BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

“Propiedades antibacterianas del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ”

Tesis para obtener el grado de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ELENA DANIELA GOMEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ALEJANDRO CRUZ MÉRIDA

ASESOR DE TESIS: DR. NEMESIO VILLA RUANO

ABRIL 2026

Facultad de Ciencias Biológicas
BUAP

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento a mis maestros científicos, a los Doctores Jorge Alejandro Cruz Mérida y Nemesio Villa Ruano, por enseñarme el camino de la ciencia. Además de proporcionar las herramientas necesarias para cada etapa del presente trabajo.

Extiendo mi gratitud a mi mentor, al M.C. Eric Reyes Cervantes, por enseñarme a ser una científica con entusiasmo y satisfacción personal, así como por su constante disposición para escuchar, orientar y brindar el apoyo necesario en todas mis ideas.

A la M.C. Wendy Abril Coyotl Pérez, por su constante apoyo y su generosa disposición para compartir conocimientos y brindar asesoría durante la elaboración y presentación de este trabajo. Asimismo, agradezco su ejemplo y compromiso, que representan una valiosa inspiración.

Al M.C. José Alejo, Gabo, Ángel, Noé, María Elena, por brindarme su apoyo en DITCo BUAP.

Con gratitud reconozco el apoyo a lo largo de mi formación académica, a las Dras. Nora Hilda Rosas Murrieta, Julia María Alatorre Cruz, Cristina Lara Ochoa, Dolores López Morales y la Mtra Mariyadi Rosas.

A mis amigos, Iván, Brenda y Cristi, por acompañarme en este camino y brindarme su apoyo tanto dentro como fuera del laboratorio.

A mi amigo y colega Hugo, así como a mi prima Fatima, por acompañarme en este camino académico dentro de la Biotecnología y en la experiencia de ser foráneo, por compartir la montaña rusa del quehacer científico.

A Zuri, Sam, Ludwin y sus padres, por recibirme como familia, durante mi estancia en Puebla y su apoyo incondicional.

A la familia Rebollar Piña por su acompañamiento continuo en las buenas y las malas.

A mis amigos, Moy, Cesar Iván y Odi, por el humor y los buenos momentos de estos años.

Al Dr. Efrain de DitCo BUAP, por brindarme su apoyo en el laboratorio, y al Dr. Ramiro del herbario UNAM por ayudarme con la identificación de la especie vegetal en estudio.

D E D I C A T O R I A

Dedico el presente trabajo, fruto de un arduo trabajo a Dios en primera instancia por llevarme por este camino.

A mis padres, Lorena Rodríguez López, Herminio Viruel de la Rosa y mi hermana Monserrat compañera de vida, por enseñarme el valor del trabajo constante y por estimular mi curiosidad, creatividad y capacidad de observación, incluso desde aquella convivencia que marcó mi camino. Gracias por apoyarme en la elección de esta carrera y por impulsarme a desarrollar esta investigación, alentando mi interés por explorar las plantas de nuestra región.

A mi abuela Elena, hasta el cielo, por darme apoyo incondicional en cada aspecto de mi vida.

A mi tía Mabel por comprarme mi primer microscopio y juego de química, por su acompañamiento cercano lo largo de estos años.

A Wilmer Gersai, por caminar a mi lado durante estos cinco años de formación profesional, por confiar en mis capacidades y por acompañarme con cariño, respeto y apoyo constante a lo largo del desarrollo de esta investigación y vida.

ÍNDICE

RESUMEN **12**

ABSTRACT **13**

1.INTRODUCCIÓN **14**

2.MARCO TEÓRICO **16**

2.1 Plantas medicinales en México 16

2.2 Definición de extracto botánico 17

2.3 Extractos botánicos para fines antimicrobianos 19

2.4 Métodos de extracción de metabolitos secundarios de plantas 20

2.4.1 Extracción botánica por métodos convencionales 20

2.4.2 Extracción botánica por métodos modernos 22

2.5 Clases de solventes usados en las extracciones botánicas 24

2.5.1 La constante dieléctrica en la selección de solventes para extracción vegetal 25

2.6 Técnicas aplicadas a la caracterización de fitoquímicos 26

2.6.1 Cromatografía 26

2.6.2 Cromatografía en columna 26

2.6.3 Cromatografía de placa fina (TLC) 26

2.7 Metabolitos secundarios de los extractos vegetales 26

2.7.1 Glicósidos 27

2.7.2 Compuestos aromáticos 27

2.7.3 Terpenos 29

2.7.4 Alcaloides 29

2.8 Técnica aplicada a la evaluación de extractos vegetales 29

2.9 Evaluación con resazurina 30

2.9.1 Microdilución en caldo con resazurina 30
2.10 Familia Fabaceae.....31
2.11 Generalidades de *Ramirezella strobilophora (R. strobilophora)* 31
2.11.1 Descripción botánica de la especie en estudio.....32
2.11.2 Distribución geográfica de *Ramirezella strobilophora*.....32
2.12 Estudios previos de uso Biotecnológico de la familia Fabaceae.....33
2.13 Estudios previos de extracto metanólico de *R. strobilophora* 34
2.13.1 Estudios previos de extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* con fines biotecnológicos.....34
2.14 Bacterias ensayadas.....34
2.14.1 *Staphylococcus aureus (S. aureus)* 34
2.14.2 *Escherichia coli*.....35
3.JUSTIFICACIÓN.....36
4.HIPÓTESIS.....37
5. OBJETIVOS.....37
5.1 OBJETIVO GENERAL 37
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....37
6. MATERIALES Y METODOS.....38
6.1 Sitio de estudio 38
6.2 Estandarización del método de extracción de *Ramirezella strobilophora* con etanol.....39
6.3 Separación de las fracciones del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora,* mediante cromatografía de capa fina (TLC). 39
6.4 Separación de los componentes en fracciones correspondientes al extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora*, mediante cromatografía en columna 40
6.5 Determinación de MIC (concentración mínima inhibitoria) mediante ensayo de microdilución en caldo con resazurina 41

6.5.1 Preparación de las bacterias....41
6.5.2 Preparación del extracto etanólico de *R. strobilophora* 41
6.5.3 Preparación de las fracciones de extracto etanólico de *R. strobilophora* 41
6.5.4 Preparación de placa de 96 pozos con resazurina como agente redox 41
6.5.5 Determinación de absorbancia de placa multipozos 42
6.5.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)....42
6.6 Determinación de MIC control con ampicilina 43
6.7 Determinación de porcentaje de inhibición y IC_{50} para las bacterias ensayadas 43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 44
7.1 Identificación de ejemplar colectado 44
7.2 Estandarización del método de extracción de *Ramirezella strobilophora* con etanol....44
7.3 Separación de las fracciones del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora,* mediante cromatografía de capa fina (TLC) 45
7.4 Fraccionamiento de los componentes de *Ramirezella strobilophora* mediante cromatografía en columna 46
7.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante microdilución en caldo con resazurina....49
7.6 Determinación de la MIC mediante ensayo de microdilución en caldo con resazurina con las fracciones de cromatografía en columna 54
7.7 Determinación de MIC resultantes de TLC y cromatografía en columna 76
7.8 Determinación de MIC control con ampicilina 78
7.8 Determinación de porcentaje de inhibición y IC_{50} para las bacterias ensayadas 79
8. CONCLUSIONES 95
9. PERSPECTIVAS 96
10. BIBLIOGRAFÍA 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de los solventes convencionales
Figura 2	Acción de la resazurina en un ensayo bacteriano
Figura 3	Organización de taxones para la clasificación de *Ramirezella strobilophora*
Figura 4	Distribución de *R. strobilophora* en México
Figura 5	Diagrama de resumen de metodología aplicada
Figura 6	Señalización del sitio de recolección. Elaboración propia
Figura 7	Orden de variables colocadas en la placa multipozos de Elisa
Figura 8	Orden de realización de cálculos para determinar concentración final por pozo
Figura 9	Holotipo de *Ramirezella strobilophora* depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Herborizada.
Figura 10	Separación de compuestos por TLC
Figura 11	Sistema de desarrollo de para la separación del extracto etanólico de *R. strobilophora* mediante TLC.
Figura 12	Columna cromatográfica empacada con silica
Figura 13	Obtención de 7 fracciones
Figura 14	Ensayos de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 1
Figura 15	Ensayos de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 2.
Figura 16	Ensayos de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 3.
Figura 17	Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina con fracción 1

Figura 18 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina con fracción 2
Figura 19 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina con fracción 3
Figura 20 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 4
Figura 21 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5
Figura 22 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 6
Figura 23 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 7
Figura 24 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 1
Figura 25 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 2
Figura 26 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 3
Figura 27 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 4
Figura 28 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5
Figura 29 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 6
Figura 30 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 7
Figura 31 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 1
Figura 32 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 2

Figura 33 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 3
Figura 34 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 4
Figura 35 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5
Figura 36 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 6
Figura 37 Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 7
Figura 38 MIC para antibióticos de referencia con *S.aureus*
Figura 39 MIC para antibióticos de referencia con *E.coli*
Figura 40 Resultado de dosis respuesta con fracción 1 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*
Figura 41 Resultado de dosis respuesta con fracción 2 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*
Figura 42 Resultado de dosis respuesta con fracción 3 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*
Figura 43 Resultado de dosis respuesta con fracción 4 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*
Figura 44 Resultado de dosis respuesta con fracción 5 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*
Figura 45 Resultado de dosis respuesta con fracción 6 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

Figura 46 Resultado de dosis respuesta con fracción 7 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

Figura 47 Resultado de dosis respuesta con fracción 1 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

Figura 48 Resultado de dosis respuesta con fracción 2 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

Figura 49 Resultado de dosis respuesta con fracción 3 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

Figura 50 Resultado de dosis respuesta con fracción 4 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

Figura 51 Resultado de dosis respuesta con fracción 5 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

Figura 52 Resultado de dosis respuesta con fracción 6 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

Figura 53 Resultado de dosis respuesta con fracción 7 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tipos de extracto
Tabla 2	Métodos de extracción
Tabla 3	Métodos modernos de extracción botánica
Tabla 4	Constante dieléctrica para algunos solventes
Tabla 5	Estados de México de distribución de la especie en estudio
Tabla 6	Generalidades del estafilococo dorado
Tabla 7	Generalidades que considerar de *Escherichia coli*
Tabla 8	Orden de vertido de los solventes a la columna, de menor a mayor polaridad
Tabla 9	Orden de menor a mayor grado de constante dieléctrica, así como su clasificación de polaridad
Tabla 10	Concentrado de las MIC para *S.aureus* y *E. coli*
Tabla 11	Concentrado de las MIC para *S.aureus,* de la columna 1
Tabla 12	Concentrado de las MIC para *S.aureus,* de la columna 2
Tabla 13	Concentrado de las MIC para *S.aureus,* de la columna 3
Tabla 14	Comparación de las MIC más bajas, entre las réplicas de la columna
Tabla 15	IC_{50} de las bacterias ensayadas

RESUMEN

El presente estudio evaluó el potencial antimicrobiano del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora*, una liana de la familia Fabaceae distribuida en la región de selva baja caducifolia de Oaxaca. Dado que esta especie carece de estudios fitoquímicos profundos y de actividad biológica previos, se planteó analizar la actividad antimicrobiana de sus metabolitos secundarios frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, dos patógenos incluidos dentro de las categorías de prioridad alta por la OMS. La materia vegetal se sometió a extracción etanólica por maceración, obteniéndose un rendimiento del 13 % p/p. Posteriormente, el extracto fue fraccionado mediante cromatografía de capa fina y cromatografía en columna utilizando solventes con gradientes de polaridad creciente, lo que permitió separar principalmente compuestos fenólicos. Las siete fracciones obtenidas por cromatografía en columna y las tres fracciones derivadas de la TLC se evaluaron por microdilución en caldo utilizando resazurina como indicador de viabilidad redox para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Los resultados mostraron que las fracciones ejercieron actividad antimicrobiana diferencial entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. En *S.aureus*, la inhibición se presentó principalmente en concentraciones entre 0.01 y 0.07 mg/mL, aunque algunas fracciones no tuvieron efecto. En *E. coli*, todas las fracciones mostraron actividad, con MICs entre 0.01 y 0.08 mg/mL, destacando una inhibición consistente y colorimetría uniforme. Esta mayor susceptibilidad podría relacionarse con la permeabilidad de la membrana externa de bacterias Gram negativas y con la afinidad de fenoles reportada en la literatura para alterar membranas y sistemas enzimáticos. Los hallazgos constituyen el primer análisis fitoquímico-biológico del extracto etanólico de *R. strobilophora* para su futuro uso biotecnológicos. Se evidencia su potencial como fuente de compuestos antibacterianos, estableciendo un antecedente para futuras investigaciones hacia una caracterización fitoquímica más profunda y la elucidación de sus propiedades farmacológicas.

Palabras clave: *Ramirezella strobilophora, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, extracto vegetal, inhibición del crecimiento, fraccionamiento químico.

ABSTRACT

The present study evaluated the antimicrobial potential of the ethanolic extract of *Ramirezella strobilophora*, a vine belonging to the Fabaceae family distributed in the low deciduous forest region of Oaxaca. Given the lack of previous phytochemical and biological activity studies on this species, the aim was to analyze the antimicrobial activity of its secondary metabolites against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, two pathogens classified within the high-priority category by the WHO. The plant material was subjected to ethanolic extraction by maceration, yielding 13% w/w. Subsequently, the extract was fractionated using thin-layer chromatography and column chromatography with solvents of increasing polarity gradients, which enabled the separation of phenolic compounds as the predominant constituents.

The seven fractions obtained by column chromatography and the three fractions derived from TLC were assessed by broth microdilution using resazurin as a redox viability indicator to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed that the fractions exerted differential antimicrobial activity between Gram-positive and Gram-negative bacteria. In *S.aureus*, inhibition occurred mainly at concentrations ranging from 0.01 to 0.07 mg/mL, although some fractions showed no effect. In *E. coli*, all fractions demonstrated activity, with MIC values between 0.01 and 0.08 mg/mL, highlighting consistent inhibition and uniform colorimetric patterns. This greater susceptibility may be related to the permeability of the outer membrane characteristic of Gram-negative bacteria, as well as to the affinity of phenolic compounds reported in the literature to disrupt membranes and enzymatic systems.

These findings comprise the first phytochemical biological analysis of the ethanolic extract of *R. strobilophora*, supporting its potential future biotechnological applications. The results demonstrate its value as a source of antibacterial compounds and establish a foundation for further research aimed at deeper phytochemical characterization and elucidation of its pharmacological properties.

Keywords: *Ramirezella strobilophora, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*, plant extract, growth inibition, chemical fractionation.

1. INTRODUCCIÓN

La megadiversidad de México y sus estados se refleja en la gran variedad de plantas que alberga, las cuales constituyen un recurso clave para la Biotecnología nacional, en la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano frente a bacterias patógenas. El uso de plantas medicinales para mitigar afecciones comunes forma parte de nuestra costumbre, tradición y cultura. Actualmente, se integran en la dieta debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, analgésicas, neuroprotectoras y en los últimos años, anticancerígenas (Ordoñez *et al*., 2020).

Existen cerca de 250 a 500 mil especies de plantas en el planeta tierra. No obstante, solo del 1 al 10% de estas especies vegetales se emplean como alimentos por humanos, así como para animales. La popularidad de los extractos vegetales aumento desde fines de la década de 1990. Las propiedades antimicrobianas de los extractos vegetales han sido investigadas por todo el mundo. En América latina, una investigación probó 122 especies de plantas ya conocidas para tratamientos terapéuticos (Shiriki *et al*., 2019).

Esta relevancia se refleja en estudiar a especies como *Ramirezella strobilophora (R. strobilophora)*; esta planta trepadora se distribuye desde el norte de México hasta Nicaragua, principalmente en climas tropicales. La muestra utilizada en el estudio previamente mencionado proviene de Oaxaca, fue recolectada en un ecosistema de selva baja caducifolia (Conabio, 2016).

Entre los metabolitos responsables de las propiedades de las plantas, los terpenos destacan por conferir olor y sabor, siendo el conjunto más extenso y diversificado de compuestos naturales presentes principalmente en el reino Plantae. Por su parte, las quinonas y los taninos contribuyen a la pigmentación; estos últimos son compuestos polifenólicos solubles en agua, presentes en plantas vasculares (Bañuelos *et al*., 2019).

El estudio de estas moléculas cobra especial relevancia ante la creciente amenaza de bacterias patógenas resistentes a antibióticos. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la primera lista de “patógenos prioritarios”, identificando doce familias de bacterias peligrosas para la salud humana. La lista se organiza en tres categorías según la urgencia en el desarrollo de nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta y media, en la que *Staphylococcus aureus (S.aureus)* se clasifica como prioridad media. Su publicación busca orientar y promover

la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como parte de las estrategias de la OMS para combatir la resistencia a antimicrobianos (World Health Organization, 2017).

S. aureus es una bacteria Gram positiva que provoca una amplia variedad de afecciones, desde infecciones cutáneas hasta del sistema nervioso central. Su tratamiento se complica por el surgimiento de cepas multirresistentes, como el SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina). Este microorganismo forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas, especialmente la nasal, presente en el 20-30% de los seres humanos. Cuando su entorno se altera, actúa como patógeno oportunista debido a sus factores de virulencia y su capacidad de adquirir resistencia a múltiples antibióticos. Además, su presencia en alimentos indica contaminación, reflejando una manipulación inadecuada en la cadena productiva (Taylor y Unakal, 2023, Segarra y Cárdenas, 2021).

En contraste, *Escherichia coli* (*E. coli*) es un bacilo Gram negativo causante de enfermedades diarreicas, como la diarrea del viajero y la disentería, así como infecciones extraintestinales como neumonía, bacteriemia e infecciones abdominales. Estas enfermedades representan una carga significativa para los pacientes y el sistema de salud, por lo que su identificación y tratamiento oportuno resultan fundamentales (Mueller y Tainter, 2023). Los contagios de infecciones en el tracto urinario son uno de los más importantes motivos de consulta en atención básica. Los microorganismos que se aíslan de la orina cambian según la historia clínica del paciente. *E. coli* provoca entre el 75-95 % de los casos de cistitis aguda no complicada. En años recientes se ha observado que este microorganismo muestra una sensibilidad cada vez menor frente a los antimicrobianos empleados (Betrán *et al*., 2020).

Frente a estos desafíos, los recursos botánicos medicinales como *R. strobilophora* se presentan como una alternativa biotecnológica. Estas plantas sintetizan diversos metabolitos secundarios, o principios activos, independientes de la producción de macromoléculas principales (carbohidratos, lípidos, proteínas y nucleótidos), con efectos positivos sobre la salud. La OMS define a una planta medicinal como “cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas con fines terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos”. Entre estos principios activos se encuentran los alcaloides, terpenos, glicósidos y compuestos fenólicos, estos últimos de origen vegetal,

comprenden fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, estilbenos, taninos hidrolizados y condensados, lignanos y ligninas (Vilaboa *et al*., 2023). Son los metabolitos secundarios de mayor presencia, originados en su mayoría por la vía del Shikimato a partir de L-fenilalanina y L-tirosina, y se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hidroxilo enlazados directamente al anillo aromático (Kumar y Goel, 2019).

La industria farmacéutica basada en productos herbales ha experimentado un crecimiento significativo a nivel mundial, con una producción anual estimada en aproximadamente 35 mil millones de dólares (Heredia *et al*., 2020).

En este marco, la investigación sobre *Ramirezella strobilophora* en el presente trabajo, permite asentar la primera evaluación de su potencial como fuente de agente antimicrobiano, gracias a sus metabolitos secundarios, contribuyendo al conocimiento científico y al aprovechamiento Biotecnológico de la biodiversidad mexicana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Plantas medicinales en México

Las plantas medicinales son el patrimonio biocultural de diversas sociedades alrededor del mundo (Casanova *et al*., 2022). La medicina convencional y actual no ha aportado un tratamiento efectivo para todas las enfermedades existentes derivadas de virus, hongos o bacterias. Por este motivo los investigadores intentan utilizar medicamentos a base de hierbas en ensayos clínicos y de laboratorio. La medicina integrativa como concepto holístico debe abrirse paso a la búsqueda de opciones viables que puedan contender estas patologías (Ishimine *et al*., 2021).

Velázquez *et al.* (2019) señalan que la sabiduría sobre la aplicación de plantas como disyuntiva en la medicina, ha sido una costumbre tradicional que se ha transferido a través del tiempo. Se tiene en cuenta que al menos 35 000 especies botánicas exponen capacidad para uso medicinal y aproximadamente el 80% de los habitantes a nivel mundial utiliza fitoterapia tradicional.

