin embargo, no se sabe si tendrá el mismo efecto sobre la extracción de compuestos con actividad antibiótica por lo que es

de interés observar si existen diferencias entre el método de extracción UPAE con respecto del UE. Por lo tanto, en cuanto a la comparación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos obtenidos por UPAE y UE, no mostraron diferencias significativas entre ellos en cada una de las bacterias empleadas a excepción frente a *Aeromonas spp.*, quien presento sensibilidad contra el extracto etanólico UPAE de hoja, seguida por *Pseudomonas spp.*, que presento sensibilidad frente al extracto UE de hoja.

En cuanto al género *Byrsonima*, existen estudios de la actividad antimicrobiana en diferentes especies del género. Michelin et al., (2008), realizaron un estudio en los extractos metanólicos y clorofórmicos de las hojas de *B. fagifolia*, *B. basiliba* y *B. intermedia*, los extractos metanólicos fueron los únicos en presentar la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, presentando también un estudio fitoquímico donde mostraron que los extractos clorofórmicos solo tuvieron la presencia de terpenos, mientras que los extractos metanólicos mostraron la presencia de catequinas, taninos, derivados de á. gálico y flavonoides. En otro estudio reportado por Sannomiya et al., (2005), evaluaron el extracto metanólico, hidrometanólico de hojas, así como las fracciones en cuanto a su posible actividad antimicrobiana, mostrando la actividad de todos frente a bacterias Gram positivas y negativas. También realizaron perfiles químicos donde obtuvieron presencia de flavonoides y derivados de catequinas e identificaron y aislaron cuatro compuestos; quercetina, galato de metilo, galato de (-)-epigallocatequina y quercetina-3-o-(2''-galloil)-a-L-arabinopiranosido.

9. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, se determinó que los extractos de hojas y corteza del árbol de *Byrsonima crassifolia* variedad fruto ácido de la zona del Papaloapan, presentan actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas.

En el actual trabajo, también se compararon los métodos UE y UPAE. Se obtuvo el mayor rendimiento en los extractos etanólicos de hoja y corteza por el método UPAE.

Los extractos etanólicos de hoja y corteza obtenidos por el método UE, presentaron la mayor actividad sobre el crecimiento de todas las bacterias empleadas, con respecto del extracto diclorometánico y hexánico. Sin embargo, en el ensayo con *Pseudomonas spp.*, el extracto etanólico de hoja presento una actividad antimicrobiana mayor comparada con el mismo extracto de corteza. Para las otras bacterias la actividad fue similar entre ellos.

En cuanto a la comparación entre las actividades antimicrobianas de los extractos etanólicos obtenidos por el método UPAE y UE de hojas y corteza, no se obtuvieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) lo que nos lleva a sugerir que el uso de un método u otro (UPAE o UE) no influye en la actividad antimicrobiana, sin embargo, es de destacar que el método UPAE requiere de menor cantidad de materia prima para la obtención de los extractos.

En cuanto a las bacterias, *Aeromonas spp.*, fue la mas sensible frente al extrato etanólico UPAE de hoja, seguida de *Pseudomonas spp.*, frente al extracto UE de hoja.

10. PERSPECTIVAS

- Investigar más a fondo los extractos etanólicos de hoja y corteza, clasificando la actividad antimicrobiana que poseen mediante los métodos de dilución de CMI y CMB.
- Probar los extractos etanólicos contra bacterias reportadas como resistentes o patógenas, así como en otros microorganismos; hongos y parásitos.
- Hacer un estudio fitoquímico completo para identificar los diferentes metabolitos secundarios que se encuentren en la hoja y corteza, así como la identificación, aislamiento y elucidación para establecer las estructuras químicas de los compuestos.

11. REFERENCIAS

1. Álvarez, C. A. G., Castro, A. L. L., de González, M. D. J. P., & Jiménez, M. L. N. (2005). Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*: entendiendo a un peligroso enemigo. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(1), 27-34. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000100004&lng=en&tlng=es.
2. Avello L, M, y Cisternas F, I. (2010). Fitoterapia, sus Orígenes, Características y Situación en Chile. *Revista Médica de Chile*. 138(10), 1288-1293. doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010001100014>
3. Bado, I., García, V., Robino, L., Cordeiro, N., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales Mecanismos de Resistencia Antibiótica. En (Ed.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (2ª ed., PP.1-782). FEFMUR. <http://higiene1.higiene.edu.uy/DByV/Principales%20mecanismos%20de%20resistencia%20antibi%F3tica.pdf>
4. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2), 71-79. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
5. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4), 493–496. doi: https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
6. Bayuelo-Jiménez, J. S., Rico, J. C. L., & Ochoa, I. E. (2006). Caracterización Morfológica de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth Nativa de Churumuco, Michoacán, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29(Es2), 31-36. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/29-2%20Especial%202/6a.pdf>
7. Becton Dickinson, B. D. (2013). EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. *Instituciones de uso-Medio en placas listo para su uso*, 2-4. [https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8765#:~:text=BD%20EMB%20Agar%2C%20Modified%20\(f%C3%B3rmula,a%20partir%20de%20muestras%20cl%C3%ADnicas](https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8765#:~:text=BD%20EMB%20Agar%2C%20Modified%20(f%C3%B3rmula,a%20partir%20de%20muestras%20cl%C3%ADnicas).
8. Bello-López, J. M., Cabrero-Martínez, O. A., Ibáñez-Cervantes, G., Hernández-Cortez, C., Pelcastre-Rodríguez, L. I., Gonzalez-Avila, L. U., & Castro-Escarpulli, G. (2019). Horizontal gene transfer and its association with antibiotic resistance in the genus *aeromonas* spp. *Microorganisms*, 7(9), 363. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/9/363>
9. Bozzetta, J. L. R., Carrera, E. E. C., Huacachi, P. K. M., & Rondán, S. F. H. (2017). Aislamiento e Identificación de *Bacillus Thuringiensis* en Cultivos de Plátano, para la producción de Bioinsecticidas. *Big Bang Faustiniiano*. 6(1). <https://revistas.unjfsc.edu.pe/index.php/BIGBANG/article/view/48>.
10. Bush y Pérez. (2020). *Infecciones por Escherichia coli*. Manual MSD Versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-escherichia-coli>.