La OMS, explica que una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos, de igual forma señala que el 80% de la

población terrestre, utiliza plantas como esencial cura medicinal. En México su uso se ha documentado desde las culturas mesoamericanas, esta praxis se ha mantenido debido a la diversidad de la flora, la apertura a los servicios de salud, las tradiciones etc. (Ramirez *et al*., 2023, Velázquez *et al*., 2021). Las investigaciones de la etnomedicina o medicina tradicional con relación al uso de las plantas, la constante son las comunidades indígenas o áreas rurales. Actualmente la Biotecnología está valiéndose de la etnomedicina, en consecuencia, se han descubierto diversos compuestos bioactivos en los diferentes órganos de estas como cortezas, semillas, frutos, bulbos, cascaras, raíces, tallos, hojas, y flores, existiendo estas dos últimas como las más utilizadas (Reimers *et al*., 2023).

En México la medicina natural es una selección que ha sido apreciada de manera ancestral en las culturas y subculturas étnicas, afrodescendientes, mestizas, urbanas y rurales del país. Hoy en día este tipo de alternativas es empleada de manera multidisciplinaria a la biomedicina, la medicina industrial, los fármacos químicos de patente (Flores y Franco, 2021).

En la actualidad, se estima la subsistencia de 3103 especies de plantas medicinales, patrimonio que ha dado fruto de la interacción trascendental establecida por la sociedad con la naturaleza, cabe señalar que estos dos elementos mencionados tienen un vínculo con las variantes de lenguas indígenas registradas en Mexico, lo que ha resultado en la conceptualización como diversidad biocultural (Ortega *et al*., 2019).

2.2 Definición de extracto botánico

Se puede definir como un bioproducto que se compone de material de origen botánico, es el resultado de disolver los componentes solubles de las plantas en disolventes de extracción y separarlos de la materia vegetal no disuelta. También se puede definir como “la mezcla compleja y multicomponente obtenida después de usar un disolvente para disolver los componentes del material botánico”. El etanol es un solvente polar apto para extraer un amplio abanico de compuestos bioactivos como alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos y fenoles; conservando su estabilidad y actividad biológica (Monagas *et al.,* 2022)

Según el Capítulo General (565) Extractos Botánicos de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), los extractos botánicos pueden clasificarse según su estado físico en líquidos (p. ej., extractos fluidos y tinturas), semisólidos (blandos) o sólidos (secos). (Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2022). Estas formas físicas se definen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Se describen los tipos de extracto, así como su estado físico de este, acompañado de una definición corta según la USP.

Tipo de extracto	**Estado físico de extracto**	**Definición**	**Ejemplos de especies vegetales de la USP**	**Referencia**
Extracto fluido	Líquido	Tipo de extracto líquido que contiene etanol acuoso como disolvente o conservante (o ambos), elaborado de tal manera que cada 1 mL contiene los constituyentes extraídos de 1 g de la materia prima seca que representa, a menos que se especifique otra cosa.	Extracto fluido de *Cimicífuga racemosa.* Extracto fluido de ajo. Extracto fluido de regaliz	Farmacopea de los Estados Unidos de América, 2022
Tintura	Líquido	Extracto líquido preparado con etanol o mezclas hidroetanólicas mediante maceración o percolación. Tradicionalmente, las tinturas de sustancias potentes representan la actividad de 1 g de material vegetal seco en 10 mL de disolvente, y en 5 mL para otras sustancias.	Tintura de *Rhodiola rosea.* Tintura de valeriana	
Extracto blando y oleorresinas	Semisólido o viscoso	Extractos con consistencias intermedias entre las de los extractos líquidos y secos, variando de fluido a espeso o de pasta. Esta consistencia puede ser natural (por extracción con dióxido de carbono supercrítico) o deberse a la evaporación incompleta del disolvente o al	Oleorresina de *Capsicum*	

		contenido natural de agua en la biomasa original.		
Extracto seco	Sólido	Extractos sólidos, disponibles en forma de polvo, escamas o gránulos, obtenidos por evaporación del disolvente utilizado en su producción.	Extracto seco de semilla de guaraná. Extracto seco de flavonoides de naranja amarga	

2.3 Extractos botánicos para fines antimicrobianos

El concepto de actividad antimicrobiana se define como aquella que inhibe o elimina el crecimiento de un microorganismo ya sea hongo o bacteria por mencionar los más comunes, hasta donde se conoce el mecanismo se asocia con la disrupción de la membrana celular. Davidson (1997) lo sintetiza en tres pasos, ruptura de membrana celular, daño a la bicapa fosfolipídica e interferencia con la permeabilidad de la membrana, asimismo Sánchez et al., (2010) señalan como otro mecanismo el cambio de pH intracelular (Clínica Universidad de Navarra, 2025).

La táctica microbiológica de difusión, comprendiendo la difusión en disco de agar y la difusión en pocillo de agar, así como los métodos de dilución como la dilución en caldo y agar, se disponen frecuentemente para determinar la competencia antimicrobiana de un extracto o un aceite esencial (Herrera, 1999).

Existe diversa evidencia científica experimental de cómo los extractos vegetales inhiben el crecimiento bacteriano, tal como lo comprueban con ensayos in vitro Acosta *et al.,* (2019), y colaboradores con el extracto etanólico de *Plantago major* “llantén” para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus.*

Jaramillo *et al.* (2020), puso a prueba el extracto de *Usnea laevis* para contrarrestar el crecimiento fúngico específicamente de *Candida albicans,* obteniendo resultados positivos a su experimento basado en la tecnoca de Kirby-Bauer.

Sierra *et al.,* (2020) realizaron extracciones con diferentes solventes para poder obtener la mayor variedad de compuestos de la extracción de *Persea americana (*Aguacate) variedad

Choquette, al poner a prueba este extracto en contra de *Escherichia coli* encontró inhibición para esta especie bacteriana.

2.4 Métodos de extracción de metabolitos secundarios de plantas

La etapa inicial para la separación de los productos orgánicos de la planta a examinar es la extracción, en la cual los procedimientos más empleados son los que implica el uso de solventes orgánicos. En este ámbito la recopilación de solventes resulta transcendental para alcanzar una segura extracción, por lo tanto, se debe tener en cuenta factores como son la solubilidad, selectividad, viscosidad, costo y seguridad para el uso de estos. Al trabajar con plantas también hay que tomar en cuenta el género, especie, órgano a examinar, y los antecedentes de los metabolitos secundarios que se pueden encontrar (Villagomez *et al.*, 2023).

La extracción de compuestos puede realizarse mediante una amplia variedad de métodos, que incluyen desde procedimientos convencionales con solventes hasta técnicas innovadoras que emplean ultrasonido, microondas u otros sistemas tecnológicos, es el primer paso critico en la preparación para el estudio fitoquímico. Todos estos métodos persiguen un mismo propósito, aprovechar al máximo la extracción de los metabolitos secundarios valiosos a partir del material vegetal de origen para así aprovechar sus bioactividades. Recientemente se han diseñado y refinado distintos métodos de extracción orientados a optimizar la eficiencia y la especificidad en la recuperación de metabolitos (Cardenas *et al*., 2024).

2.4.1 Extracción botánica por métodos convencionales

A pesar del avance de nuevas tecnologías, los métodos convencionales de extracción continúan utilizándose de forma extendida por investigadores e industrias que buscan altos rendimientos de compuestos mediante sistemas de fácil manejo y bajo costo. En la tabla 2 se enlista de manera organizada y breve los métodos de extracción convencional usados en la actualidad (Bitwell *et al.,* 2023).

Tabla 2. Describe los métodos de extracción donde las viñetas distinguen los dos tipos. (Juárez y Velázquez, 2023).

Método	**Descripción**	**Solventes comúnmente usados**	**Desventajas**	**Referencia**

○ *Maceración*	Consiste en sumergir la materia prima vegetal gruesa o en polvo, en un disolvente de interés a temperatura ambiente durante al menos tres días con agitación intermitente.	*Agua *Etanol *Metanol *Mezcla agua-etanol	*Bajo rendimiento *Periodos largos de extracción	Juárez y Velázquez, 2019
○ *Digestión*	Aplica un ligero calentamiento durante el proceso, el calentamiento (35° a 50°C) aumenta la eficiencia del solvente de extracción. El tiempo puede variar de 30 min a 24 hrs.	*Polares *Apolares	*La temperatura puede alterar a los fitoquímicos bioactivos.	
○ *Infusión*	El material vegetal se sumerge en un disolvente en calentamiento (35° a 95°C), particularmente agua, y se deja reposar en un recipiente tapado. Coloquialmente llamado “té”.	*Agua	*Los bioactivos se encuentran muy diluidos en el agua, lo que provoca bajo rendimiento de extracto final.	

○ *Percolación*	Se basa en, hacer pasar un líquido a través de un material sólido gota a gota, saturándose gradualmente de fitoquímicos.	*Etanol	*Tiempo de extracción muy largo *Alto volumen de solvente usado	
○ *Decocción*	Esta técnica es útil para fitoquímicos que no se descomponen ni se modifican con el aumento de la temperatura.	*Agua *Etanol *Metanol *Mezcla agua-etanol	*Puede contener productos indeseables *No es el método ideal para compuestos termolábiles	
○ *Extracción soxhlet*	Es una extracción continua de fitoquímicos, mediante un solvente caliente y un cartucho de papel filtro.	*Polares *Apolares	*Tiempo de extracción muy largo *Riesgo de degradación de compuestos termolábiles	

□ *Extracción continua °Extracción discontinua*

2.4.2 Extracción botánica por métodos modernos

El interés por las tecnologías no convencionales, denominadas “métodos de extracción verde”, ha aumentado considerablemente. Estas técnicas se destacan por ofrecer mayores rendimientos, reducir el consumo de energía, tiempo y recursos, además de requerir una cantidad mínima de disolventes orgánicos (López y López, 2022).

Tabla 3. Métodos modernos de extracción botánica (López y López, 2022).

Método	Descripción	Solventes/ fluido comúnmente usados	Ventajas	Referencia
Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	El mecanismo se debe al comportamiento de las burbujas de cavitación al propagarse con las ondas acústicas, para facilitar la liberación de los fitoquímicos.	*Etanol	*Menores requisitos de energía *Menor tiempo de extracción *Menor volumen de solvente	López y López, 2022
Extracción con fluido supercrítico (SFE)	Utiliza un fluido en su estado supercrítico (temperatura y presión superiores a su punto crítico), actúa como disolvente selectivo para extraer los compuestos.	*CO2	*Método rápido *Automatizable *Selectivo *Menor volumen de solvente *Conveniente para productos termolábiles	
Extracción liquida a presión (PLE)	Hace uso de solventes expuestos a altas temperaturas (siempre debajo de sus puntos críticos), manteniendo a este en estado liquido durante todo el proceso.	*Solventes seguros y amigables con el medio ambiente conocidos como GRAS.	*Mayor rendimiento de extracción	

Extracción con agua subcrítica (SWE)	El agua se presuriza a una temperatura y presión por debajo de su nivel critico al punto de llegar a una constante dieléctrica similar al etanol o metanol.	*Agua	*Uso del extenso rango de la constante dieléctrica del agua *La presión elevada penetra hasta los poros de la materia vegetal *El extracto puede ser ingerido por el cuerpo humano al no ser tóxico	
Extracción asistida por microondas	Utiliza energía de microondas para facilitar la partición de analitos desde la matriz.	*Polares *Apolares	*Método selectivo *Método rápido *Favorece moléculas polares	

2.5 Clases de solventes usados en las extracciones botánicas

Los disolventes o solventes como mayormente se conocen, son también conocidos como compuestos orgánicos volátiles (COV´s). Una gran parte de ellos suelen ser volátiles y por ende estos también son altamente flamables, estos compuestos tienen diversas características que los han llevado a lo largo de la ciencia como los compuestos más utilizados para la solubilización de compuestos fitoquímicos de interés biotecnológico. Los solventes orgánicos convencionales se clasifican en polares, apolares, hidrofílicos, hidrofóbicos, aromáticos y no aromáticos. En la **Figura 1** engloba una variedad de solventes (Santos, 2024).

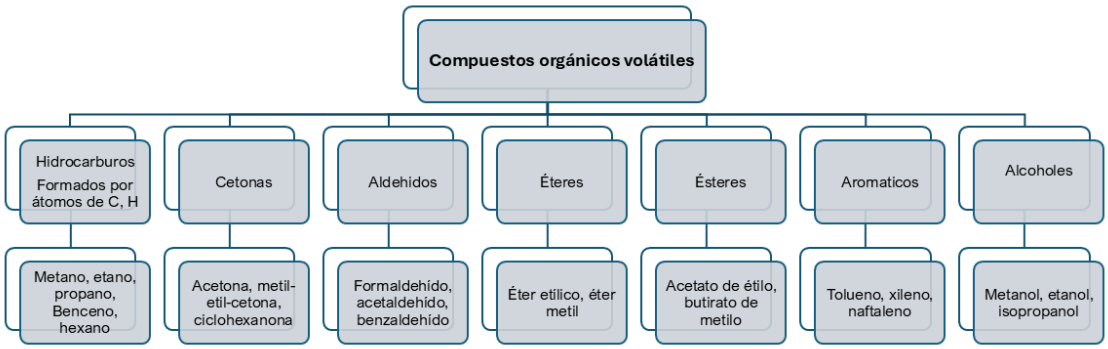


Figura 1. Clasificación de los solventes convencionales (Santos, 2024).

2.5.1 La constante dieléctrica en la selección de solventes para extracción vegetal

La selección del solvente también debe considerar la constante dieléctrica, algunas descritas en la **Tabla 4**, ya que asimismo evalúa la polaridad a través de la cuantificación de esta o también llamada permitividad relativa, se puede definir como el factor por el cual el campo eléctrico entre dos puntos de cargas en el material disminuye en relación con el vacío. Cuanto mayor sea la constante dieléctrica, mayor será la polaridad, lo que podemos resumir en la frase "lo similar disuelve lo similar". Es importante tener presente esta variante al elegir el solvente, puesto que nos ayudara a predecir que fitoquímico estaremos arrastrando en la extracción en proceso con el solvente elegido (Azwanida, 2015).

Tabla 4. Constante dieléctrica para algunos solventes (Mosquera et al., 2012)

Solvente	**Constante dieléctrica (20°C)**
Hexano	1.89
Tolueno	2.4
Diclorometano	8.9
Acetona	20.7
Etanol	24.3
Metanol	32.6
Agua	78.5

2.6 Técnicas aplicadas a la caracterización de fitoquímicos

2.6.1 Cromatografía

La cromatografía es una técnica físico-química de separación en la que las fracciones de una combinación se distribuyen entre dos fases, una fase estacionaria (fija) y una fase móvil (liquido o gas). Como consecuencia a las desigualdades en la afinidad de cada componente por ambas fases, es probable separarlos y analizarlos particularmente (Enciclopedia Britannica, 2025).

2.6.2 Cromatografía en columna

Este tipo de cromatografía se realiza en un tubo angosto que esta empaquetado con un sólido inerte (Sílica gel, por ejemplo), que sostiene a la fase estacionaria en su superficie. La fase móvil (solventes) se mueve entre los espacios abiertos entre los poros del elemento con que se hizo el empaquetamiento, de tal manera que ciertos componentes de la muestra van saliendo al final de la columna respecto a sus características físicas y químicas principalmente por polaridad. También con el fraccionamiento de la muestra, es posible hacer una identificación química (Galvan, 2019).

2.6.3 Cromatografía de placa fina (TLC)

La TLC por sus siglas en inglés (Thin Layer Chromatography), es una metodología de la quimica analítica rápida, económica y sencilla de leer y ejecutar, en la cual se separan los componentes de una muestra, por medio de su migración diferencial a través de una capa delgada de adsorbente, comúnmente sostenido por una superficie plana inmóvil. Gracias a esta técnica se puede determinar el grado de pureza de una fracción, identificar y comprar analitos, en pocas palabras realizar un análisis químico cualitativo (Vallejo *et al*., 2021).

2.7 Metabolitos secundarios de los extractos vegetales

Los metabolitos secundarios son sustancias fabricadas por las plantas, a través de vías laterales a la fotosíntesis que les da la ventaja de adaptarse y sobrevivir a su entorno. Esta moléculas engloban una amplia gama de beneficios tanto en la planta como en otras formas de vida como el ser humano. Influyen en la floración, fruto y la maduración de los frutos o señalan el comportamiento de ecosistema caducifolio (perdida de hojas). Se desempeñan como antimicrobianos y fungen como atrayentes o por el contrario repelentes de otros seres vivos. Se tienen registrados más de cincuenta mil metabolitos secundarios en el reino vegetal. Las hierbas medicinales tradicionales y muchos fármacos modernos dependen de los metabolitos

secundarios para ejercer sus efectos. La diversidad fitoquímica parece ser infinita por los descubrimientos del día a día por lo tanto se abordarán los principales grupos y algunos ejemplos específicos en su uso tradicional y biotecnológico en nuestros días (Reyes *et al.,* 2020).

2.7.1 Glicósidos

Son compuestos orgánicos formados por la unión hemiacetálica entre el grupo reductor de un carbohidrato y un grupo hidroxilo de tipo etanólico o fenólico. Su clasificación se determina principalmente según el número y tipo de unidades de azúcar que contienen. Un ejemplo representativo es la arbutina, un glicósido con propiedades antisépticas de las vías urinarias, presente en altas concentraciones en *Persoonia salicina*. Desde hace muchos años, ciertos glicósidos, especialmente los glucosinolatos, se han aprovechado por su relevancia económica, ya que son los principales precursores de los aceites de mostaza (Barri, 2024).

2.7.2 Compuestos aromáticos

Los compuestos aromáticos contienen en su estructura un anillo de carbono cíclico o bien aromático, a cambio de cadenas lineales o ramificadas. Los dobles enlaces del anillo de benceno absorben eficazmente la radiación ultravioleta, y las variantes en el anillo desplazan la absorbancia hacia longitud de onda mayores, mediante su absorción de diferentes longitudes de onda de luz visible, los flavonoides por ejemplo dan origen a los distintos pigmentos a las plantas y flores (Dai y Mumper, 2010).

2.7.2.1 Fenoles

Los compuestos fenólicos están formados por uno o más anillos aromáticos que llevan grupos hidroxilo. Se hallan de manera generalizada en las plantas y constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos, con más de ocho mil estructuras descritas hasta ahora. Su variedad va desde moléculas sencillas por ejemplo los ácidos fenólicos hasta polímeros de gran tamaño, como los taninos. Estos compuestos participan en la protección vegetal, también intervienen en la pigmentación de tejidos vegetales (Zárate *et al*., 2021).

2.7.2.2 Ácidos fenólicos

El ácido fenólico es esencial durante el crecimiento y reproducción de plantas, cumplen con funciones de defensa que ayudan a hacer frente a factores bióticos y abióticos, estructuralmente hablando se compone de un anillo de benceno con un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo.

Actúan como agentes protectores ante patógenos y tienen propiedades antioxidantes, esta última tiene una correlación con su capacidad antioxidante (Hernández Guiance *et al*., 2019).

2.7.2.3 Flavonoides

Los flavonoides integran abundantes metabolitos y se caracterizan varias clases de acuerdo con el nivel de oxidación de su anillo pirano. En función con los sustituyentes o con la posición del anillo bencénico en el anillo pirano, los flavonoides pueden ser auronas, catequinas, leucoantocianidinas, flavonas, flavonoles o isoflavonoides. Su síntesis es a partir de fenilalanina y 3 de malonil-CoA. A su vez se forman dos grandes clases antocianinas y antoxantinas. Cuando son ingeridos mediante vegetales proporcionan efectos antibacteriales y antioxidantes (De Prensa y colaboradores, 2021).

2.7.2.4 Taninos

Los taninos son compuestos presentes en el reino plantea, son moléculas complejas conformadas por alrededor de 12 a 16 grupos fenólicos, las que les otorga una mayor capacidad de interaccionar con otras moléculas de utilidad biológica. En casi toda su totalidad, se dividen en taninos hidrolizables y condensados, ambos tienen función de defensa en el organismo vegetal, en consecuencia, de que disponen propiedades astringentes y anti nutrimentales (impiden la absorción de nutrientes), por esto protegen a la planta de depredadores (Pérez, 2019).

2.7.2.5 Estilbenos

Dentro de los compuestos polifenólicos más importantes están los estilbenos, por ejemplo, el más conocido el resveratrol. Comúnmente están conjugados con ácidos orgánicos, carbohidratos y polifenoles, por esta razón es complicado su separación por métodos de extracción convencionales. Las plantas los producen para usarlos como fitoalexinas, es decir, mecanismo de defensa contra estrés, infecciones patógenas y radiación UV. Como rasgo característico presentan intensa absorción y fluorescencia (Teka *et al.,* 2022).

2.7.2.6 Lignanos

Este polifenol particularmente ha despertado interés por tener una estructura química análoga a los esteroides, por lo tanto, se consideran fitoestrógenos. Tiene como propiedades biológicas ser antinflamatorios, antioxidantes y antitumorales. Constan de dos unidades de propilbenceno acopladas por un enlace Beta-Beta por consecuente pertenecen al grupo de compuestos

difenólicos, por medio de intercambios moleculares en su estructura existen 8 grupos derivados de los lignanos (Rodriguez *et al*., 2019).

2.7.3 Terpenos

Los terpenos, se caracterizan por estar formados a partir de unidades repetidas de isopreno y presentan una notable variabilidad estructural, lo que les permite desempeñar múltiples funciones biológicas. En las plantas, estos compuestos participan activamente en procesos como la defensa frente a patógenos, la atracción de polinizadores y la adaptación a condiciones ambientales cambiantes. Además, muchos terpenos forman parte de los aceites esenciales y son responsables de los aromas y sabores característicos de numerosas especies vegetales como el limoneno presente en cítricos. Desde una perspectiva bioquímica, los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno que los conforman, abarcando desde monoterpenos hasta politerpenos de mayor complejidad (Torres *et al.,* 2021).

2.7.4 Alcaloides

Los alcaloides constituyen un grupo amplio y heterogéneo de metabolitos secundarios caracterizados principalmente por la presencia de uno o más átomos de nitrógeno dentro de su estructura. Este rasgo les confiere propiedades químicas particulares, como su capacidad para formar sales y ejercer una marcada actividad fisiológica. En el reino vegetal, los alcaloides cumplen funciones esenciales relacionadas con la defensa frente a herbívoros, insectos y microorganismos, además de intervenir en diversos procesos metabólicos que favorecen la adaptación de las plantas a su entorno. Compuestos como la morfina, la quinina, la cafeína o la atropina ilustran los ejemplos de este grupo (Wieczorek *et al.,* 2015).

2.8 Técnica aplicada a la evaluación de extractos vegetales

Para evaluar el poder antimicrobiano de los extractos se usan técnicas microbiológicas, la mayoría de estas se describen en el manual **CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute). Una de estas y de las técnicas más usadas para evaluar bacterias versus extracto es la de microdilución en caldo, la cual consiste en emplear un medio líquido, para así construir lo que se conoce como “curva de muerte” o “Time-Kill Assay”; esta metodología da como resultado un modelo de cinética de muerte cuantitativa para los microorganismos en intervalos de tiempo predeterminados (Petiti *et al.,* 2024).

2.9 Evaluación con resazurina

La resazurina se caracteriza por un color azul intenso, no toxico, también conocido como Alamar Blue, fue descubierta por Wselsky (1871). Es ampliamente manejado para diversas áreas como en biología celular, microbiología y en la investigación en el desarrollo de fármacos. Mediante diversas acción físicas y/o químicas la resazurina de color azul originalmente puede transformarse a un compuesto color rosa llamado resorufina, con una fluorescencia comparativamente fuerte en consecuencia de un proceso redox, esto habitualmente ocurre en existencia de enzimas especificas (P. ej. Diaforasa) que funcionan como transportadores de electrones (catalizadores) para promover la reacción de variación estructural inducida por redox, esta reacción es desencadenada por metabólicamente activas o vivas. Tiene como ventaja que es un ensayo con metodología rápida y sensible para evaluar la viabilidad y actividad metabólica de las células vivas (Njoku *et al.,* 2023; Steinmann, 2021).

2.9.1 Microdilución en caldo con resazurina

Esta técnica es usada como indicador cualitativo para probar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales. La microdilución en caldo con resazurina esta estandarizada por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, por sus siglas en ingles) para pruebas in vitro de antibióticos. Una de las ventajas de este método es que es preciso, económico de realizar y fácil de llevar a cabo mediante la adición de colorante de resazurina como indicador redox. Las células bacterianas activas reducen este reactivo a color azul no fluorescente a resorufina fluorescente color rosa (**Figura 2**), que después de ciertas horas puede reducirse aún más a hidroresorufina, lo que proporciona información sobre la actividad metabólica bacteriana (Elshikh *et al.,* 2016).

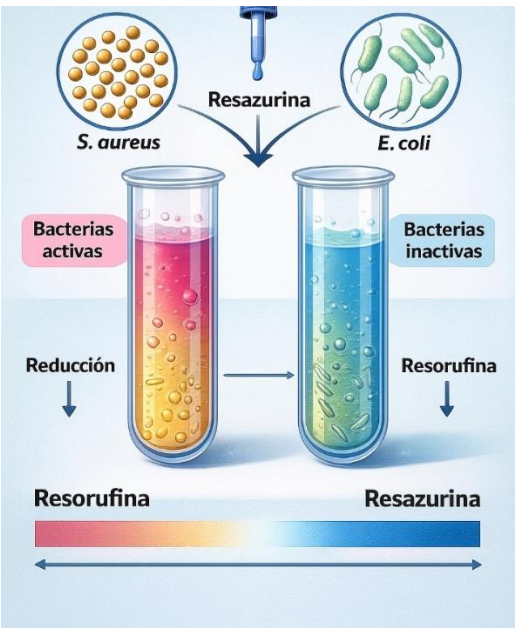


Figura 2. Acción de la resazurina en un ensayo bacteriano

2.10 Familia Fabaceae

Aguilar *et al.* (2021) mencionan que la familia de las *Fabaceae* es una de la más diversa por su gran versatilidad morfológica, fisiológica y ecológica que tienen las especies que la conforman. Se puede identificar por su característica presencia de un fruto conocido como legumbre. Respecto a su conformación floral comprenden de un único carpelo superior con un lóculo, placentación marginal y generalmente dos a varios óvulos. La familia reúne formas de vida como árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, expeditamente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas.

2.11 Generalidades de *Ramirezella strobilophora (R. strobilophora)*

R. strobilophora (**Figura 3**), la especie vegetal en estudio de la presente tesis forma parte de la familia de las Fabaceae una de las familias más diversas, albergando alrededor de 18,000 especies (IBUNAM, 2019).

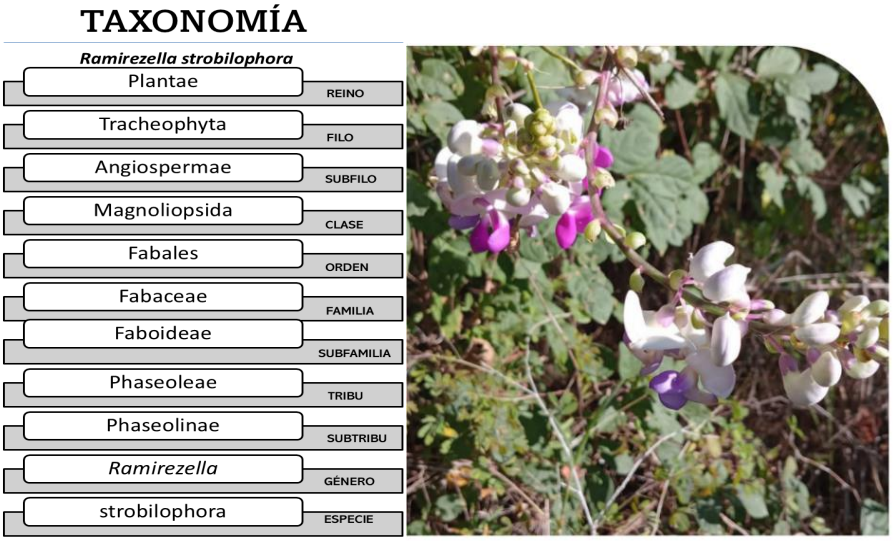


Figura 3. Organización de taxones para la clasificación de *Ramirezella strobilophora* (Salinas *et al*., 2009).

2.11.1 Descripción botánica de la especie en estudio

Se puede resumir en que es una especie trepadora, se distingue por su hábito de crecimiento lianescente, con tallos leñosos que pueden alcanzar hasta 5 m de longitud, generalmente ascendiendo sobre los árboles circundantes. Las hojas son alternas, compuestas y trifoliadas. Las inflorescencias son en racimos axilares o terminales, densos, formados por numerosas flores papilonadas. El fruto es una legumbre inflada ligeramente comprimida, dehiscentes al madurar, contiene de una a varias semillas color café obscuro (Delgado y Gama, 2015).

2.11.2 Distribución geográfica de *Ramirezella strobilophora*

El género *Ramirezella* tiene gran afinidad morfológica con *Vigna,* pero fue segregado con base a diferencias de hábitat, inflorescencia, flor, y fruto. Su distribución abarca principalmente la región de la costa mexicana, principalmente en los estados enlistados en la **Tabla 5** y Centroamérica del Pacifico, desde el sur de Sinaloa y Chihuahua hasta Nicaragua, ha presentado problemas en su clasificación tanto en categoría genérica como en sus especies (Conabio, 2016).

Tabla 5. Estados de México de distribución de la especie en estudio

Estados de México donde se distribuye		
Aguascalientes	Guerrero	Oaxaca
Colima	Jalisco	Zacatecas
Chiapas	Michoacán	Sinaloa
Chihuahua	Morelos	Guanajuato
	Nayarit	

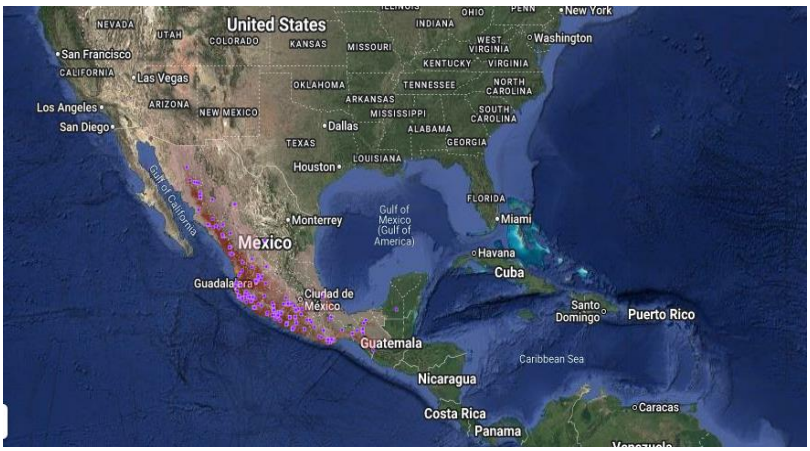


Figura 4. Distribución de *R. strobilophora* en México (CONABIO, 2025).

2.12 Estudios previos de uso Biotecnológico de la familia Fabaceae

La familia de las fabáceas al albergar un gran número de especies, entre ellas existen algunas que contienen metabolitos secundarios de interés como lo es *Diphysa americana* originaria de Mesoamérica, es empleada en la etnomedicina para mitigar molestias gastrointestinales, respiratorias y de la piel. Con ayuda de hexano, acetato de etilo, metanol y agua se obtienen extractos de hoja y corteza con efectos antimicrobianos, con la bacteria más susceptible *Pseudomona aeruginosa* con una MIC= 0.625 mg/mL. (Díaz Trujillo *et al.*, 2022).

Al someter a evaluación antimicrobiana otra especie de esta familia, *Hybosema ehrenbergii* (guajillo de chivo), extrayendo por maceración con hexano, acetona y metanol, gracias a estos solventes se detectaron esteroides, fenoles, saponinas y taninos. La cepa que se encontró más susceptible fue *Staphylococcus epidermidis* con una MIC= 1.0 mg/mL. (Marlen, 2023).

El cumarú *(Dipteryx odorata)* perteneciente a esta familia posee en sus semillas cumarina la cual es utilizada en la medicina tradicional como antiespasmódico, antiinflamatorio, reumatismo y antimicrobiano. En ensayos microbiológicos se ha comprobado halo inhibitorio contra bacterias *S. aureus*, E. coli, K. pneumoniae (Da Silva *et al*., 2021).

2.13 Estudios previos de extracto metanólico de *R. strobilophora*

El presente estudio se centró en el aspecto de caracterización Fitoquímica, mas no en una aplicación biotecnológica. El extracto metanólico de *R. strobilophora* se sometió a cromatografía bidimensional en papel con una solución de ácido acético al 15%. Mediante métodos estándar, espectroscopia UV-Vis y comparación TLC (cromatografía de capa fina) se identificaron compuestos exclusivamente los 7-O-glucósidos de apigenina, luteolina, acacetina y crisoriol. Los glucósidos de flavona no son comunes en Phaseolinae, excepto en algunas especies de Phaseolus (Williams *et al.,* 1995; Pelotto, manuscrito inédito). (Pelotto, 1997).

2.13.1 Estudios previos de extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* con fines biotecnológicos

Se realizo una búsqueda en plataformas como Google Schoology, Scopus, Pubmed, Elsevier y no se dispone de trabajos previos sobre este tema.

2.14 Bacterias ensayadas

2.14.1 *Staphylococcus aureus (S. aureus)*

Staphylococcus aureus o estafilococo dorado, es una bacteria relevante en virtud de su participación en múltiples patologías, gracias a los factores de virulencia y patogenicidad, codificados por los diversificados genes expresados a lo largo de su ciclo de vida. Encuentra mecanismos de resistencia como la formación de biopelícula, las cuales crean una matriz extracelular fabricada por proteínas (Pasachova Garzón et al., 2019).

Tabla 6. Generalidades del estafilococo dorado (Organización Mundial de la Salud y Catsalut, 2010).

Característica	Descripción
Familia	Staphylococcaceae
Clasificación Gram	Gram positivo
Forma	Coco en parejas, racimos o cadena

Tamaño	~0.8-1,5 µm
Metabolismo	Anaerobio facultativo, coagulasa positivo, catalasa positivo, oxidasa negativo.
Reservorio	Humano, mamíferos, aves, alimentos y agua
Hospederos	Humanos y animales de sangre caliente
Dosis infectiva mínima (DIM)	Mínimo 100,000 unidades
Supervivencia ambiental	Sobrevive desde horas hasta días en tela y plástico
Mecanismo de propagación y transmisión	Ingesta de alimentos contaminados, ambiente, contacto con personas, zoonosis, por heridas o pinchazos.
Vías de entrada	Dérmica, mucosas, percutánea, digestiva
Distribución geográfica	Mundial
Enfermedades que causa	Sepsis, infección estafilocócica

2.14.2 *Escherichia coli*

Es una bacteria que se encuentra en el intestino humano, por consecuencia tiene una alta virulencia y patogenicidad, ante esta situación la OMS ofrece evaluaciones científicas para controlar la presencia de *E.coli* (características descritas en la **Tabla 7**), productora de toxina shiga en los alimentos. Estas evaluaciones sirven como base para las normas, directrices y recomendaciones internacionales sobre los alimentos. (World Health Organization: WHO, 2018).

Tabla 7. Generalidades que considerar de *Escherichia coli*. (OMS. Notas descriptivas. *E.coli,* 2018).

Característica	**Descripción**
Familia	Enterobacteriaceae
Forma	Bacilo
Clasificación Gram	Gram negativo
Transmisión	Alimentos, verduras, frutas y agua

	contaminados con materia fecal
Hospedero	Intestinos de humanos y animales de sangre caliente
Produce	Toxina Shiga
Reservorio	Carne cruda (bovina, rumiantes, cerdos), leche cruda, hortalizas contaminadas por materia fecal
Enfermedades que causa	Síndrome hemolítico urémico
Temperatura	Termosensible (<70°C), optima de 37°C

3. JUSTIFICACIÓN

En la última lista de patógenos prioritarios (BPPL por sus siglas en inglés) 2024-2025, publicado por la OMS, tiene como prioridad alta a *S. aureus* mientras que *E. coli* como prioridad critica. Estas bacterias causan enfermedades como diarreas, infecciones urinarias (por *E. coli)*, infecciones en la piel y/o en heridas postoperatorias (por *S. aureus*) rutinarias, pero que se pueden complicar a urgencias médicas. Por esta cotidianidad de afecciones, la población ha hecho un uso desmedido e irresponsable de los antibióticos, por consecuencia se originó la resistencia a los antimicrobianos (RAM), esta es una de las diez principales amenazas de la salud pública a las que se enfrenta la humanidad. Por tal motivo se requiere medidas multisectoriales urgentes para poder lograr los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), abriendo un área de oportunidad de estudio a la comunidad científica, investigando desde un aspecto fitoquímico a *Ramirezella strobilophora,* una liana presente en la selva baja caducifolia del estado de Oaxaca, ya que en la actualidad solo se cuenta con una nota científica del año 1997, donde dan a conocer cuatro glucósidos de flavona extraídos con ayuda de metanol. Al realizar un análisis desde el aspecto biotecnológico, comprendiendo desde la extracción etanólica, ensayos microbiológicos y el estudio fitoquímico, permitirá verificar si existe o no, una

nueva alternativa antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus y Escherichia coli* usando el extracto etanólico de *R. strobilophora.*

El impacto que representaría este trabajo radica en generar conocimiento original sobre una planta poco explorada, el cual puede sentar las bases para futuros estudios Biotecnológicos, orientados a la innovación de antibióticos.

4. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* presenta actividad antimicrobiana contra cepas de colección de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli.*

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antimicrobiano del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* sobre cepas de colección de *Sthaphylococcus aureus y Escherichia coli*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* proveniente del estado de Oaxaca.
2. Separar las fracciones del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora,* mediante cromatografía de capa fina (TLC).
3. Separar los componentes en fracciones correspondientes al extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora*, mediante cromatografía en columna.
4. Evaluar el potencial antimicrobiano de las fracciones del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora,* sobre *Sthaphylococcus aureus y Escherichia coli* mediante microdilución en caldo con resazurina.

6. MATERIALES Y METODOS

En la Figura 5 se describe la metodología general del trabajo experimental realizado.

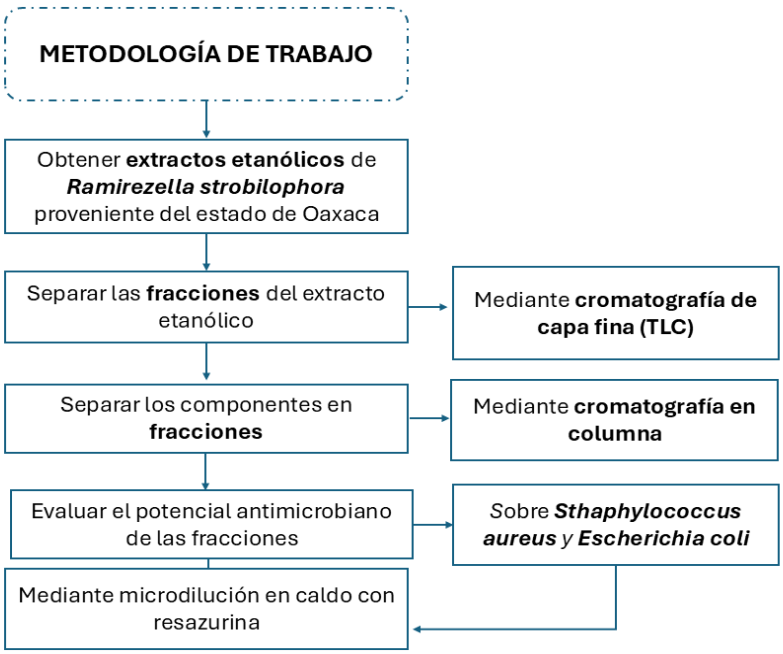


Figura 5. Diagrama de resumen de metodología aplicada

6.1 Sitio de estudio

El sitio de recolección de liana, hoja, vaina y semilla fue en el municipio de Santiago Pinotepa Nacional, ubicado en la región Costa, Oaxaca, con coordenadas 98° 03´ longitud oeste, 16° 20´ latitud norte y a una altura de 210 metros sobre el nivel del mar. El clima es cálido subhúmedo, los vientos dominantes son de sureste a noroeste, la temperatura media anual es de 27.2°C y una precipitación pluvial de 1585 milímetros. Una vez deshidratados los ejemplares recolectados se enviaron a identificar a la división de herbario nacional de la **UNAM** (Universidad Autónoma de México).



Figura 6. Señalización del sitio de recolección. Elaboración propia.