11. Bush y Pérez. (2020). *Infecciones por Pseudomonas y Patógenos Relacionados*. MANUAL MSD Versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-patogenos-relacionados>.
12. Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., & Aguilar, L. (1990). Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. 1. Screening of 84 Plants Against Enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*. 30(1), 55–73. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(90\)90017-n](https://doi.org/10.1016/0378-8741(90)90017-n)
13. Calvo, J., y Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de Acción de los Antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27(1), 44–52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
14. Camacho, V. (2010). Los antimicrobianos en la práctica médica. *Medicina intensiva*, 16-21. <https://docplayer.es/13309768-Los-antimicrobianos-en-la-practica-medica.html>
15. Cantón, R., García, J. E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., & García, J. A. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. *Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editor Picazo J J. http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf
16. Castro-Escarpulli, G., Aguilera-Arreola, M. G., Cerezo, S. G., Hernandez-Rodriguez, C. H., Chacón, M. R., Falgás, L. S., ... & Salvat, M. J. F. (2002). El género *Aeromonas*. ¿Un Patógeno Importante en México?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 22(4), 206-216. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2002/ei024f.pdf>
17. Chopra, I., Hodgson, J., Metcalf, B., & Poste, G. (1997). The Search for Antimicrobial Agents Effective Against Bacteria Resistant to Multiple Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41(3), 497–503. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.497>
18. Christenson, J. C., Korgenski, E. K., & Relich, R. F. (2018). *Laboratory Diagnosis of Infection Due to Bacteria, Fungi, Parasites, and Rickettsiae. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases*. 1422–1434.e3. https://www.researchgate.net/publication/322170241_Laboratory_Diagnosis_of_Infection_Due_to_Bacteria_Fungi_Parasites_and_Rickettsiae
19. Coico R. (2005). Gram staining. *Current protocols in microbiology, Appendix 3*. doi: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00>
20. Compean, K. L., & Ynalvez, R. A. (2014). Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Research Journal of Medicinal Plants*. 8(5), 204-213. https://www.researchgate.net/profile/Kassandra_Compean/publication/26445852

1_Antimicrobial_Activity_of_Plant_Secondary_Metabolites_A_Review/links/53e0478a0cf27a7b830a3ae6.pdf

21. Control de Calidad de Bacteriología (B-3/12). (s.f). <https://seimc.org/contenidos/ccs/analisisderesultados/2012/ccs-Bacte3T2012.pdf>
22. Cortés-Sánchez, A. (2018). *Bacillus cereus*: Alimentos, Salud Y Biotecnología. *Agro Productividad*. 10(10). <http://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/98>
23. Cuellar-Gómez, G. R. (1996). *Producción de Cepas de Bacillus thuringiensis con Actividad Biológica Modificada*. [Tesis de maestría en ciencias con especialidad en microbiología]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
24. Damgaard, P. H., Granum, P. E., Bresciani, J., Torregrossa, M. V., Eilenberg, J., & Valentino, L. (1997). Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 18(1), 47-53. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1997.tb01026.x>
25. de Souza, R. O., de Assis Dias Alves, G., Aguilera, A., Rogez, H., & Fonseca, M. (2018). Photochemoprotective Effect of a Fraction of a Partially Purified Extract of *Byrsonima crassifolia* leaves against UVB-induced oxidative stress in fibroblasts and hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*. 178, 53–60. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.10.033>
26. Djilani, A., & Dicko, A. (2012). The therapeutic benefits of essential oils. *Nutrition, well-being and health*, 7, 155-179. <https://www.intechopen.com/books/nutrition-well-being-and-health/the-therapeutic-benefits-of-essential-oils>
27. Fajardo-Zapata, Alvaro L., Méndez-Casallas, Francy J., Hernández-Niño, Jenny F., Molina, Luis H., Tarazona, Ayda Milena, Nossa, Camilo, Tejeiro, José Luis, & Ramírez, Nancy. (2013). La Automedicación de Antibióticos: Un Problema de Salud Pública. *Revista Salud Uninorte*, 29(2), 226-235. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012055522013000200008&lng=en&tlng=
28. Fengel, D. y G. Wegener. (1989). *Wood, chemistry, ultrastructure, reactions*. 2ª Ed. Walter de Gruyter Ed. Nueva York, p: 90-115. [https://www.scirp.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1634251](https://www.scirp.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1634251)
29. Ferdes M. (2018). Antimicrobial Compounds from Plants. https://www.researchgate.net/publication/326452181_Antimicrobial_compounds_from_plants.
30. Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., & Manaia, C. M. (2011). Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water research*, 45(17), 5599-5611. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.021>