6.2 Estandarización del método de extracción de *Ramirezella strobilophora* con etanol

Para obtener el extracto etanólico, por maceración a temperatura ambiente, se pesan más menos 500 gr de materia vegetal previamente deshidratada a temperatura ambiente, se corta convenientemente para introducir en un frasco ámbar de 1 L, posteriormente se agregan 750 mL de etanol puro. Se reserva en un lugar fresco sin luz solar durante 7 días. Después de este tiempo se filtra el extracto con papel filtro del número 1. Una vez obtenido el extracto sin impurezas, se colocó en un matraz globo de vidrio de 500 mL para llevar a concentrar a un rotavapor (marca Sagaon Tech) con bomba de alto vacío (marca J-ROI), hasta no tener solvente presente en el extracto. Se vertieron 10 mL de etanol en el matraz globo para ir recuperando el extracto concentrado e ir trasvasando a un frasco previamente pesado, de 100 mL color ámbar; el siguiente paso fue concentrar hasta eliminar completamente el solvente con ayuda de nitrógeno en gas y campana de flujo laminar (marca VICHI). Al tener solo extracto en el frasco ámbar, se pesó y realizaron los cálculos de % de rendimiento, con la siguiente formula:

$$\%\ Rendimiento = \frac{Peso\ útil}{Peso\ total}\ X\ 100$$

Formula 1: Para calcular el rendimiento obtenido de la extracción

6.3 Separación de las fracciones del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora,* mediante cromatografía de capa fina (TLC).

Una vez sabiendo el dato de % de rendimiento, se procedió a hacer un stock en un frasco ámbar de vidrio de 75 mL, disolviendo 200 mg de extracto seco en 5 mL de etanol, agitando muy bien para evitar consistencia grumosa. Se reservo este stock en un lugar fresco sin luz solar. Para la placa de TLC se pesaron 5 g de Sílica gel con tamaño de partícula entre 5-40 µm (marca LabKem) y se disolvió con 40 mL de agua destilada, agitando vigorosamente para no tener grumos. Se tomo una placa de vidrio cuadrada de 10 cm x 10 cm y se vertió la mezcla teniendo cuidado de no visualizar algún grumo o relieve en la placa, esta misma se llevó a un horno (marca CCISA) a 80°C por 24 hrs. Transcurrido este tiempo se sacó la placa para colocar en un borde inferior una línea horizontal por goteo del stock del extracto etanólico. Para la preparación de la cámara de revelado de hizo una mezcla de solventes relación 6:1 con hexano y acetato de etilo respectivamente, esta mezcla se vacío en la cámara para colocar en el interior la placa ya preparada, dejar correr 5 min aproximadamente para después de este tiempo sacar

la placa con 1 cm de margen del borde superior, tras este paso se colocó la placa en un transiluminador con luz UV a 365nm (marca Kalstein), para observar los colores y fracciones que transmite el recorrido del extracto. Este experimento se realizó por triplicado.

6.4 Separación de los componentes en fracciones correspondientes al extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora*, mediante cromatografía en columna

El primer paso para fraccionar es el empaquetamiento de la columna, es hacer una mezcla de 50 g de Sílica gel con tamaño de partícula entre 15-40 µm (marca leboriz) y 150 mL de hexano, tan pronto no se ven grumos en esta misma, se vacío poco a poco en una columna de vidrio para cromatografía vertical de 50 cm de largo, verificando que en la punta este drenando el líquido de la mezcla, una vez que se obtuvo una columna con un color blanco uniforme y muy bien humedecida, se colocaron una solución madre con 500 mg de extracto disueltos en 5 mL de etanol. Enseguida se fueron vertiendo 50 mL de cada solvente en el orden de la **Tabla 7** para recuperar en matraces de vidrio (250 mL), 75 mL como máximo del drenado de la columna y así sucesivamente hasta terminar el orden de los solventes. Todo este proceso se realizó por triplicado.

Tabla 8. Orden de vertido de los solventes a la columna, de menor a mayor polaridad

1. Hexano
2. Tolueno
3. Cloroformo
4. Acetato de etilo
5. Cloruro de metileno
6. Isopropanol
7. Acetona
8. Etanol
9. Metanol
10. Acetonitrilo
11. Agua HPLC

6.5 Determinación de MIC (concentración mínima inhibitoria) mediante ensayo de microdilución en caldo con resazurina

6.5.1 Preparación de las bacterias

Se tomo una asada de un cultivo estriado de *S. aureus* (ATCC 25923), (previamente preparado) para inocular en 1 mL de caldo LB (Luria-Bertani) (marca Condalab), este cultivo liquido se llevó a incubar 24 hrs a 37°C, en una incubadora (marca CCISA). Posterior a esta incubación se realizó una dilución 1:10 y 1:100 para medir absorbancia a 630 nm en un lector de microplacas (marca NANBEI), hacer el cálculo de ajuste de bacterias a 500,000 y tomar la dilución conveniente, para iniciar el montaje del ensayo en la placa Elisa. Este mismo proceso se realizó para *E. coli* (ATCC 25922).

6.5.2 Preparación del extracto etanólico de *R. strobilophora*

Para hacer la solución de extracto etanólico en crudo se pesaron 20 mg de extracto previamente concentrado y secado completamente, para disolver en 1 mL de etanol puro (marca Meyer). Se reservó en un vial de vidrio a temperatura ambiente.

6.5.3 Preparación de las fracciones de extracto etanólico de *R. strobilophora*

Una vez obtenidas las fracciones resultantes de la columna cromatográfica, se llevaron a secar en campana de flujo laminar y con nitrógeno en gas se eliminó todo el resto del solvente. Se pesaron los viales donde se reservaron las fracciones para calcular el rendimiento de cada fracción. Para trasvasar la fracción de cada matraz al vial, se resuspendió agregando 2 mL de etanol puro, así sucesivamente con cada fracción recuperada. Posteriormente se concentraron con nitrógeno en gas para eliminar todo rastro de solvente y así obtener un correcto peso final. Se aplico la formula (**Formula 1**) anteriormente descrita para calcular rendimiento da cada una de las fracciones. Este mismo procedimiento se realizó para las fracciones de la TLC.

6.5.4 Preparación de placa de 96 pozos con resazurina como agente redox

Se prepararon 100 mL de medio de cultivo liquido LB respecto a las indicaciones del fabricante. En una placa Elisa de 96 pozos se organizó para colocar en la primera columna el control de viabilidad de la bacteria ensayada, previamente ajustando el número de bacterias (500,000) de estas, enseguida se construyó una curva de microdiluciones de 5,10,15,20 µL de extracto etanólico de *R. strobilophora,* para después colocar un control negativo (**Figura 7**). Se llevo a incubar por 24 hrs, a 37°C en una incubadora marca CCISA. Todo este proceso se realizó para

S.aureus y *E.coli*, por cada fracción (1-7) por triplicado. Este mismo procedimiento se realizó para las fracciones de la TLC.

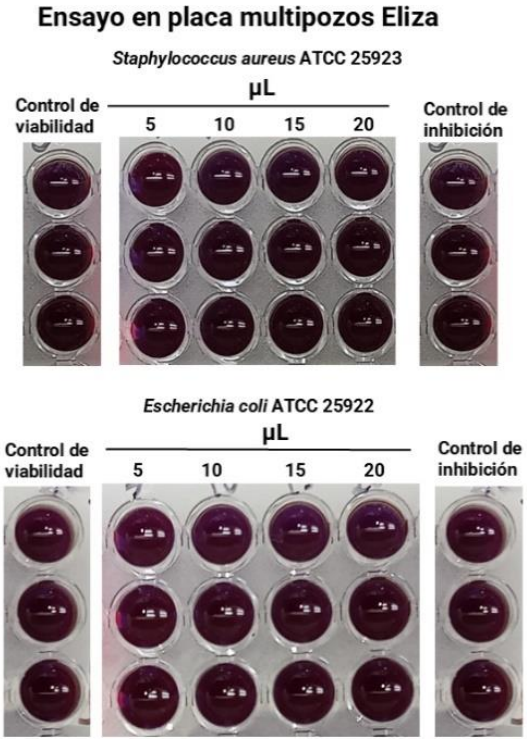


Figura 7. Orden de variables colocadas en la placa multipozos de Elisa

6.5.5 Determinación de absorbancia de placa multipozos

Una vez transcurridas las 24 hrs, se revisó cambio de coloración en las microdiluciones, estas placas se llevaron a medir absorbancia a 630 nm en un lector de microplaca marca NANBEI, con ayuda de este se guardaron los datos en formato Excel, para obtener promedios de control positivo, negativo, así como la evaluación de la curva del extracto etanólico. Este mismo procedimiento se realizó para las fracciones de la TLC.

6.5.6 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Para determinar la MIC se realizaron cálculos con ayuda de Excel para obtener la concentración por microdilución posteriormente el cálculo para concentración final por pozo (**Figura 8**), y a partir de ahí calcular la MIC para cada fracción evaluada para ambas bacterias con la **Fórmula 2**. Este mismo procedimiento se realizó para las fracciones de la TLC.

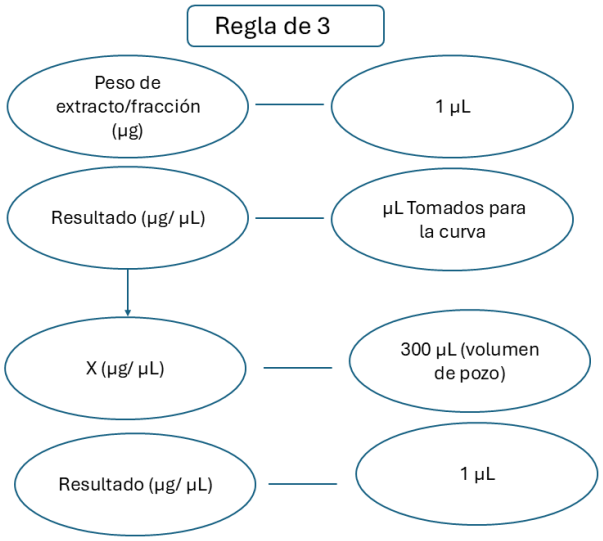


Figura 8. Orden de realización de cálculos para determinar concentración final por pozo

6.6 Determinación de MIC control con ampicilina

Se utilizó un control positivo con antibiótico (ampicilina) para comparar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *R. strobilophora*. Para ello, se preparó una solución madre de ampicilina a 100 mg/mL, a partir de la cual se realizó una dilución 1:10. En una placa ELISA se construyó una curva de microdiluciones (como se muestra en la Figura 7), utilizando volúmenes de 1 µL a 10 µL, incrementando de uno en uno, tomados de la dilución 1:10. En la primera y última columna se colocaron los controles positivo y negativo, respectivamente. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C. Este procedimiento se realizó tanto para *S. aureus* como para *E. coli* por triplicado.

6.7 Determinación de porcentaje de inhibición y IC_{50} para las bacterias ensayadas

Después de las 24 hrs incubadas las placas Elisas, se llevaron a medir absorbancias en un lector de microplacas a 630 nm, se guardaron en formato Excel estos datos para después usar la **Formula 2** descrita a continuación y así obtener porcentaje de inhibición, construir una gráfica con relación porcentaje de inhibición-concentración final en pozo. A partir de la fórmula de pendiente (y= mx+b) dada en estas graficas se calculó la IC_{50} para *S. aureus* y *E.coli.*

$$\% = \frac{(\bar{x}\ abs\ Extracto) - (\bar{x}\ abs\ viabilidad)}{(\bar{x}\ abs\ inhibición) - (\bar{x}\ abs\ viabilidad)} x100$$

Formula 2. Fórmula para calcular MIC

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Identificación de ejemplar colectado

La identificación de la especie fue efectuada por el botánico Ramiro Cruz Durán del Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM mediante la observación de tallo, flor, hoja, fruto y claves dicotómicas del género. Como resultado se determinó la identidad de la planta como *Ramirezella strobilophora* (B.L. Rob) Rose.

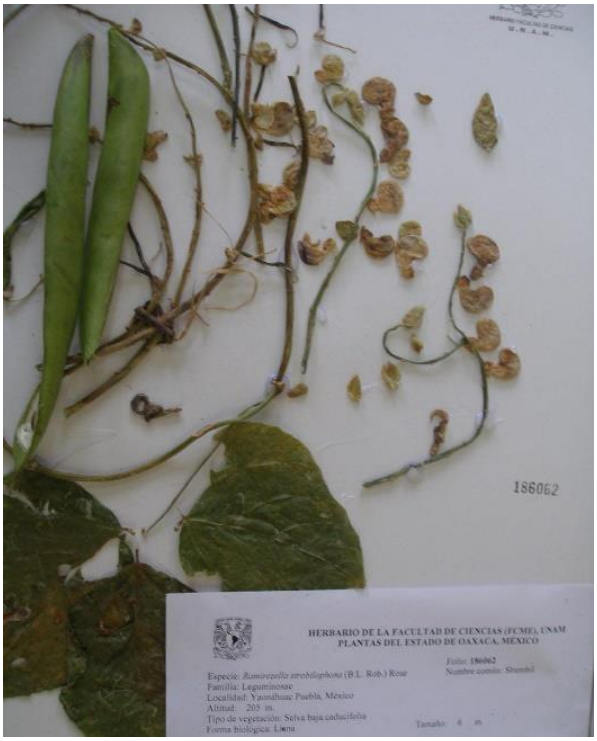


Figura 9. Holotipo de *Ramirezella strobilophora* depositada en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Herborizada.

7.2 Estandarización del método de extracción de *Ramirezella strobilophora* con etanol

Se eligió el solvente etanol, para realizar la extracción, ya que por sus propiedades fisicoquímicas (medianamente polar) garantiza un óptimo arrastre de metabolitos de diferentes

polaridades. Cuenta con propiedades biológicas y operativas acorde al enfoque fitoquímico y microbiológico, como su bajo costo, y no ocasionar alteraciones en los ensayos realizados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo, a partir de 500 g de materia seca de tallos de *R. strobilophora* extraídos con 750 mL de etanol, se obtuvo un rendimiento de 13 % p/p de rendimiento.

7.3 Separación de las fracciones del extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora,* mediante cromatografía de capa fina (TLC)

En la **Figura 10** se presenta el resultado del fraccionamiento utilizando una fase estacionaria polar (sílica gel 60G) y una fase móvil compuesta por 85 mL de hexano y 15 mL de acetato de etilo (**Figura 11**). Esta combinación permite aprovechar las diferencias de polaridad y constante dieléctrica entre los solventes. El hexano es un solvente apolar que favorece el arrastre de compuestos no polares, como aceites y ácidos grasos. Por otro lado, el acetato de etilo es un solvente moderadamente polar, lo que resulta útil para movilizar compuestos con diversos grados de polaridad presentes en extractos vegetales. Dado que la fase estacionaria (sílica gel) es altamente polar, los compuestos más polares tienden a retenerse con mayor fuerza, mientras que los menos polares migran más fácilmente con la fase móvil. En este contexto, puede afirmarse que, a mayor constante dieléctrica, mayor es la polaridad del solvente; por ello, la separación observada responde al principio de que “lo similar disuelve a lo similar”. Los resultados de la separación por TLC, corroboran lo publicado por Pelotto y Del Pero(1997), donde mencionan haber observado cuatro glucósidos de flavona en una TLC, los cuales pertenecen a la familia de los flavonoides, sin embargo, esto no es totalmente seguro, por lo cual se puede usar a futuro la técnica de HPLC-MS. Las agliconas de los flavonoides son menos polares que sus glucósidos y por tanto migran más con una fase móvil apolar.

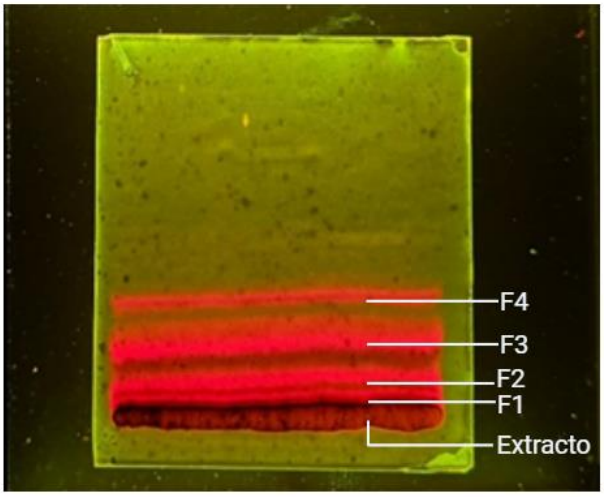


Figura 10. Separación de compuestos por TLC. El color rojizo o magenta según Wagner y Blad (2009) en su atlas de cromatografía, corresponde a el subgrupo de los fenoles, los flavonoides, los cuales se pueden observar bajo UV a 365 nm. F1-F4, fracciones obtenidas mediante el sistema de solventes hexano:acetato de etilo 85:15 v/v.

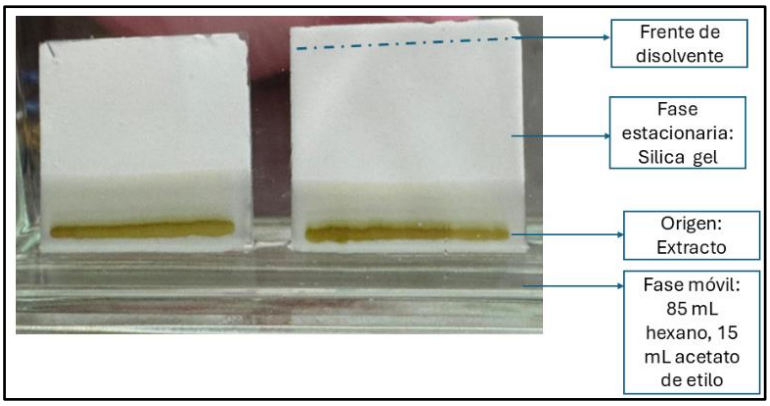


Figura 11. Sistema de desarrollo de para la separación del extracto etanólico de *R. strobilophora* mediante TLC.

7.4 Fraccionamiento de los componentes de *Ramirezella strobilophora* mediante cromatografía en columna

Al emplear una fase móvil compuesta por 11 solventes con distintas polaridades y constantes dieléctricas (**Tabla 9**), junto con sílica gel como fase estacionaria (altamente polar), se garantizó un adecuado arrastre y separación de compuestos a lo largo de la columna cromatográfica. Esto resultó especialmente útil debido a que se desconoce la naturaleza exacta de los metabolitos presentes en el extracto etanólico de *R. strobilophora*. Como resultado del proceso, se obtuvieron siete fracciones con distintas tonalidades (**Figura 12**). Los compuestos menos polares interactúan durante menos tiempo con la sílica, por lo que fluyen más rápidamente y

eluyen primero. En contraste, los compuestos más polares presentan una mayor afinidad por la sílica (altamente polar), de modo que requieren solventes progresivamente más polares para ser eluidos. Con base en la información obtenida mediante la TLC, se infiere que los solventes polares como acetona, isopropanol, etanol, metanol y acetonitrilo son capaces de arrastrar flavonoides, particularmente en su forma de agliconas, sin embargo a futuro se puede comprobar con la técnica HPLC-MS.

Tabla 9. Orden de menor a mayor grado de constante dieléctrica, así como su clasificación de polaridad

Solvente	**Polaridad aproximada***	**Constante dieléctrica (ε) aprox.**
Hexano	No polar	~ 1.88
Tolueno	No polar / ligeramente polar	~ 2.38
Cloroformo	Poco polar	~ 4.8
Acetato de etilo	Moderadamente polar (polar-aprótico)	~ 6.0
Cloruro de metileno (Diclorometano, DCM)	Poco a moderadamente polar	~ 8.9
Isopropanol (IPA)	Polar protico / moderado	~ 19.9
Acetona	Polar aprótico	~ 20.7
Etanol	Polar protico	~ 24.5
Metanol	Polar protico	~ 32.7
Acetonitrilo	Polar aprótico / bastante polar	~ 37
Agua HPLC	Altamente polar	~ 80.1

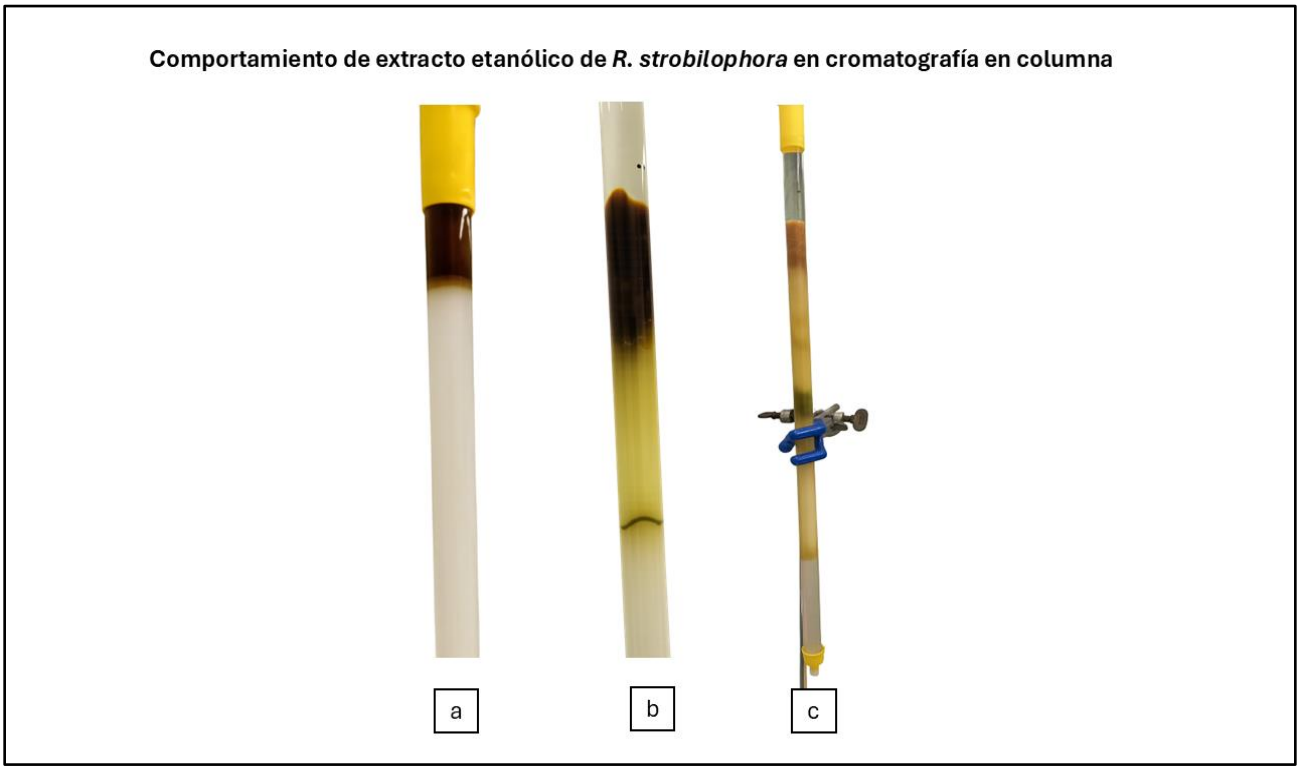


Figura 12. Columna cromatográfica empacada con silica gel mostrando distintas tonalidades que se asocian a la separación de distintos compuestos químicos. Se muestran 3 repeticiones (a,b,c) de fraccionamiento.

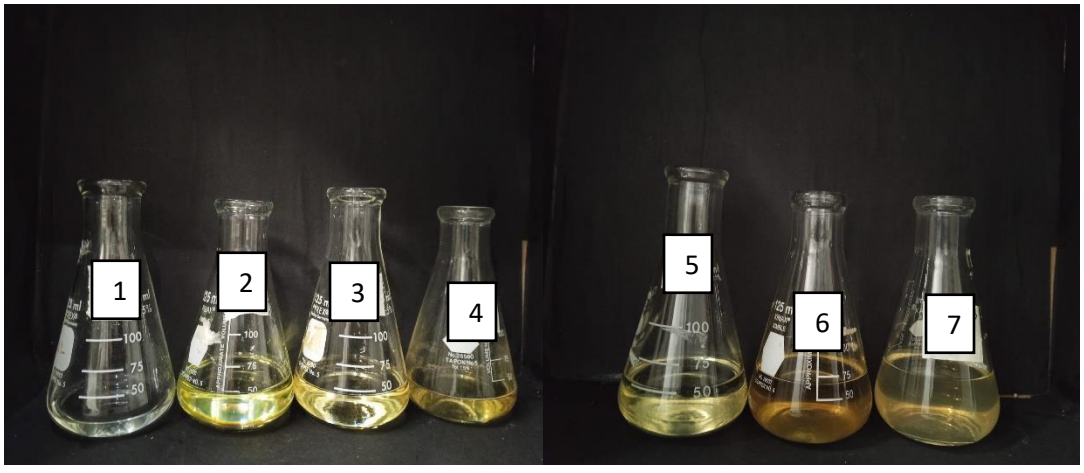


Figura 13. Obtención de 7 fracciones, presentan variaciones de color, lo cual refleja diferencias en los compuestos separados durante la elución.

7.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante microdilución en caldo con resazurina

Los resultados obtenidos (**Figuras 14, 15 y 16**) para la concentración final por pozo y la MIC de las tres fracciones derivadas de la TLC mostraron que el color rosa indico ausencia de inhibición, mientras que las distintas tonalidades de morado representaron niveles bajos, moderados o altos de actividad inhibitoria. A pesar de emplear el mismo extracto y tratamiento, la respuesta difirió debido a las características propias de cada bacteria. *S. aureus*, una bacteria Gram positiva, presenta una pared celular gruesa y densa de peptidoglucano, la cual dificulta la entrada de compuestos grandes (mayor peso molecular) o polares, como los glucósidos, metabolitos secundarios, que Pelotto y Del Pero (1997) detectaron mediante TLC. En contraste, *E. coli*, una bacteria Gram negativa, posee una pared celular delgada y una membrana externa con porinas, que permiten el paso de moléculas pequeñas o parcialmente polares, como los glucósidos de flavona. En la investigación que realizaron Tumpa y colaboradores, describen como algunos extractos vegetales estabilizan las membranas celulares de los glóbulos rojos por ejemplo, y que ya no haya afección por bacterias patógenas, respecto a estas conclusiones se puede inferir que la entrada de las fracciones a una membrana desestabilizada, bien permeando a esta misma u ocasionando lisis por los metabolitos secundarios antes mencionados, lo que ocasiona, su actividad antibacteriana. En general, las tres fracciones mostraron una mejor MIC frente a *E. coli* que frente a *S. aureus*. Por ello, la inhibición no será igual a pesar de emplear las mismas concentraciones de extracto etanólico de *R. strobilophora* en cada microdilución. Por ultimo se explica que se eligió el método representado en las siguientes figuras, dilución en caldo con resazurina ya que esta, tiene una sensibilidad a la viabilidad celular, causa menos interferencia en los resultados, ya que los extractos tienden a tener colores muy densos para usar la técnica de medición de densidad óptica, por ensayar en placas elisas se tiene mayor reproducibilidad y menor variabilidad experimental, es de bajo costo por ahorro de tiempo y materiales además que permite medir una MIC.

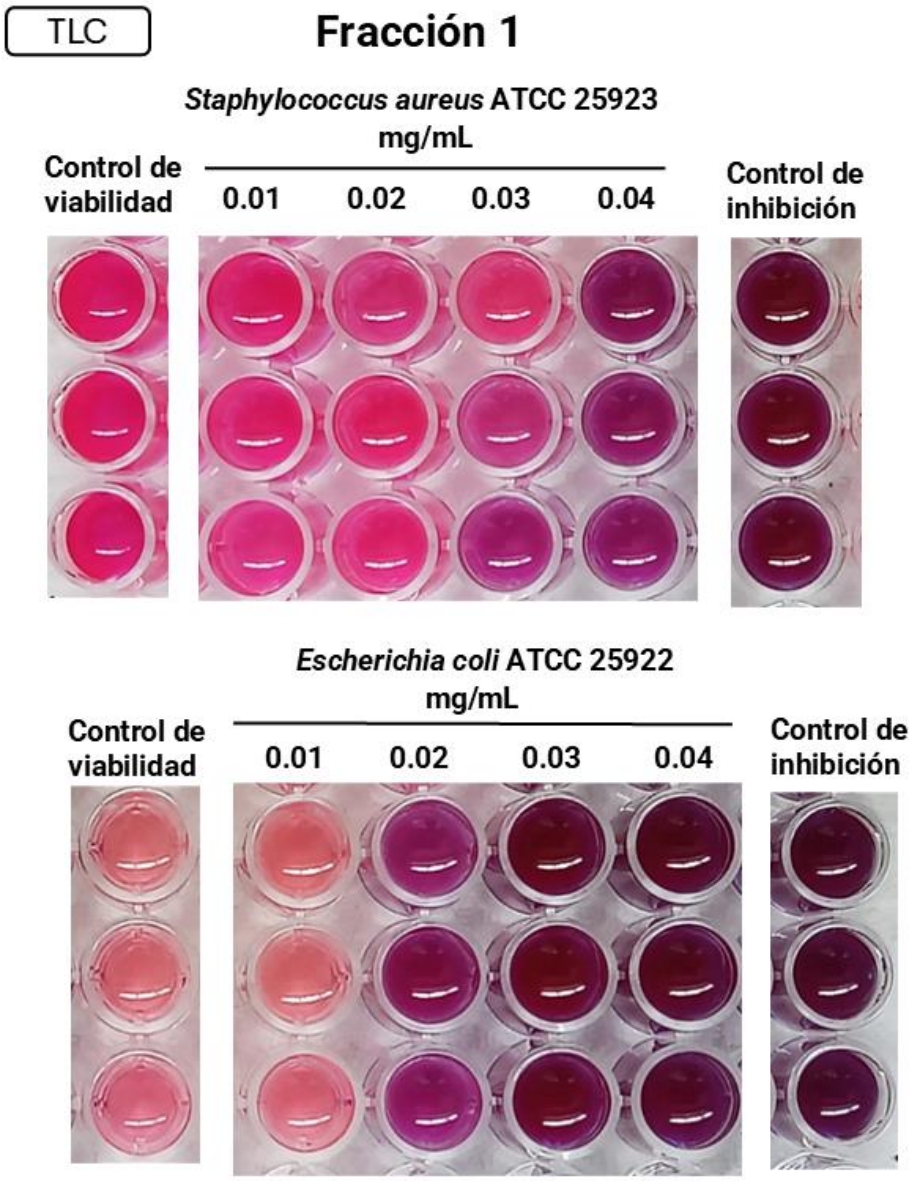


Figura 14. Ensayos de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 1.

Las concentraciones finales por pozo, *S. aureus* presenta una MIC de 0.04 mg/mL y, según la colorimetría, muestra una baja inhibición. En el caso de *E. coli*, la MIC es de 0.02 mg/mL y también exhibe una inhibición baja de acuerdo con la evaluación colorimétrica.

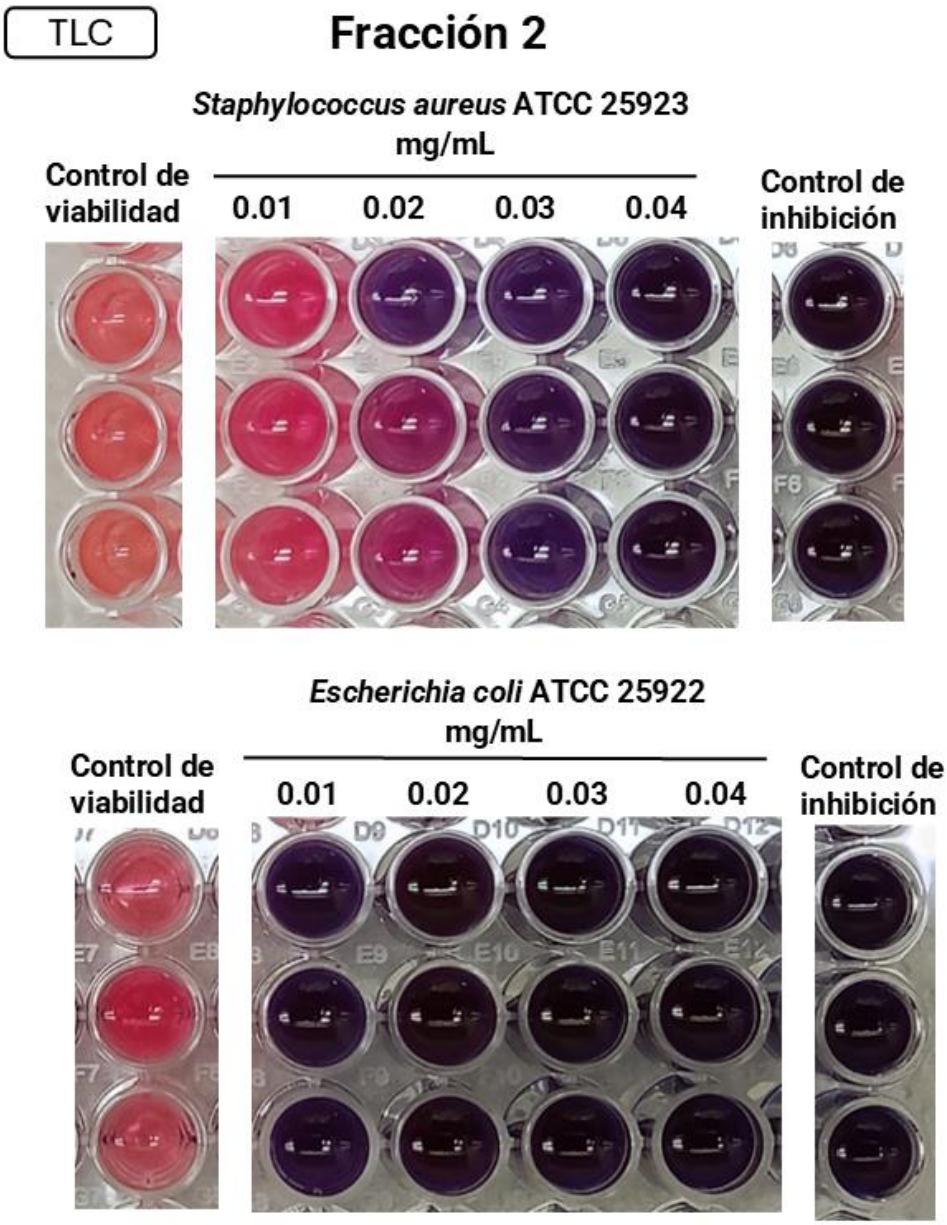


Figura 15. Ensayos de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 2.

Se observa una actividad antimicrobiana fuerte contra *E. coli*, con una MIC= 0.01 mg/mL y un color azul oscuro, lo que indica una inhibición alta en la menor concentración evaluada en la curva. En contraste, para *S. aureus* se obtuvo una MIC= 0.03 mg/mL. Es importante señalar que en la columna correspondiente a la concentración de 0.02 mg/mL no se observó una colorimetría parcial, lo que sugiere que el tiempo de incubación no fue suficiente para que la

bacteria inoculada en cada pozo creciera de forma uniforme, a pesar de haber colocado el mismo volumen (µL) en cada uno.

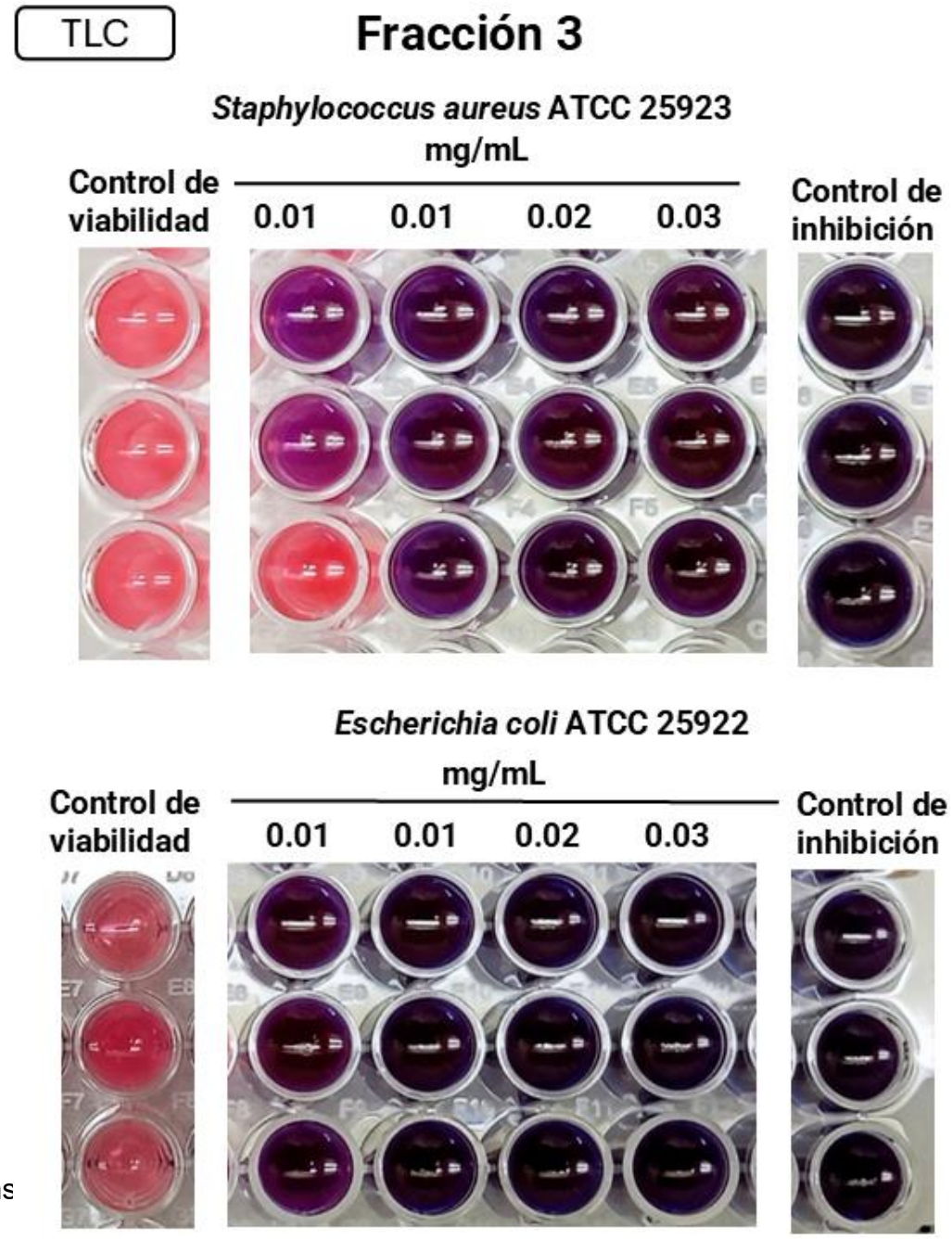


Figura 16. Ens

Se observa que en la concentración 0.01 mg/mL no creció de manera igual la bacteria *S. aureus* lo que pudo ser provocado por variaciones en la temperatura de incubación, muestra una MIC=

0.01 con un color azul obscuro (alta inhibición). El triplete de *E. coli* muestra un color azul oscuro, más uniforme para la curva de concentraciones, siendo la MIC= 0.01 mg/mL.

7.6 Determinación de la MIC mediante ensayo de microdilución en caldo con resazurina con las fracciones de cromatografía en columna

Los resultados de la actividad antimicrobiana observada frente a *S. aureus* y *E. coli* con las siete fracciones obtenidas de la columna cromatográfica (de las tres replicas), podría atribuirse a la presencia de flavonoides en el extracto etanólico de *R. strobilophora*. Según Miklasinska *et al*. (2018), esta propiedad antibacteriana, particularmente contra *S. aureus*, se relaciona con estructuras flavonoides del tipo chalconas $(2E) - 1{,}3 - difenilprop - 2 - en - 1 - ona$. Los autores señalan que la hidroxilación del anillo A, especialmente en la posición 2', incrementa la actividad antibacteriana. Además, la presencia de grupos hidroxilo fenólicos con alta afinidad por proteínas puede inhibir enzimas microbianas y, simultáneamente, aumentar la interacción con las membranas citoplasmáticas. Esto mejora el efecto antibacteriano y evidencia una clara relación estructura–actividad. Fernández-Rebaza et al. (2024) señalan que la presencia de flavonoides entre ellos las flavonas permite su elución mediante solventes de mediana polaridad, como cloroformo, acetato de etilo, acetona, etanol y metanol. Estos solventes fueron empleados para obtener las fracciones utilizadas en los ensayos presentados en las **Figuras 17–37**, derivados de la cromatografía en columna descrita previamente (**Figura 12**). Se infiere que estos metabolitos secundarios (flavonas), presentes en las siete fracciones obtenidas son los responsables de la inhibición bacteriana sobre *E. coli*.