31. Garcés, A., y Saravia, K. (2008). Morfología y Estructura de los Microorganismos. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfologia.pdf
32. Gibbons, S., Moser, E., & Kaatz, G. W. (2004). Catechin Gallates Inhibit Multidrug Resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica*. 70(12), 1240–1242. doi: <https://doi.org/10.1055/s-2004-835860>
33. Gutiérrez, R., y Ramírez, A. M. (2016). Hypoglycemic Effects of Sesquiterpene Lactones from *Byrsonima crassifolia*. *Food Science and Biotechnology*. 25(4), 1135–1145. doi: <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0182-8>
34. Heredia-Ortiz, C. Y.; Orozco-Guerrero, M. L.; Pérez-Rubiano, Claudia; Martín G., D.A. (2019). Actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de hojas de *Solanum dolichosepalum* (Bitter). *Informador Técnico*, 83(2), 121-130. doi: <https://doi.org/10.23850/22565035.2061>
35. Hernandez, C., Aguilera, M.C., Castro, G. (2011). Situación de las Enfermedades Gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31(4), 137-151. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2011/ei114f.pdf>
36. Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Reyes-Chilpa, R., León, E., García, M. P., Tortoriello, J., & Huerta-Reyes, M. (2011). Antidepressant Effect and Pharmacological Evaluation of Standardized Extract of Flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 18(14), 1255–1261. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.018>
37. Horváth, G., Bencsik, T., Ács, K., & Kocsis, B. (2016). Sensitivity of ESBL-Producing Gram-negative Bacteria to Essential Oils, Plant Extracts, and their Isolated Compounds. *Academic Press, Amsterdam*. 239-269. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00012-5>
38. Jaimes Albiter, C. (2009). *Caracterización morfológica de fruto y semilla de nanche *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth y su relación con la capacidad germinativa* [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. http://www.cm.colpos.mx/inicio/images/tesis_p/fruti/resumen/resumen_fruti.pdf
39. Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on Plant Antimicrobials: A Mechanistic Viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 8, 118. doi: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0559-6>
40. Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A. M. (2018). Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 45, 62-72. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1466856417303211>
41. Li, P., Wu, D., Liu, K., Suolang, S., He, T., Liu, X., ... & Lin, D. (2014). Investigation of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and enterococci isolated from Tibetan pigs. *PLoS One*, 9(4), e95623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095623>

42. López, A., Hudson, J. B., y Towers, G. H. (2001). Antiviral and Antimicrobial Activities of Colombian Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 77(2-3), 189–196. doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00292-6](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00292-6)
43. Lucana, M. R., y Huanca, R. M. (2014). Estructura Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. 49, 2589-2593. http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000001&script=sci_arttext
44. Maguiña-Vargas, C., Montiel, M., Grados, P., Villena-Vizcarra, J., Montes-Delgado, M. (2013). Uso Adecuado y Racional de Antibióticos. En Maguiña, c. (Ed.), *Uso Racional de Antibióticos* (pp.11-20). Logargraf. <https://cmplima.org.pe/wp-content/uploads/2019/06/UsoRacionalAntibioticos.pdf>
45. Maldini, M., Sosa, S., Montoro, P., Giangaspero, A., Balick, M. J., Pizza, C., & Della Loggia, R. (2009). Screening of the Topical Anti-inflammatory Activity of the Bark of *Acacia cornigera Willdenow*, *Byrsonima crassifolia Kunth*, *Sweetia panamensis Yakovlev* and the leaves of *Sphagneticola trilobata Hitchcock*. *Journal of Ethnopharmacology*. 122(3), 430–433. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.002>
46. Mariutti, L., Rodrigues, E., Chisté, R. C., Fernandes, E., & Mercadante, A. Z. (2014). The Amazonian Fruit *Byrsonima crassifolia* Effectively Scavenges Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Protects Human Erythrocytes Against Oxidative Damage. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*. 64, 618–625. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.032>
47. Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M., Salgado, I., Olivares, S., ... & Rodríguez, D. K. (2010). Antibiotic and metals resistance in bacteria isolates from Almendares River. *Rev. Cenic*, 41, 1-10. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf>
48. Martínez-Vázquez, M., González-Esquinca, A. R., Cazares Luna, L., Moreno Gutiérrez, M. N., y García-Argáez, A. N. (1999). Antimicrobial Activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. *Journal of Ethnopharmacology*. 66(1), 79–82. doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00155-x](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00155-x)
49. Medina-Torres, R., CATON, O., & Valdivia Bernal, R. (2012). Propiedades Medicinales y otros usos del Nanche [*Byrsonima crassifolia* (L.) HBK]. CONACYT. <http://aramara.uan.mx:8080/bitstream/123456789/900/1/Propiedades%20Medicinales%20y%20otros%20usos%20del%20Nanche.pdf>
50. Medina-Torres, R., Salazar-García, S., & Gómez-Aguilar, J. R. (2004). Fruit Quality Indices in Eight Nanche [*Byrsonima crassifolia* (L.) HBK] Selections. *HortScience*. 39(5), 1070-1073. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.5.1070>
51. Mendez, G. (1996). Importancia de las enfermedades infecciosas. *Colombia Medica*, 27(2), 52. <https://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/18/13>