Es importante resaltar los dos tonos de rosa que presentan las bacterias al reducir la resazurina a resorufina, rosa fluorescente para *S. aureus* y rosa tenue para *E. coli*. Esta diferencia en la intensidad del color puede deberse a la naturaleza de sus paredes celulares, que influye en la velocidad con la que el color azul oscuro de la resazurina fluye hacia el interior de la célula, *S. aureus* es Gram positiva, lo que permite una fluidez más rápida, mientras que *E. coli* es Gram negativa, con una fluidez más lenta. Desde el punto de vista bioquímico, *S. aureus* presenta un metabolismo más rápido, generando mayores cantidades de NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido) y NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), los cuales son responsables de la reducción del colorante. En cambio, aunque *E. coli* crece rápidamente, su metabolismo en estas condiciones es moderado, por lo que reduce el colorante en menor medida.

A continuación, se presentan los resultados de las siete fracciones obtenidas de la columna 1 (primer replica), todas presentando un correcto control positivo y negativo.

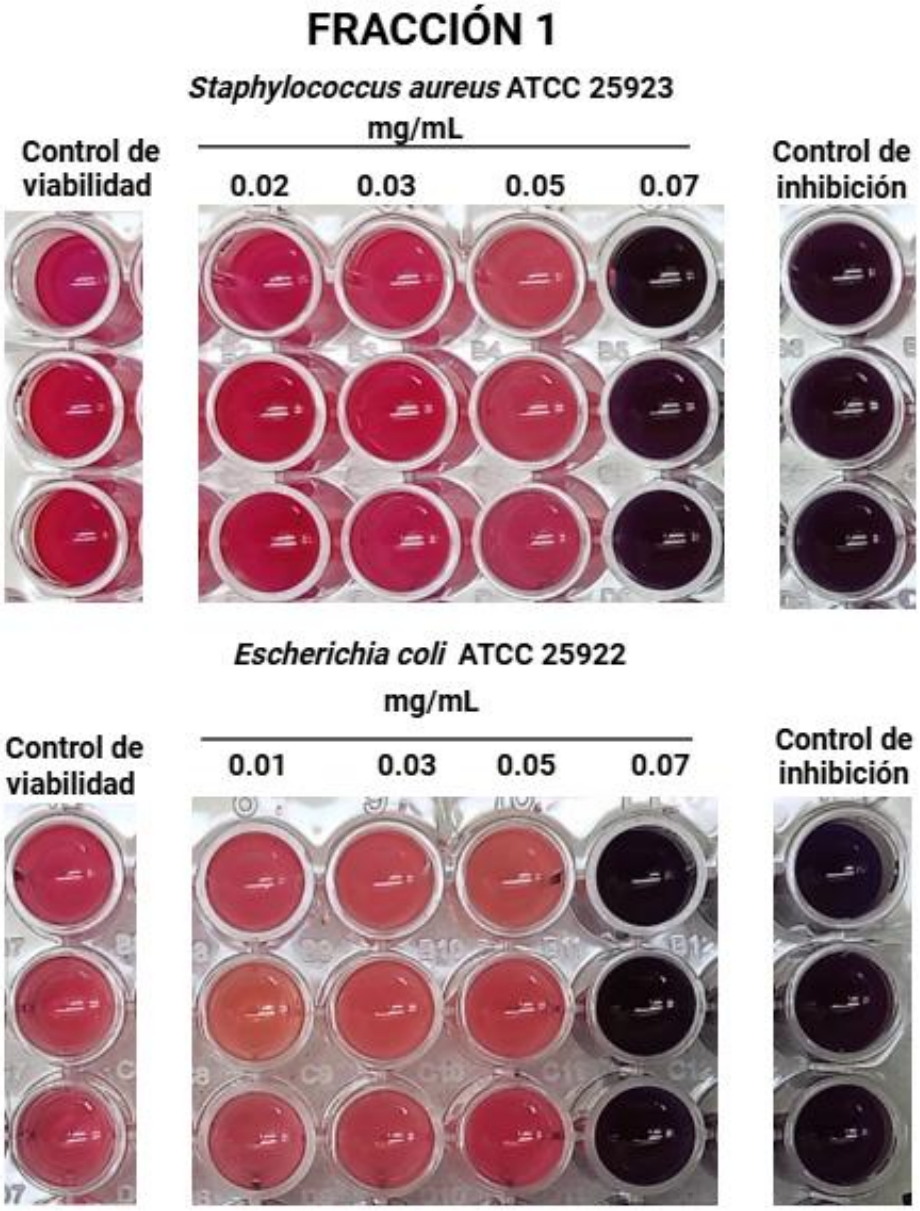


Figura 17. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina donde se observa que *S. aureus* y *E. coli* presentan la misma MIC= 0.07 con una alta inhibición por el azul intenso que muestran en los tripletes. Ambas con alta inhibición respecto a colorimetría.

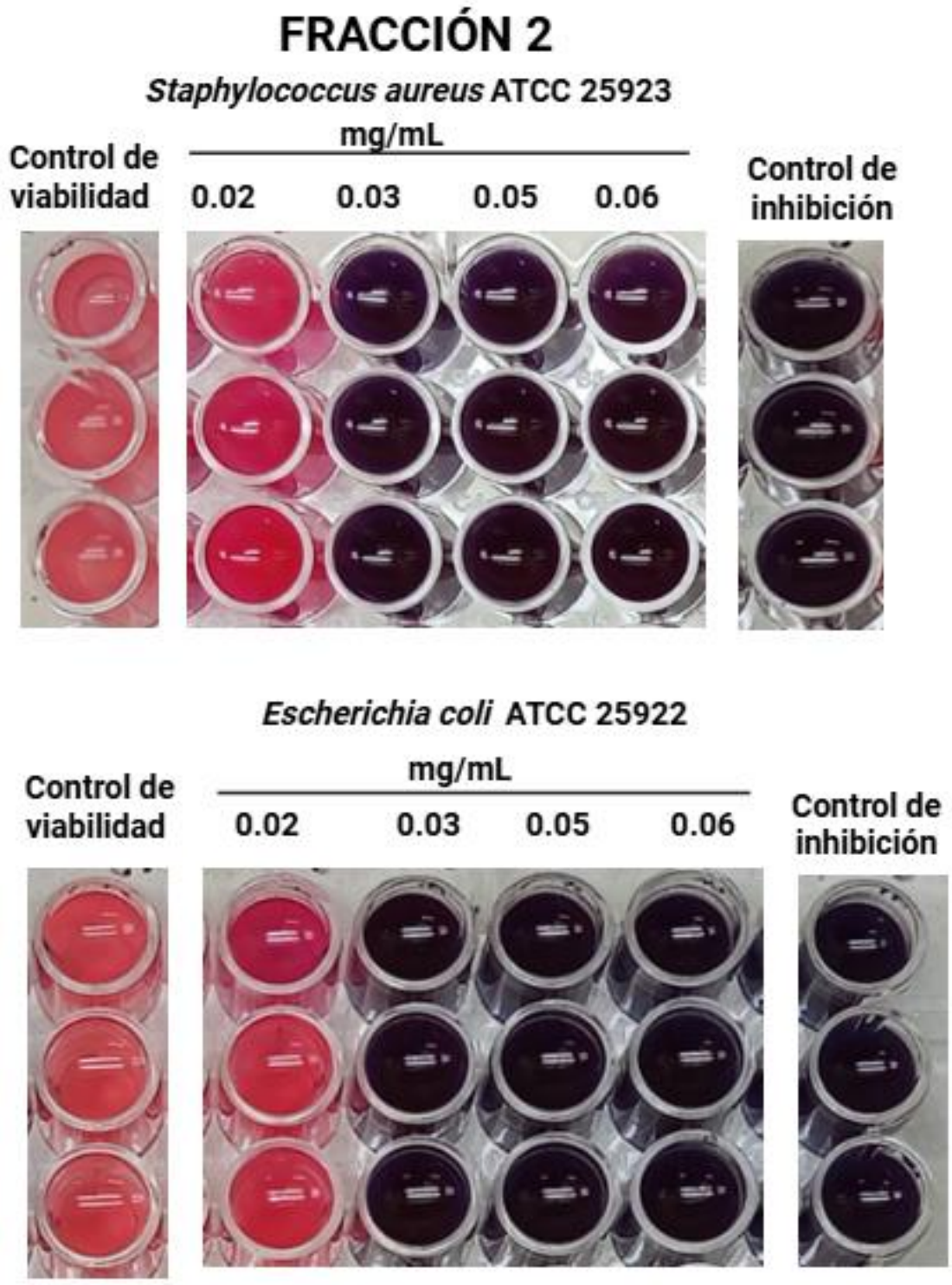


Figura 18. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina donde se muestra que ambas bacterias presentan una MIC= 0.03 con colores muy uniformes con un color azul intenso lo que indica que hay una lata inhibición. Ambas con alta inhibición respecto a colorimetría.

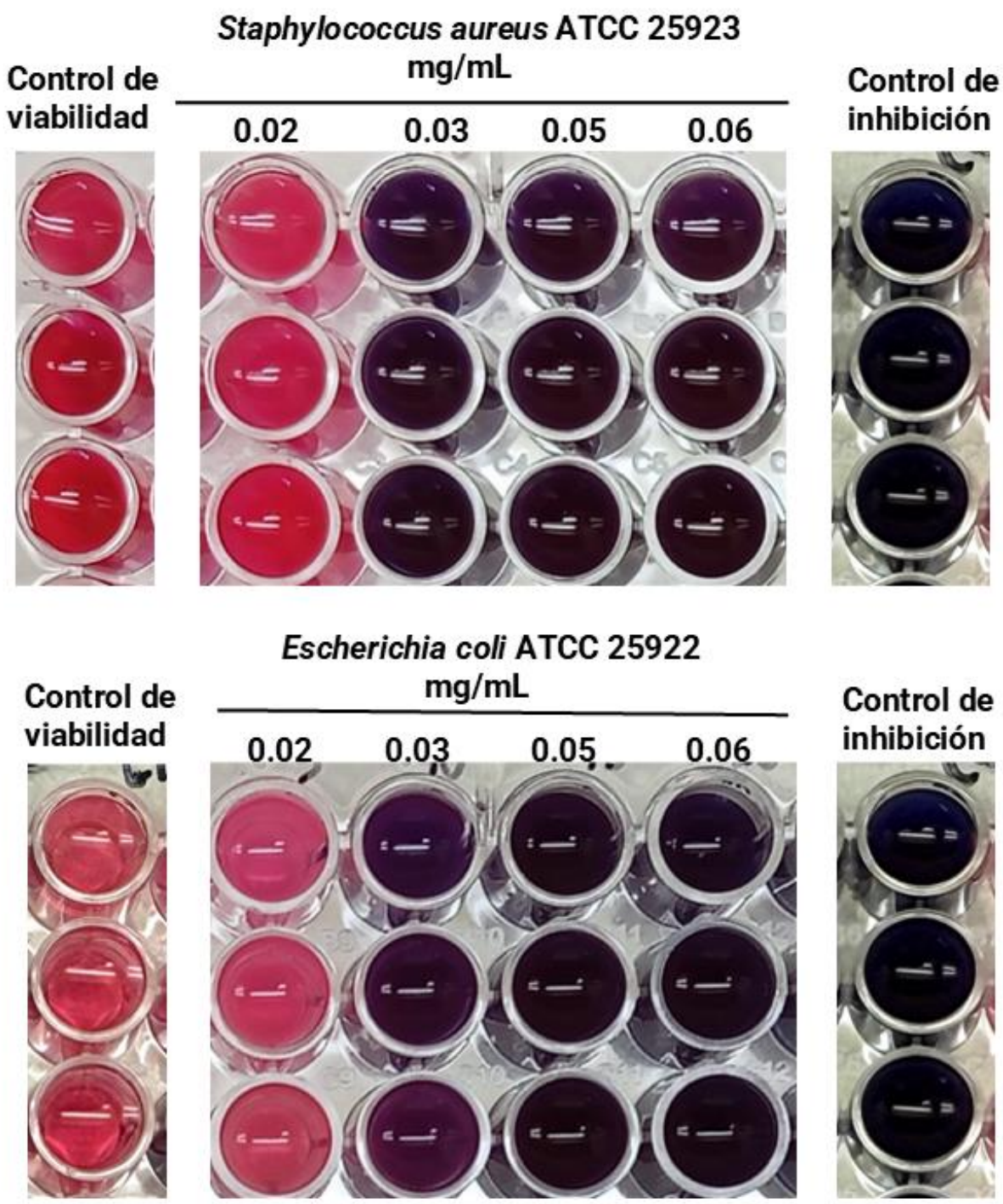


Figura 19. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina donde se muestra la construcción de una curva de actividad antimicrobiana, a partir de la fracción 3. Con una MIC= 0.03 mg/mL tanto para *S. aureus* como para *E.coli.* Ambas con alta inhibición respecto a colorimetría.

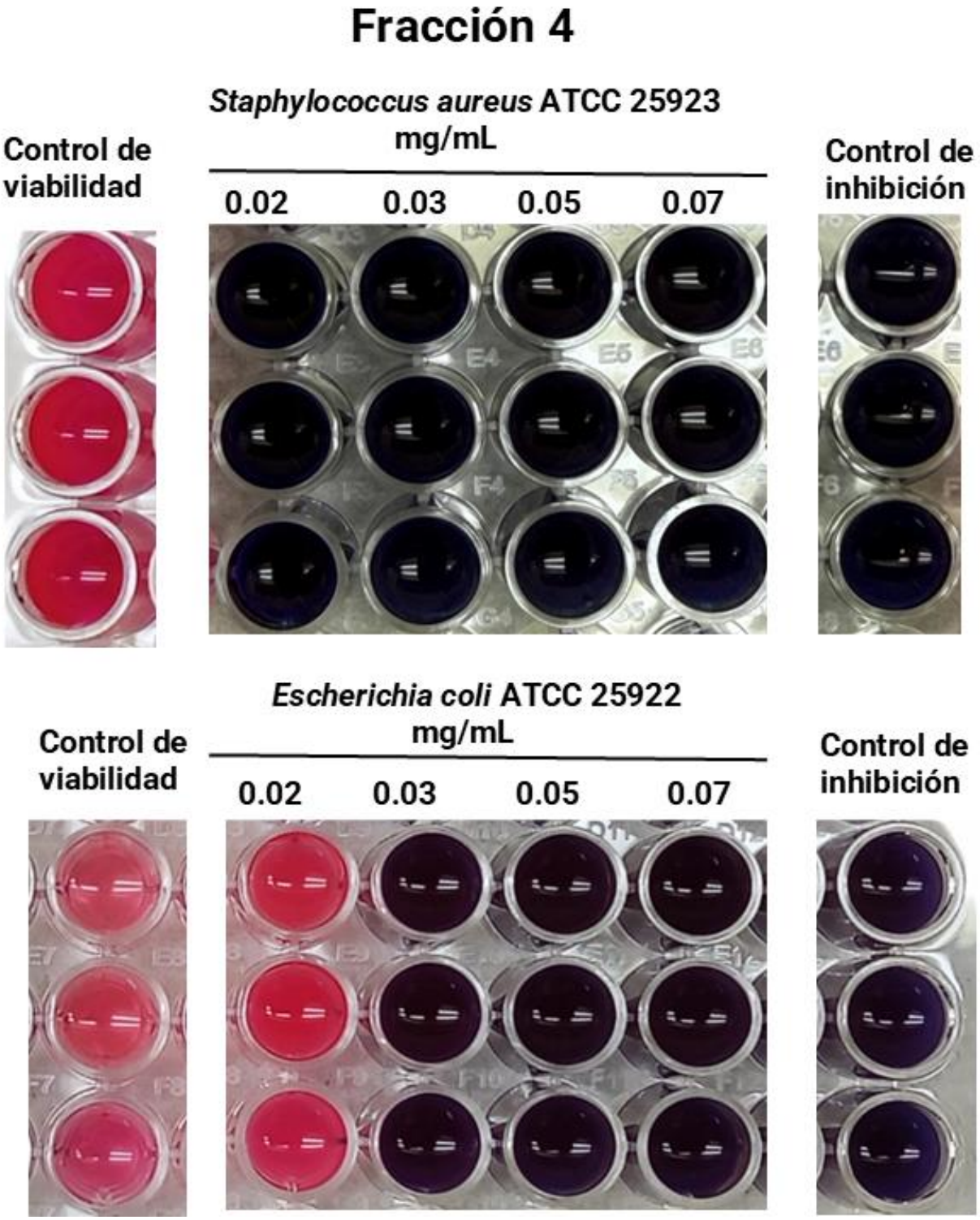


Figura 20. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 4, que fue la más efectiva para inhibir desde MIC= 0.02 mg/mL a *S. aureus* mientras que para *E. coli* tiene una MIC de 0.03 mg/mL, ambas con alta inhibición respecto a colorimetría.

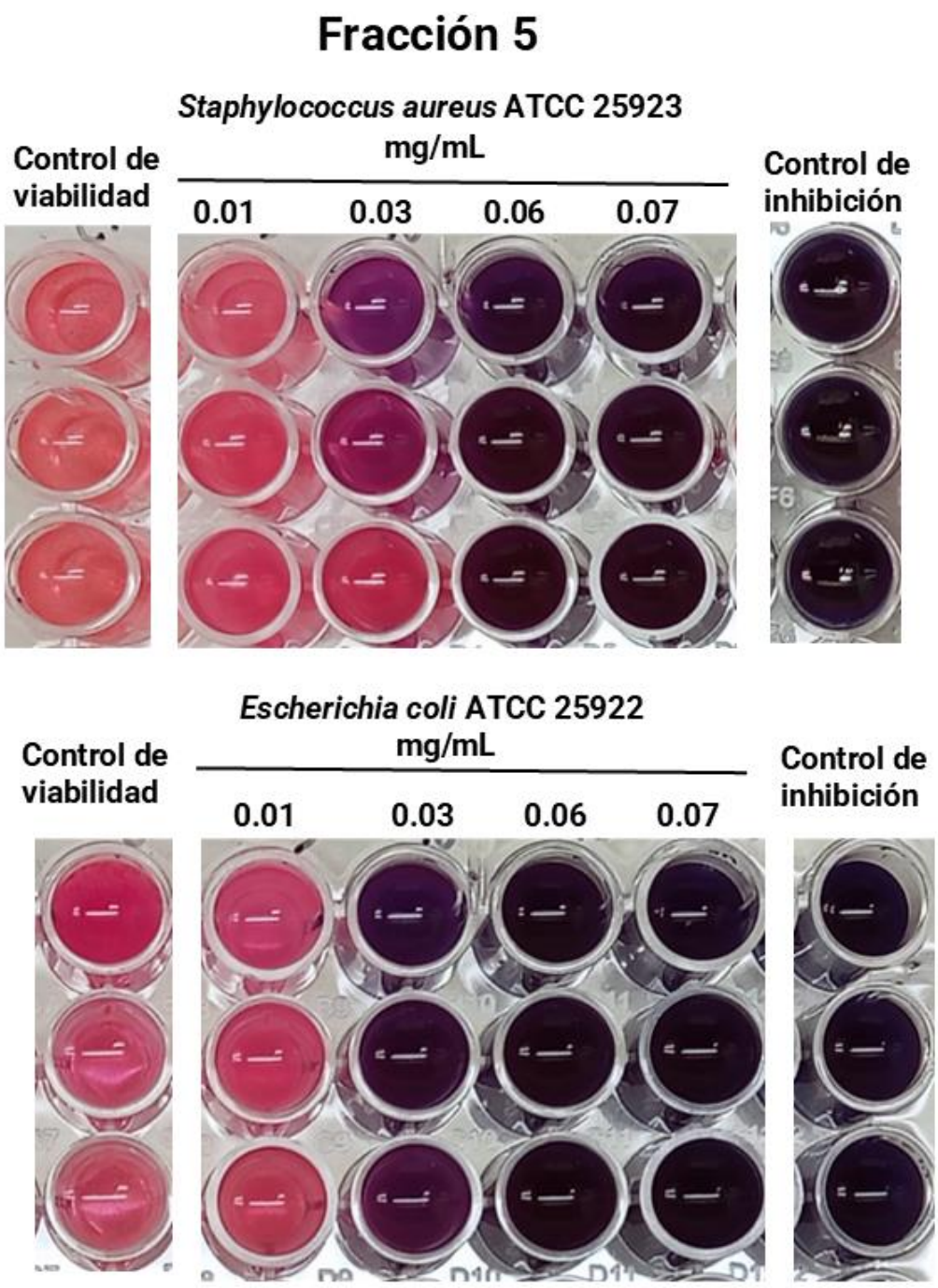


Figura 21. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5. El comportamiento de *S. aureus* respecto a crecimiento no fue parcial en la concentración de 0.03 mg/mL esto se puede deber a variaciones en la temperatura de incubación, mientras tanto presenta una MIC= 0.06. *E. coli* presenta una MIC= 0.03 mg/mL.