52. Meng, L., Liu, H., Lan, T., Dong, L., Hu, H., Zhao, S., ... y Wang, J. (2020). Patrones de resistencia a antibióticos de *Pseudomonas* spp. Aislado de leche cruda revelado por secuenciación del genoma completo. *Fronteras en microbiología*, *11*, 1005. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01005>
53. Michelin, D. C., Sannomiya, M., Figueiredo, M. E., Rinaldo, D., Santos, L. C. D., Souza-Brito, A. R., ... & Salgado, H. (2008). Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *18*, 690-695. doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500009>
54. Moreno, G.R. (2015). *Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante del extracto del fruto del nanche (Byrsonima crassifolia)* [maestría, Universidad Veracruzana]. Repositorio institucional Universidad Veracruzana.
55. Muniz-Ramírez, A., Flores-Cotera, L. B., y Pérez-Gutiérrez, R. M. (2013). Anti-inflammatory Activity of the Hexane Extract of *Byrsonima crassifolia* Seeds in Experimental Animal Models. *Alternative Therapies in Health and Medicine*. *19*(1), 26–36. https://todayspractitioner.com/wp-content/uploads/2013/10/Anti-inflammatory-Activity-of-the-Hexane-Extract-of-Byrsonima-crassifolia-191_ATM_p26_36muniz.pdf
56. Muñoz-Ramírez, A., Pérez-Gutiérrez, R. M., Garcia-Baez, E., & Mota-Flores, J. M. (2014). Antimicrobial Activities of Diterpene labdane from Seeds of *Byrsonima crassifolia*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. *13*(1), 31-37. <https://www.redalyc.org/pdf/856/85629766004.pdf>
57. Muñoz, C. W., Chavez, R. W., Pabón, L. C., Rendón, M. R., Patricia-Chaparro, M., & Otálvaro-Álvarez, Á. M. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, *46*, 38-46. <https://www.redalyc.org/pdf/1816/181643224027.pdf>
58. Organización Panamericana de la Salud. (2003). Peligros biológicos: Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP. https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10838:2015-peligros-biologicos&Itemid=41432&lang=es
59. Palaniappan, K., & Holley, R. A. (2010). Use of Natural Antimicrobials to Increase Antibiotic Susceptibility of Drug Resistant Bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. *140*(2-3), 164–168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.001>
60. Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J. y Caballero, P. (2014). Toxinas de *Bacillus thuringiensis*: una descripción general de su actividad biocida. *Toxinas*, *6* (12), 3296–3325. doi: <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>
61. Pérez Monrás, M. F., Batlle Almodóvar, M. D. C., Verdera Hernández, J., & Llop Hernández, A. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, *58*(3), 0-0.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000300006&lng=es&tlng=es.

62. Pérez-Gutiérrez, R. M., & Muñoz-Ramírez, A. (2013). Hexane Extract of the Seeds of *Byrsonima crassifolia* Accelerates Wound Healing in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Chinese Journal of Integrative Medicine*. 1-7. doi: <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1556-x>
63. Pérez-Gutiérrez, R. M., Muñoz-Ramírez, A., Gomez, Y. G., & Ramírez, E. B. (2010). Antihyperglycemic, Antihyperlipidemic and Antiglycation Effects of *Byrsonima crassifolia* Fruit and Seed in Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*. 65(4), 350–357. doi: <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0181-5>
64. Pérez-Portuondo, Irasema. (2012). Bacillus cereus y su Papel en las Intoxicaciones Alimentarias. *Revista Cubana de Salud Pública*. 38(1), 98-108. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662012000100010&lng=es&tlng=es.
65. Perretta, A., Antúnez, K., & Zunino, P. (2019). Resistencia a los antimicrobianos en bacterias aeromonadales móviles aisladas de peces cultivados en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(211), 4-8. doi: <http://dx.doi.org/10.29155/vet.55.211.1>
66. Pío-León, J. F., Díaz-Camacho, S. P., López-López, M. A., de Jesús URIBE-BELTRÁN, M., Willms, K., López-Angulo, G., ... y Delgado-Vargas, F. (2013). Actividad Antibacteriana de Extractos de Frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 12(4), 356-364. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85628141003>
67. Pérez, M.C. (2008). Morfología y Estructura Bacteriana. En Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (Ed). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. (3ª ed., pp. 25-46). FEFMUR.
68. Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An Overview of Natural Antimicrobials Role in Food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143, 922–935. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
69. Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 49(2), 479-487. doi: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005
70. Ragazzo-Sánchez, Juan Arturo, Robles-Cabrera, Alejandra, Lomelí-González, Leopoldo, Luna-Solano, Guadalupe, & Calderón-Santoyo, Montserrat. (2011). Selección de cepas de Bacillus spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17(spe1), 5-11. Recuperado en 07 de junio de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000400002&lng=es&tlng=es