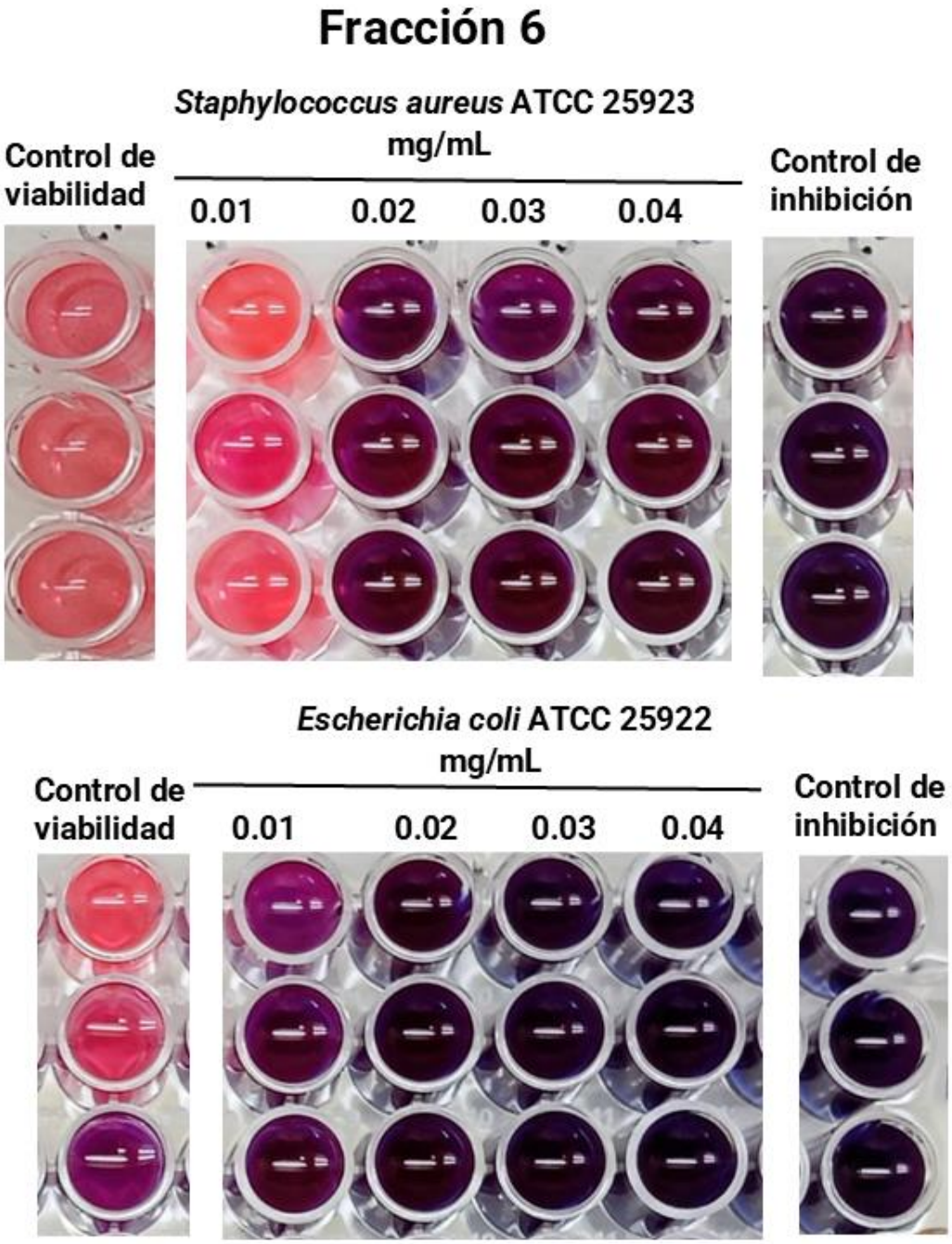


Figura 22. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 6. En el resultado de este ensayo se puede observar cómo hay mediana inhibición para ambas bacterias, respecto a colorimetría. Mostrando una MIC= 0.02 mg/mL para *S. aureus* y para *E. coli* MIC= 0.01 mg/mL.

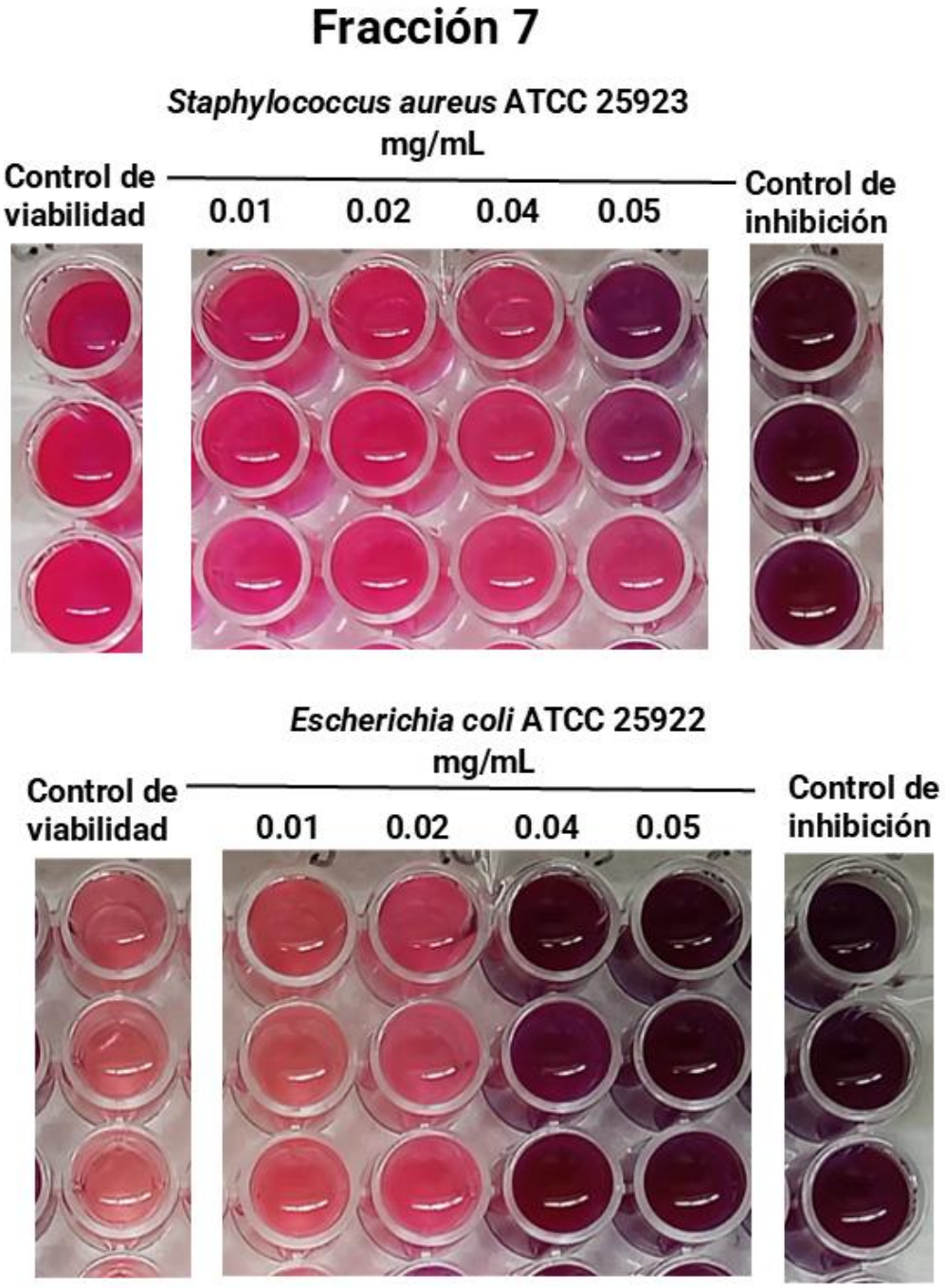


Figura 23. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 7. En la figura se muestra cómo no hay inhibición con la fracción 7 para *S. aureus* por lo tanto no existe una MIC. El caso contrario que sucedió con *E. coli* tiene una MIC= 0.04 mg/mL, con mediana inhibición respecto a tonalidad de morado.

A continuación, se presentan los resultados de las siete fracciones obtenidas de la columna 2 (segunda replica), todas presentando un correcto control positivo y negativo.

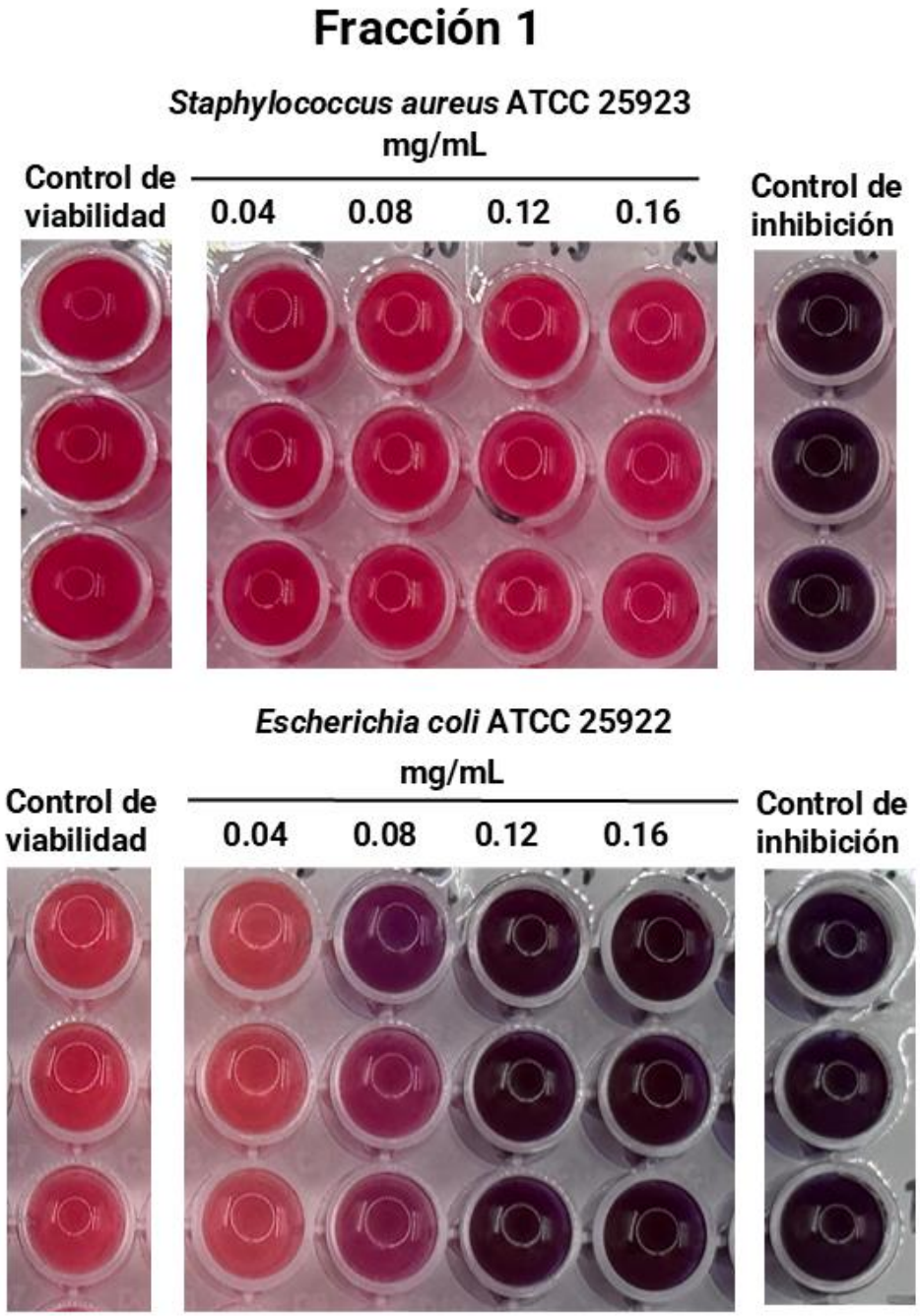


Figura 24. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 1. Se muestra inhibición nula para *S. aureus* por lo tanto no tiene una MIC. Con *E. coli* si tiene efectividad a baja inhibición respecto a colorimetría, con una MIC= 0.08 mg/mL.

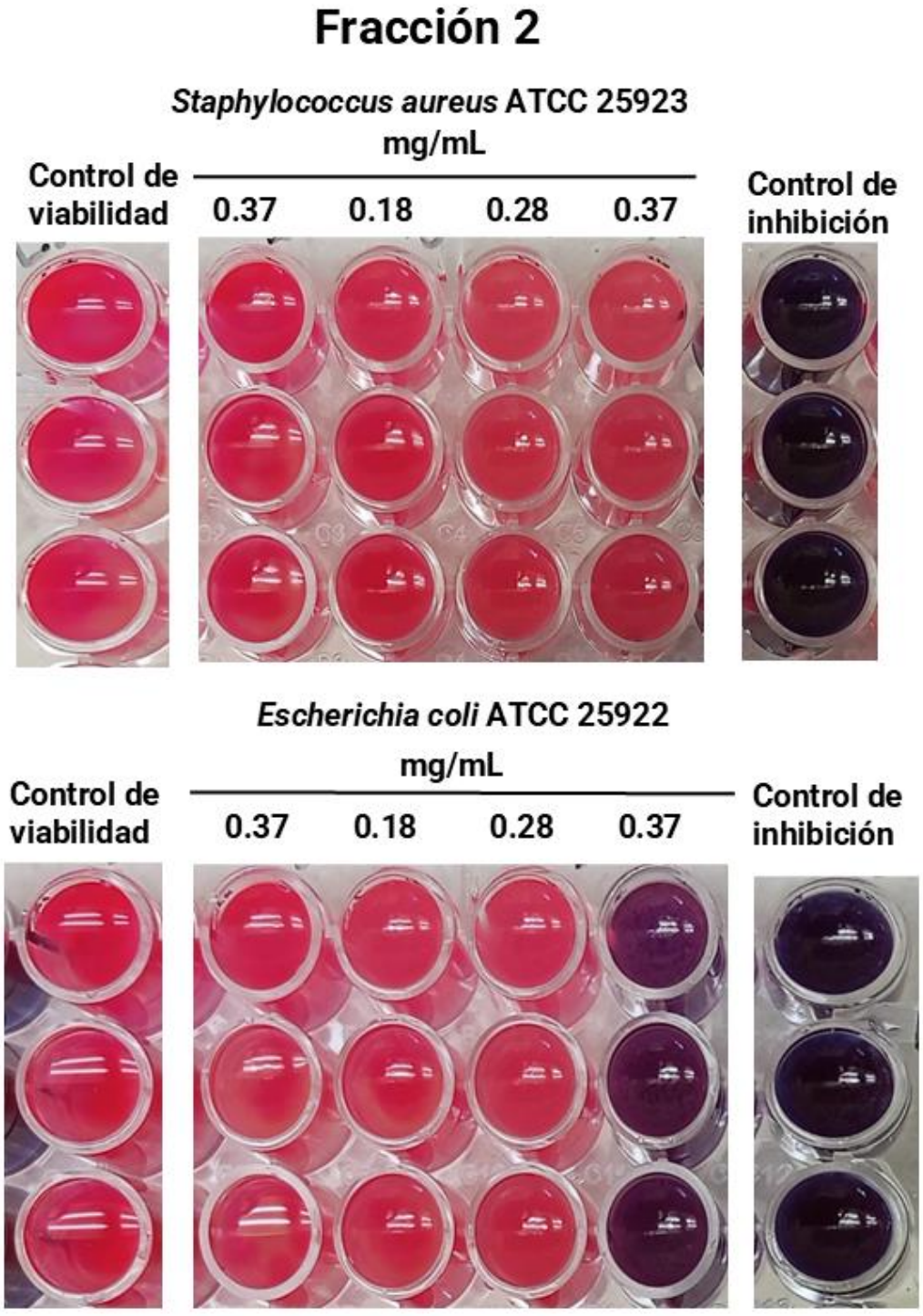


Figura 25. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 2. Se muestra que para *S. aureus*, no existe una MIC. La actividad antimicrobiana para *E. coli* es mediana por la intensidad del color morado en el triplete con una MIC= 0.37 mg/mL.

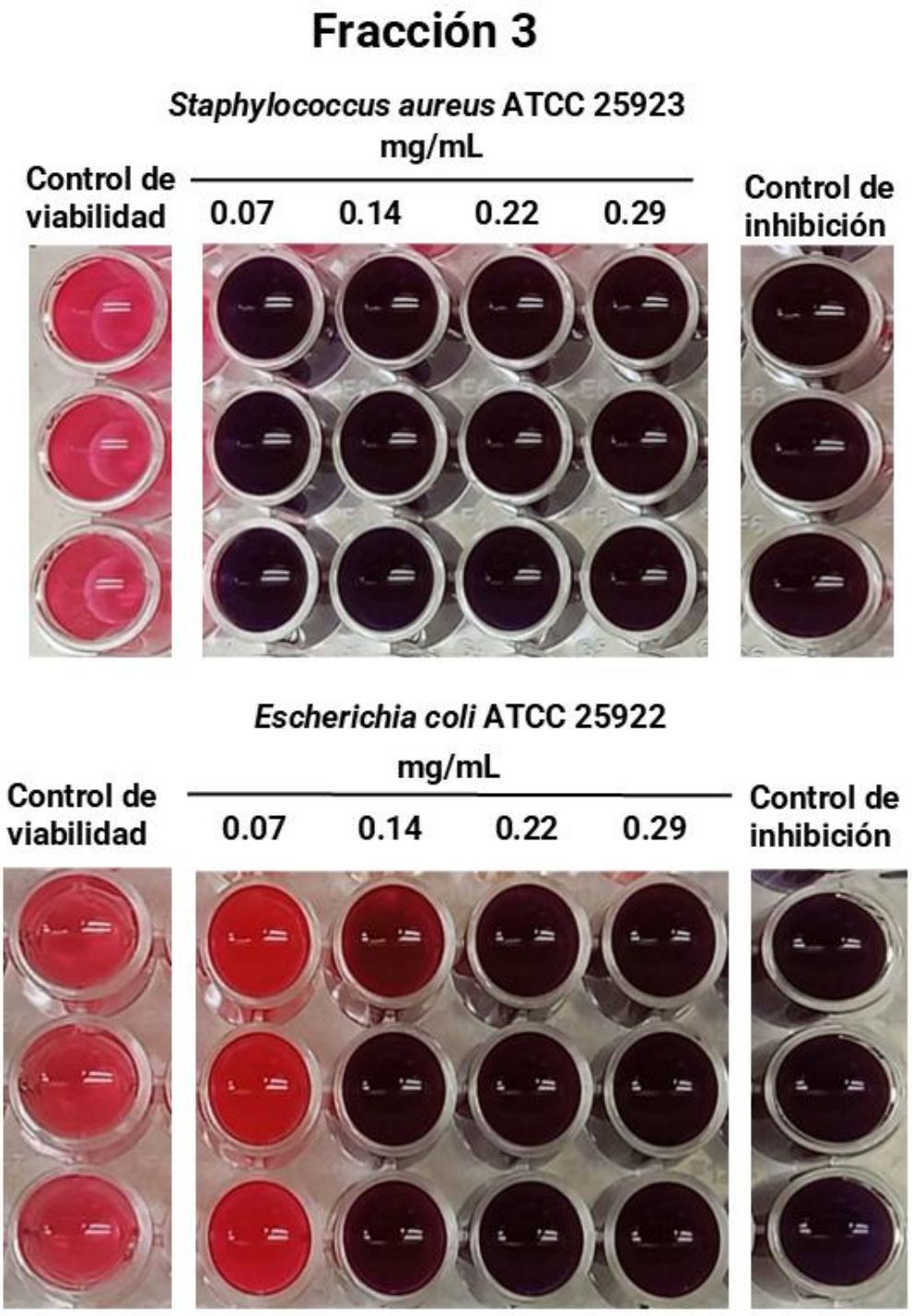


Figura 26. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 3. La presente figura evidencia la buena eficacia que tiene la fracción 3 para inhibir a *S. aureus* (alta inhibición) con una MIC= 0.07 mg/mL (la primera microdilución), para el caso de *E. coli* tiene una mediana inhibición por lo que muestra una MIC= 0.14mg/mL.