71. Raya-Pérez, J.C., Aguirre-Mancilla, C.L., Gil-Vega, K., & Simpson, J. (2010). La domesticación de plantas en México: comparación de la forma cultivada y silvestre de *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae). *Polibotánica*, (30), 239-256. Recuperado en 16 de febrero de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200013&lng=es&tIng=es.
72. Raymond, B. y Federici, BA (2017). En defensa de *Bacillus thuringiensis*, el insecticida microbiano más seguro y exitoso disponible para la humanidad: una respuesta a la EFSA. *Ecología de microbiología FEMS*, 93 (7), fix084. doi: <https://doi.org/10.1093/femsec/fix084>
73. Rivero-Cruz, J. F., Sánchez-Nieto, S., Benítez, G., Casimiro, X., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., y Rivero-Cruz, B. (2009). Antibacterial Compounds Isolated from *Byrsonima crassifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*. 37(2), 155-163. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.567.4140&rep=rep1&type=pdf>
74. Rodríguez, P. A., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
75. Rodriguez-Francisco, O. A. A. L. (2018). Actividad antimicrobiana de extractos de Neen (*Azadirachta indica*). *encuentro regional de investigacion multidisciplinaria*, cartel.
76. Rojas, Tatiana, Fuentes Campos, María E., Contreras-López, Eliana, Gómez, Susana, & Muñoz-Jáuregui, Ana María. (2019). Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de sanky (*Corryocactus brevistylus*). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 85(2), 258-267. Recuperado en 07 de junio de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2019000200012&lng=es&tIng=es.
77. Roldan-Sabino, C., Viñas, O., Parra, A., Galero, N.X., Avila, A.X., Hernandez, A. (2018). Effect of Sonication and Pressing on Recovery of Compounds with Antioxidant Activity from Leaves and Bark of *Byrsonima crassifolia*. *Journal of Bioengineering and Biomedicine Research*. 2(3), 1-8. <http://cmibq.org.mx/jbbr/index.php/library> Pp.7-14.
78. Roque, A. C., Vela, G., Pérez, J., Escobar, R., & Ballinas, J. (2012). Nota Científica: Uso de nanche (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) en Gelatina Artesanal para Niños. *Etnobiología*. 10(2), 50-55. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5294481>
79. Sánchez-Ruiz, Juan Francisco, Tejeda Rosales, María Elena, Sánchez Tejeda, Juan Francisco, & Sánchez Tejeda, Manuel Guillermo. (2012). La Farmacia, la Medicina y la Herbolaria en el Códice Florentino. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 43(3), 55-66. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300006&lng=es&tIng=es.

80. Sannomiya, M., Michelin, D. C., Rodrigues, C. M., Santos, L. C. D., Salgado, H. R. N., Hiruma-Lima, C. A., ... & Vilegas, W. (2005). *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. https://www.researchgate.net/profile/Clenilson-Rodrigues/publication/49599466_Byrsonima_crassa_Niedenzu_IK_Antimicrobial_activity_and_chemical_study/links/0912f5137e36f267d8000000/Byrsonima-crassa-Niedenzu-IK-Antimicrobial-activity-and-chemical-study.pdf
81. Sibanda, T., Okoh, A. I. (2007). The Challenges of Over Coming Antibiotic resistance: Plant extracts as Potential Sources of Antimicrobial and Resistance Modifying Agents. *African Journal of Biotechnology*. 6(25), 2886-2896. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58241>
82. Soto-Varela, Z., Pérez-Lavalle, L., & Estrada Alvarado, D. (2016). Bacterias Causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos: una Mirada en Colombia. *Revista Salud Uninorte*. 32(1), 105-122. doi: <https://dx.doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
83. Souza, R. O., Alves, G. D. A. D., Forte, A. L. S. A., Marquele-Oliveira, F., da Silva, D. F., Rogez, H., & Fonseca, M. J. V. (2017). *Byrsonima crassifolia* Extract and Fraction Prevent UVB-Induced Oxidative Stress in keratinocytes Culture and Increase Antioxidant Activity on Skin. *Industrial Crops and Products*. 108, 485-494.
84. Tenover, F. C., Cepheid, Sunnyvale, C. A. (2015). *Antimicrobial Susceptibility Testing: Module in Biomedical Research*. 1-11. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02486-7>
85. Vanegas Arevalo, D. L. (2020). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de plantas del género Piper frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum*. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/81>
86. Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C., & Manaia, C. M. (2012). Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Science of the Total Environment*, 426, 366-374. doi:10.1016 / j.scitotenv.2012.03.046
87. Vazquez-Cahuich, D., Moreno, J. E., Hidalgo, D. C., Martínez, J. R., Borges-Argáez, R., & Farfan, M. C. (2013). Antimicrobial Activity and Chemical Composition of the Essential Oils of *Malvaviscus arboreus* Cav, *Pimenta dioica* (L.) Merr., *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth and *Psidium guajava* L. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 16, 505-513. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1125>
88. Wright, G. D., y Sutherland, A. D. (2007). New Strategies for Combating Multidrug-Resistant Bacteria. *Trends in Molecular Medicine*. 13(6), 260-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.004>
89. Zúñiga-Sierra, Z. (2019). El nanche, (*byrsonima crassifolia*), como Recurso Biotecnológico de la Cuenca del Papaloapan.

12. ANEXOS

Roldan-Sabino, C., Viñas, O., Parra, A., Galero, N.X., Avila, A.X., Hernandez, A. (2018). Effect of Sonication and Pressing on Recovery of Compounds with Antioxidant Activity from Leaves and Bark of *Byrsonima crassifolia*.

JOURNAL OF BIOENGINEERING AND BIOMEDICINE RESEARCH (2018) VOL.2 No.3:1-8

Research article

Effect of sonication and pressing on recovery of compounds with antioxidant activity from leaves and bark of *Byrsonima crassifolia*

Roldan-Sabino Crisanto^{1,4}, Viñas-Bravo Omar^{2,4}, Parra-Reyes Aridaith⁴, Galero-Martínez Nelda X^{2,4}, Avila-Alejandro Alma X^{3,4}, Hernández-López Alejandro^{*1,4,5}

División de estudios de posgrado, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.

²*Instituto de Química aplicada, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.*

³*Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.*

⁴*Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec, Circuito Central # 200, Col. Parque Industrial, C.P. 68301, Tuxtepec, Oax, México.*

⁵*Sistema Producto Nopal del Distrito Federal A.C. Sonora sur n.2 Barrio Los Ángeles, Milpa Alta, C.P. 12000 CDMX, México.*

*Corresponding author: alehz74@yahoo.com.mx

Received: 14 April 2018/ Accepted: 26 June 2018/ Published online: 18 September 2018

Parra-Reyes Aridaith, Ávila-Alejandre Alma Xochil, Galero-Martínez Nelda Xanath, Hernández-López Alejandro. Actividad antioxidante de hojas de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Nanche variedad ácida). (cartel) el marco del XII Congreso de Biotecnología Chiapas 2017 celebrado en Comitán de Domínguez, Chiapas.



Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A. C.

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA



A: Parra-Reyes Aridaith, Ávila-Alejandre Alma Xochil, Galero-Martínez Nelda Xanath, Hernández-López Alejandro

Por su participación con el trabajo en modalidad CARTEL:

Actividad antioxidante de hojas de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Nanche variedad ácida)

en el marco del XII Congreso de Biotecnología Chiapas 2017 celebrado en Comitán de Domínguez, Chiapas, los días 23-26 de Mayo de 2017

MB. Gamaliel Velázquez Ovalle
Presidente

Dr. Rodolfo Torres De Los Santos
Secretario

Colegio de Biotecnólogos de Chiapas A.C.
R.F.C. CBC-021108-AHA



Parra-Reyes Aridaith¹, Avila-Alejandre Alma Xochil¹, Galero-Martínez Nelda Xanath¹, Hernández-López Alejandro^{1,2*}

¹ Universidad del Papaloapan Campus Tuxtpec., Circuito Central 200, Parque Industrial, San Juan Bautista Tuxtpec. C.P. 68301 Oaxaca, México.

² Sistema Producto Nopal del Distrito Federal A.C. Sonora sur n.2 Barrio Los Angeles, Milpa Alta, C.P. 12000 CDMX, México
Correo electrónico del autor de correspondencia. Email: *alehz74@yahoo.com.mx

INTRODUCCIÓN

Byrsonima crassifolia esta distribuido desde México hasta Brasil. La variedad dulce es muy apreciada por sus frutos muy aromáticos y de sabor característico, no así la variedad ácida (1,3). La explotación comercial en México, se encuentra limitada a la recolección de frutos en la temporada(2).

En la medicina tradicional se ha reportado que la hoja tiene propiedades diuréticas, anticonvulsivas, antieritema, antierisipela, antívomito, antihemorroides, disminuye el dolor de cabeza, el de garganta, es purgante, desinflamatoria e hipoglucemiantes(3).

Sin embargo, la información sobre sus propiedades es escasa y aunque existen reportes de usos comerciales y medicinales, éstos no se han basado en trabajo científico.

El objetivo de este trabajo es determinar la actividad antioxidante del nanche agrio para determinar su potencial biotecnológico.

Se calculó la actividad antioxidante de los tres extractos en mEquAA/g. En la Figura 2 se muestran los resultados. Los tres extractos muestran capacidad antioxidante, sin embargo, el extracto etanólico tiene la mayor cantidad de mEquAA/g (86.70±9.2), seguido del Cloruro de metileno (25.09±9.3) y finalmente el extracto hexánico (11.3±3.6).

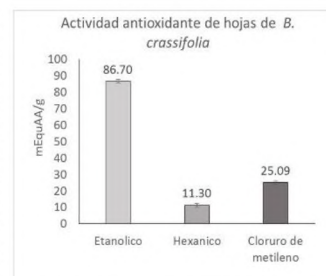


Figura 2. Actividad antioxidante de los extractos de *B. Crassifolia*

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de harina tamizada de 80%. El rendimiento de los extractos etanólico, hexánico y cloruro de metileno fue de 4.7, 0.67 y 1.35 % respectivamente.

Se realizó una curva de inhibición del DPPH con diferentes concentraciones de ácido ascórbico Figura 1. Los resultados en adelante, se presentaran en forma de Mliequivalentes de ácido ascórbico (mEquAA) y de % de inhibición.

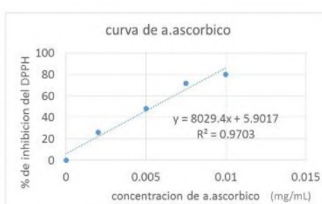


Figura 1. Curva de inhibición del DPPH por las diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

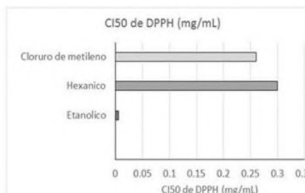


FIGURA 3. Concentración inhibitoria 50 sobre la actividad oxidante de DPPH en los extractos de *B. Crassifolia*.

La concentración requerida para inhibir el 50% de la actividad oxidante de DPPH, se observan en la Figura 3. El extracto etanólico muestra un mayor poder antioxidante, ya que se requiere 43 y 50 veces menos cantidad para inhibir al 50% de la actividad oxidante del DPPH.

Resulta interesante que el extracto etanólico tenga un alto contenido de miliEquiv AA y una alta actividad antioxidante, reportes de actividad antioxidante en otras plantas, con alto potencial biotecnológico, muestran valores similares por ejemplo, *M. oleifera*, (75%) (4), flores de plátano cuya IC50 es de .77mg/mL en extractos metanólicos (5). Es necesario profundizar en el estudio del extracto para determinar la especie química de dicha actividad.

CONCLUSIONES

Se determinó que las hojas del árbol *B. crassifolia* tienen una buena actividad antioxidante, comparadas con otras plantas de alto potencial biotecnológico. Y tiene una IC50 comparativamente baja respecto de otras plantas de alto potencial biotecnológico. Ambas características se presentan en todos los extractos pero el extracto etanólico es 43 y 50 veces, más alto que en el cloruro de metileno y el hexánico respectivamente. Por lo que se considera que la hoja de Nanche agrio podría ser una fuente de compuestos antioxidantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kunth(1822). Nova Genera et Species. *Plantarum* 5: 149.
- Bayuelo-Jiménez J, Lozano Rico J, Ochoa I.(2006). Caracterización morfológica de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth nativa de Churumuco, Michoacán, México *Revista Fitotecnia Mexicana* 29:31-36.
- SEMARNAT (2017). Sistema Nacional de Información Forestal. Disponible En línea <http://www.semarnat.gob.mx> <http://www.cnf.gob.mx:8090/snif/portal/libraries/phpsnif/usuariosPDF.php?especieURL=ByrsonimaCrassifolia>. (mayo 1 2017).
- Singh BN, Singh BR, Singh RL, Prakash D, Dhakarey R, Upadhyay G, Singh HB (2009) Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem Toxicol.* 47:1109-16.
- Schmidt M, Prestes RC, Kubota EH, Scapin G & Mazutti MA (2015) Evaluation of antioxidant activity of extracts of banana inflorescences (*Musa cavendishii*), *CyTA - Journal of Food*, 13:4, 498-505.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por el proyecto oficio n° DSA/103.5/16/10314. Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC 2016

Parra Reyes Aridaith, Alma Xochil Ávila Alejandro, Hernández López Alejandro. Actividad Antimicrobiana de *Byrsonima crassifolia*. (cartel) 4to. Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria 2018 2da. Exposición de carteles en la UNPA, San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca.



Universidad del Papaloapan
Cuerpo Académico "Estudios Multidisciplinarios"

Otorga el presente

Reconocimiento

a:

Aridaith Parra Reyes
Alma Xochitl Ávila Alejandro

Por la presentación del cartel de investigación con el tema:
"Actividad antimicrobiana de *byrsonima crassifolia*"

Asesorado por: *Dr. Alejandro Hernández López*
en el **4to. Encuentro Regional de Investigación Multidisciplinaria**
Tuxtepec, Oaxaca., a 05 de octubre del 2018


M. C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico


VICE-RECTORIA
ACADEMICA


M. C. Bertha López Azamar
Representante del Cuerpo Académico

“No hay investigación pequeña”

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Byrsonima Crassifolia*

Aridaith Parra Reyes, ary_parra95@hotmail.com, Ingeniería en biotecnología
Alma Xochiit Ávila Alejandre, axa76@yahoo.com.mx, Biología Experimental
Alejandro Hernández Lopez, alehz74@yahoo.com.mx, Biología Experimental

INTRODUCCION

El nanche (*Byrsonima crassifolia*) es un árbol ampliamente distribuido en la zona de Tuxtepec, Oaxaca. Debido a que se utiliza como alimento, medicina herbolaria y para reforestar áreas con suelos pobres⁽¹⁾. El fruto de las variedades dulces, tienen una gran importancia comercial⁽²⁾.

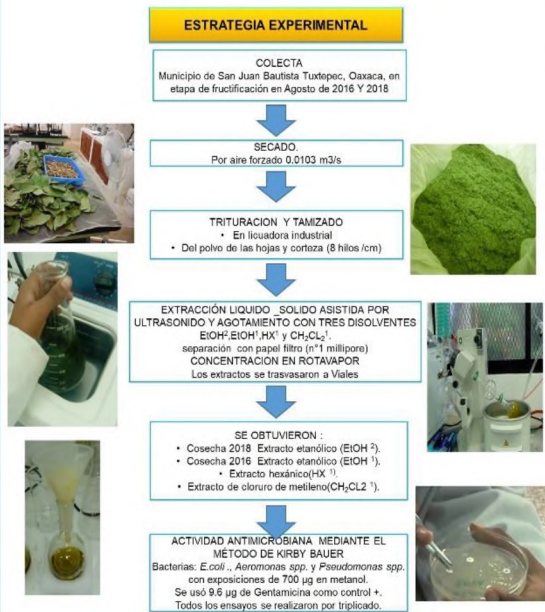
En la medicina tradicional, se ha reportado el uso mediante infusiones de hojas y corteza y se les atribuyen propiedades antiarreicas, astringentes, antiinflamatorias y antioxidantes^(1,2,3).

Sin embargo, la información científica de las actividades biológicas de esta planta son escasas. Por lo que es necesario seguir las investigando.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es determinar la actividad antimicrobiana de hojas y corteza de *Byrsonima crassifolia* y determinar si la actividad se mantiene tras un año de almacenamiento de los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizaron 3 especies bacterias (*E. coli*, *Aeromonas spp.* y *Pseudomonas spp.*) para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de hoja y corteza y se observó que para *E. coli*, todos los extractos tienen actividad antimicrobiana, tanto los de corteza como los de hoja. Los halos de inhibición son similares entre todos los extractos. (Figura 1). Adicionalmente, no existen diferencias entre el extracto EtOH¹ y EtOH².

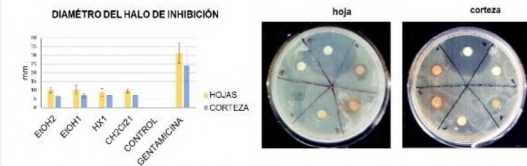


Figura 1. Actividad antimicrobiana de hoja y corteza con *E. coli*. (n=3)

En el caso de la bacteria *Aeromonas spp.*, se observó que para hoja el único extracto con actividad fue EtOH tanto 1 como 2 (Figura 2).

En los extractos de corteza con la bacteria *Aeromonas spp.* se observó que todos los extractos inhiben la bacteria a diferente susceptibilidad, siendo los mas activos EtOH 1 y 2 (Figura 2.)



Figura 2. Actividad antimicrobiana de hoja y corteza con *Aeromonas* (n=3)

En el caso de la bacteria *Pseudomonas spp.*, en los extractos de hoja y corteza se observó que los extractos EtOH 1 y 2 son los que tienen halos de inhibición (Figura 3). Siendo mayor la actividad para el extracto EtOH² de la hoja.

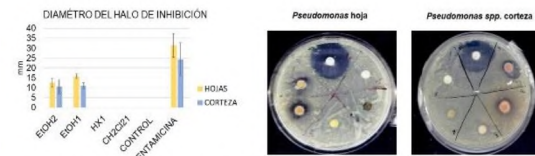


Figura 3. Actividad antimicrobiana de hoja y corteza con *Pseudomonas* (n=3)

Los resultados se comportan de manera similar a lo reportado en otras plantas como *Cestrum buxifolium Kunt* en donde se ha reportado que la actividad antibiótica se concentra en los extractos etanólicos⁽⁴⁾.

Los extractos actúan de manera selectiva, ya que no tienen un efecto homogéneo en todas las bacterias. La bacteria mas sensible fue *Aeromonas spp.* seguida de *Pseudomonas spp.* y *E. coli*.

La bacteria *Aeromonas spp.* es muy sensible a los extractos de nanche esto es importante ya que está considerado dentro de los patógenos emergentes a nivel mundial y se asocia a cuadros infecciosos gastrointestinales y de la piel. Es un genero de importancia clínica que tiene que ser tratado mediante nuevas sustancias que lo puedan inhibir⁽⁵⁾.

Finalmente, los estudios muestran que el nanche de la Región de Tuxtepec, tiene un potencial biotecnológico, pero se requieren mas estudios a fin de caracterizarlo mejor, ya que las referencias al respecto son escasas.

CONCLUSIÓN

- Los resultados parecen mostrar que *Byrsonima crassifolia* tiene actividad antimicrobiana.
- La actividad antimicrobiana de *B. crassifolia* se concentra en el extracto etanólico.
- Existen diferencias en la susceptibilidad al extracto entre las diferentes bacterias empleadas.
- *Aeromonas spp.* es una bacteria emergente de importancia clínica por lo que es interesante que sea muy susceptible al extracto EtOH.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moreno Leon G.R. (2015). Evaluación in vitro de la capacidad antioxidante del extracto del fruto del nanche (*Byrsonima crassifolia*). (Tesis de Maestría). Disponible en: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46746/MorenoLeonGerman.pdf?sequence=2>.
2. Roldán-Sabino, C., Viñas-Bravo, O., Parra-Reyes, A., Galero-Martínez, N.X., Ávila-Alejandre, A.X., Hernández-López, A. (2018). *Journal of Bioengineering and Biomedicine Research*. 2:1-17.
3. De Souza R., Alvez, G., Forte, A., Marquês, F., Da Silva, D., Rogez, H., Fonseca, M. (2017). *Byrsonima Crassifolia* extract and fraction prevent UVB-induced oxidative stress in keratinocytes culture and increase antioxidant activity on skin. *Industria Crops and Products*. 108:485-494.
4. Corzo Barragan D.C. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of ethanolic extract of *Cestrum buxifolium* Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 43(3): 62-64. recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-01952012000300009&scit=sci_arttext.
5. Sanchez Verela A., Rodriguez Luna I.C. y Wu Guo X. (2017). revisión de la caracterización de aeromonas spp. y su importancia clínica. *Revista Boliviana de Química*. 34(5): 133. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/pdf/rbq/v34n5/v34n5_a01.pdf

Sección de materiales y métodos

7.4 Reactivación de cepas

Tinción de Gram

Se hizo un frotis de manera normal, se se fijó con calor, pasándose el portaobjeto rápidamente 2 o 3 veces por la flama del mechero. Después se colocaron dos varillas de vidrio sobre la tarja y se colocó encima la preparación fijada, se agregaron 2 gotas de cristal violeta por 1 minuto y después se lavó con agua destilada, se cubrió con 2 gotas de Lugol por 30 segundos, posteriormente se lavo y se aplicó el decolorante y se lavó de inmediato con agua, posteriormente se aplicaron 2 gotas de safranina reposando por 30 segundos y se lavó con agua, después de secarse se observo al microscopio con el objetivo 100 X (Rodríguez y Arenas 2018; Coico, 2005). Repitiéndose para cada una de las bacterias.

7.4.2 Tinción Schaeffer-Fulton

Se hizo un frotis de manera normal, se se fijó con calor. Se tiño con el reactivo verde malaquita 5% por 5 minutos evitando que se secase el colorante añadió un poco más del reactivo y se lavó con agua destilada, posteriormente se cubrió con safranina por 30 segundos, se lavó y después de secarse se observo al microscopio con el objetivo 100 X (Ragazzo-Sánchez et al., 2011). Este procedimiento se realizó en todas las bacterias.

7.4.3 Prueba de catalasa

Se realizaron medios líquidos de LB y AN para sembrar a las bacterias, se añadió 5 ml de medio y se añadió con el asa bacteriológica, la muestra de la bacteria, se llevaron a incubar a 37° C por 24 a 36 horas, de la las bacterias sembradas en medios líquidos se tomó una muestra de 400 µl y se añadió a un tubo, donde también se añadieron 800 µl de peróxido de hidrógeno y se dejó reposando por 1 minuto. Este procedimiento se realizó en cada una de las bacterias.