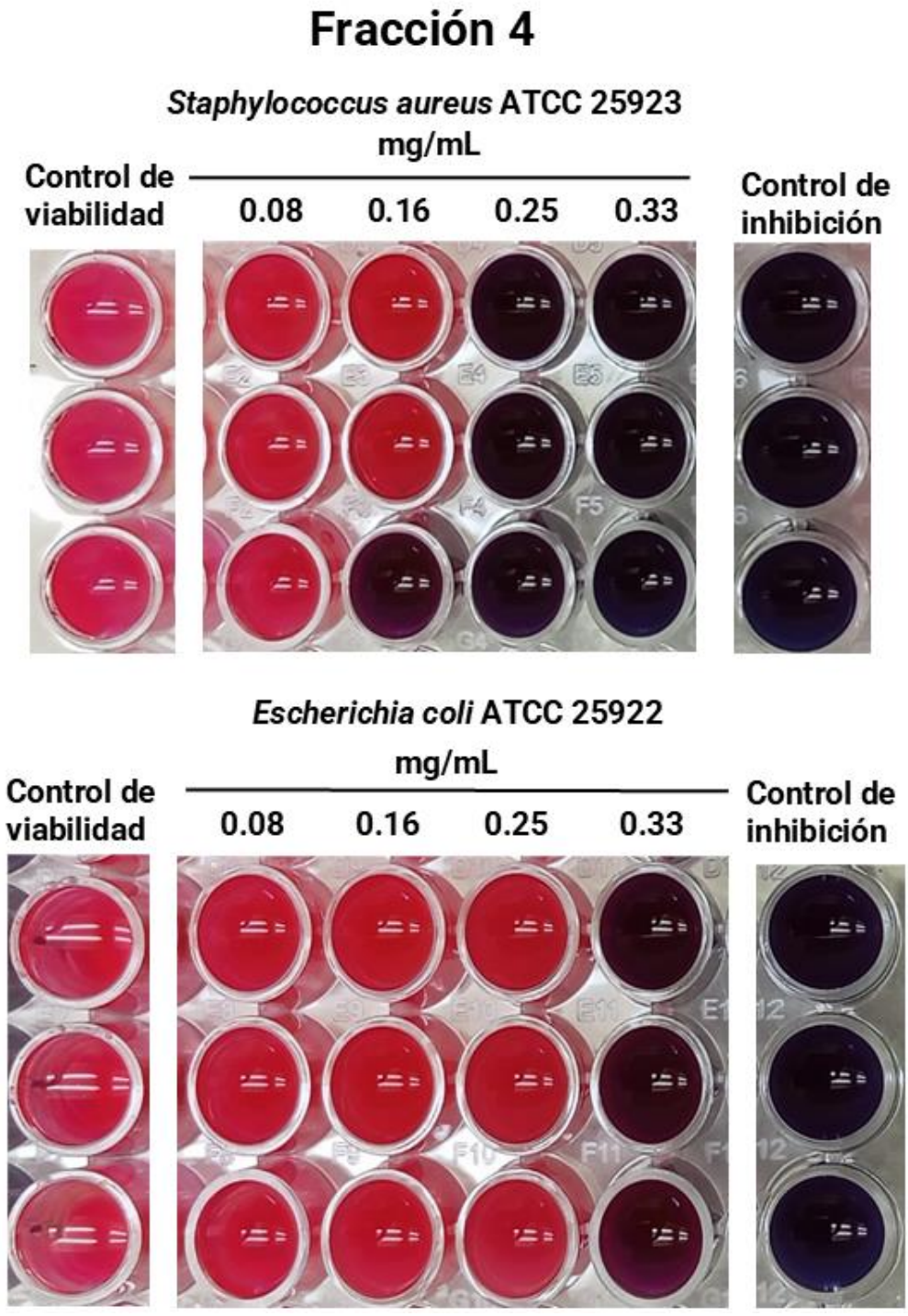


Figura 27. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 4. En este ensayo se puede observar como el crecimiento de *S. aureus* no fue parcial en la concentración 0.16mg/mL, a pesar de esta variación tiene una MIC= 0.25mg/mL. Para *E. coli* presenta una MIC= 0.33mg/mL. Ambas tienen una alta inhibición por el color morado intenso que presentan.

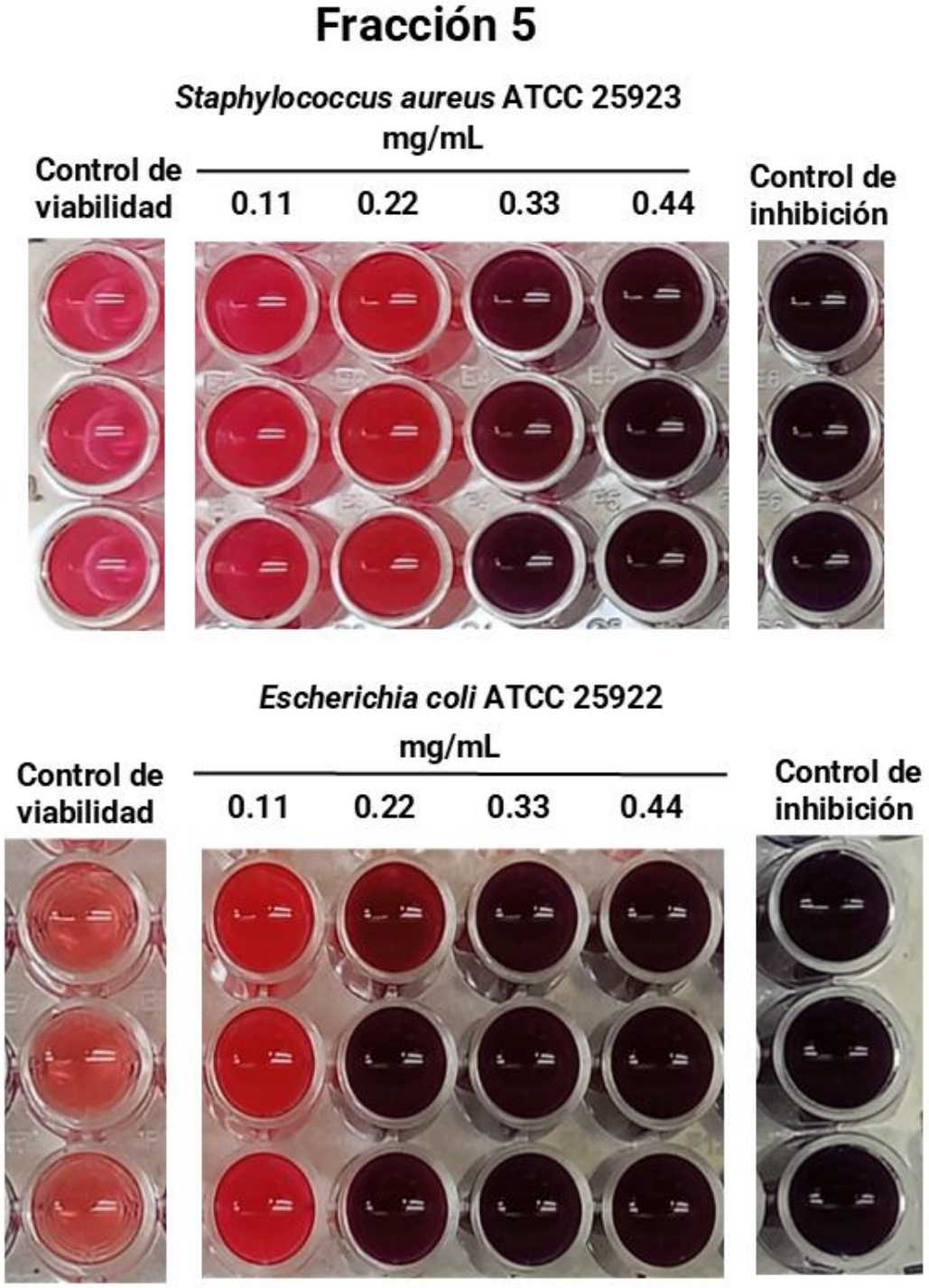


Figura 28. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5. La figura representa el resultado del ensayo con la fracción 5, donde ambas bacterias tienen inhibición mediana por colorimetría, presentando *S. aureus* una MIC= 0.33mg/mL y *E. coli* una MIC= 0.22mg/mL.

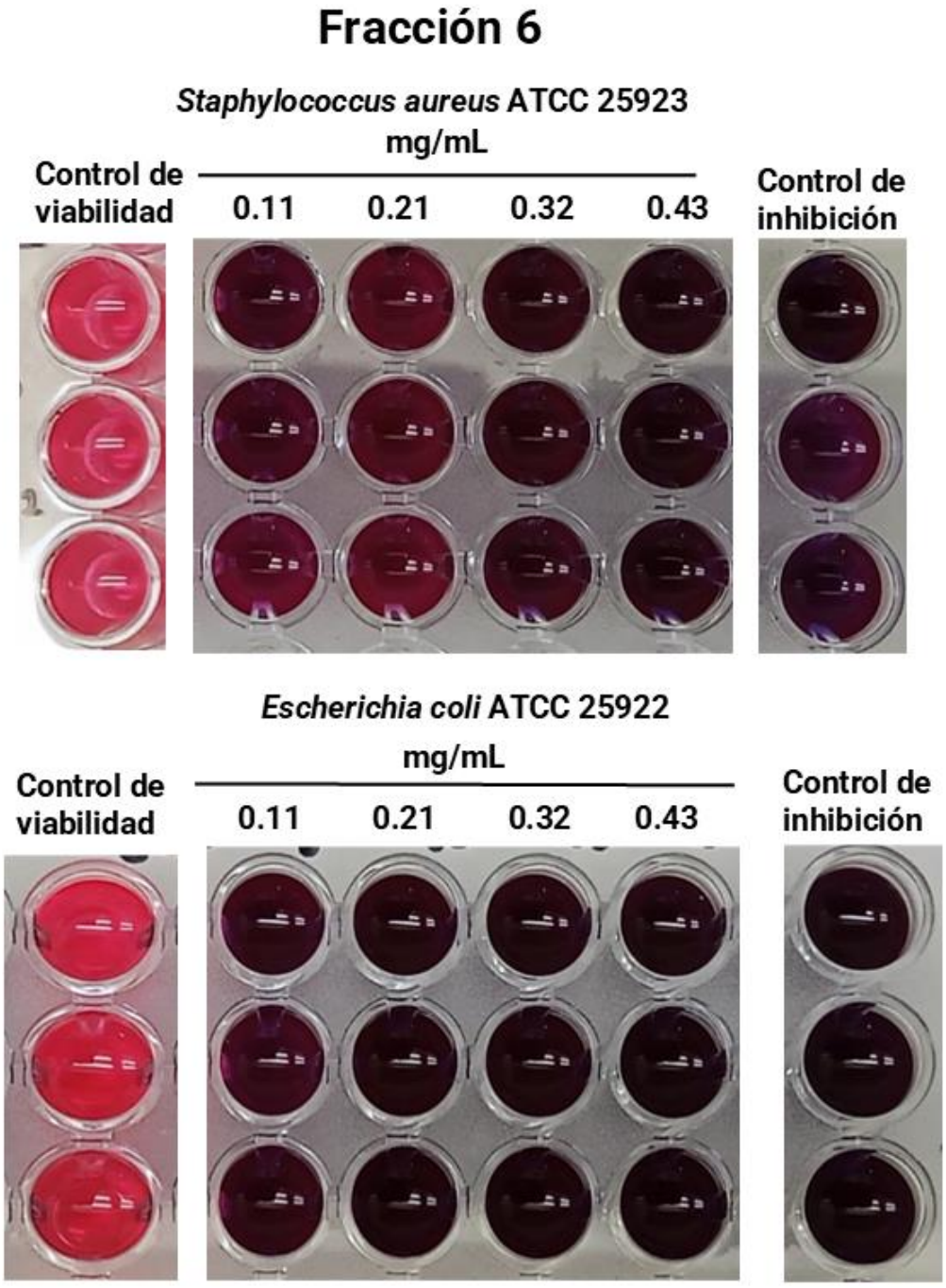


Figura 29. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 6. La presente figura permite interpretar que la fracción 6, tiene actividad antimicrobiana alta respecto a colorimetría y una MIC= 0.11mg/mL para ambas bacterias ensayadas (*S. aureus y E. coli*).

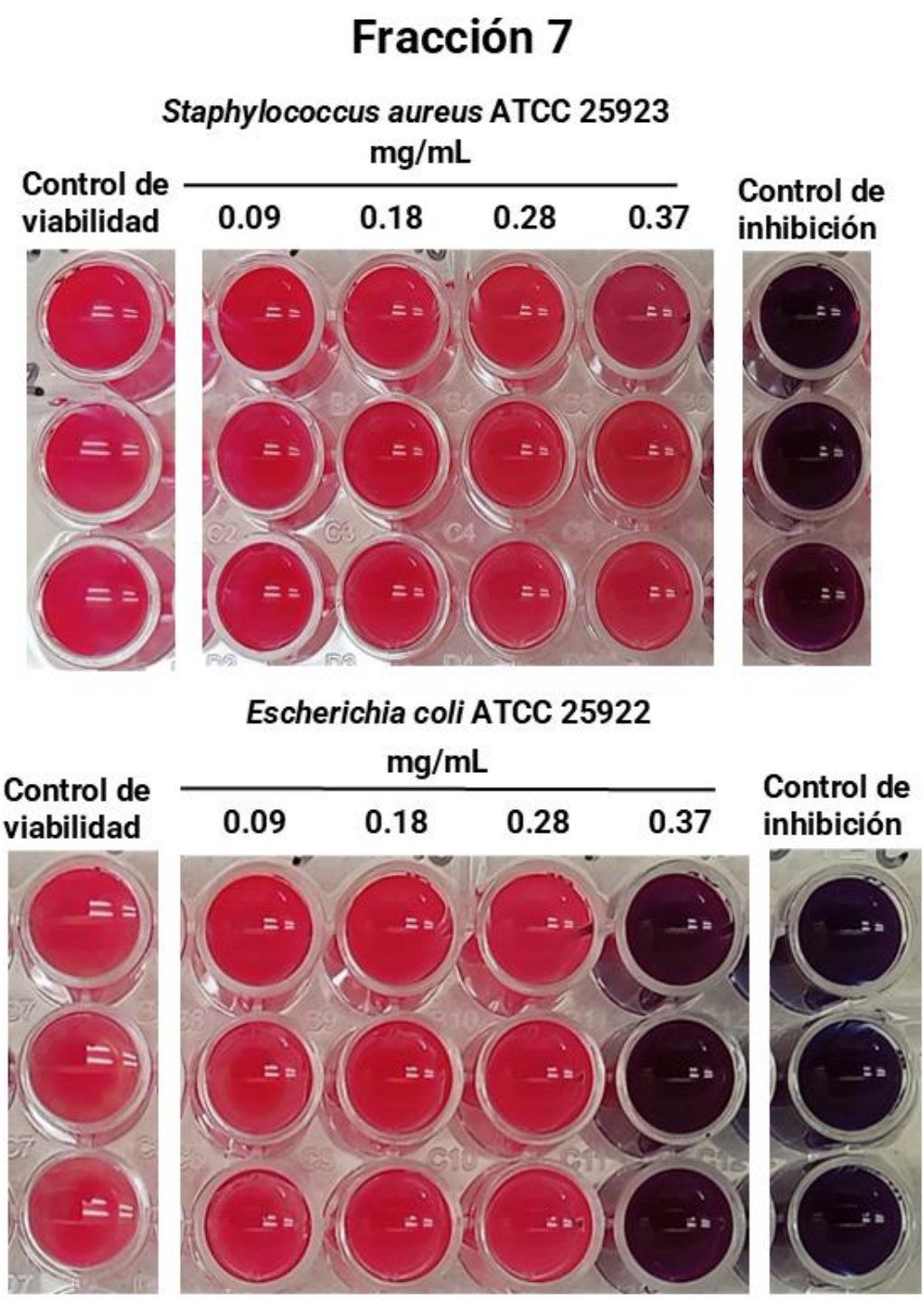


Figura 30. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 7. La presenta figura demuestra el comportamiento de efectividad bilateral de la fracción 7, visualizando que a pesar de tener las mismas concentraciones y tratamiento no tiene inhibición para *S. aureus* y si para *E. coli* con una MIC= 0.37mg/mL con una alta inhibición respecto a colorimetría.

En seguida, se presentan los resultados de las siete fracciones obtenidas de la columna 3 (tercera replica), todas presentando un correcto control positivo y negativo.

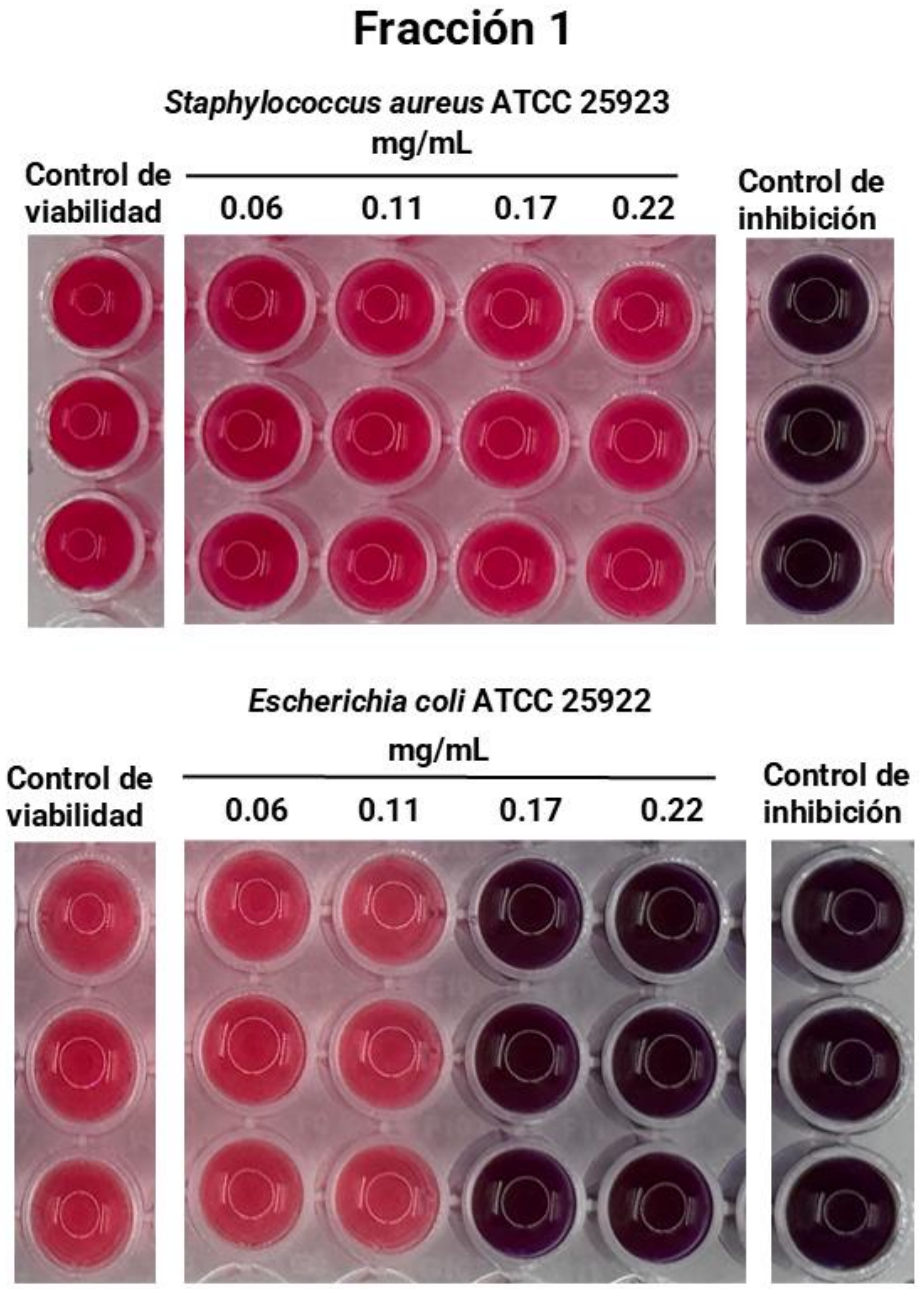


Figura 31. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 1. La fracción 1 mostrada, no presenta actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* por lo tanto no existe una MIC, presentando el mismo comportamiento que en la réplica 2. Para *E. coli* existe una MIC= 0.17mg/mL con una alta inhibición por el color morado que presenta.

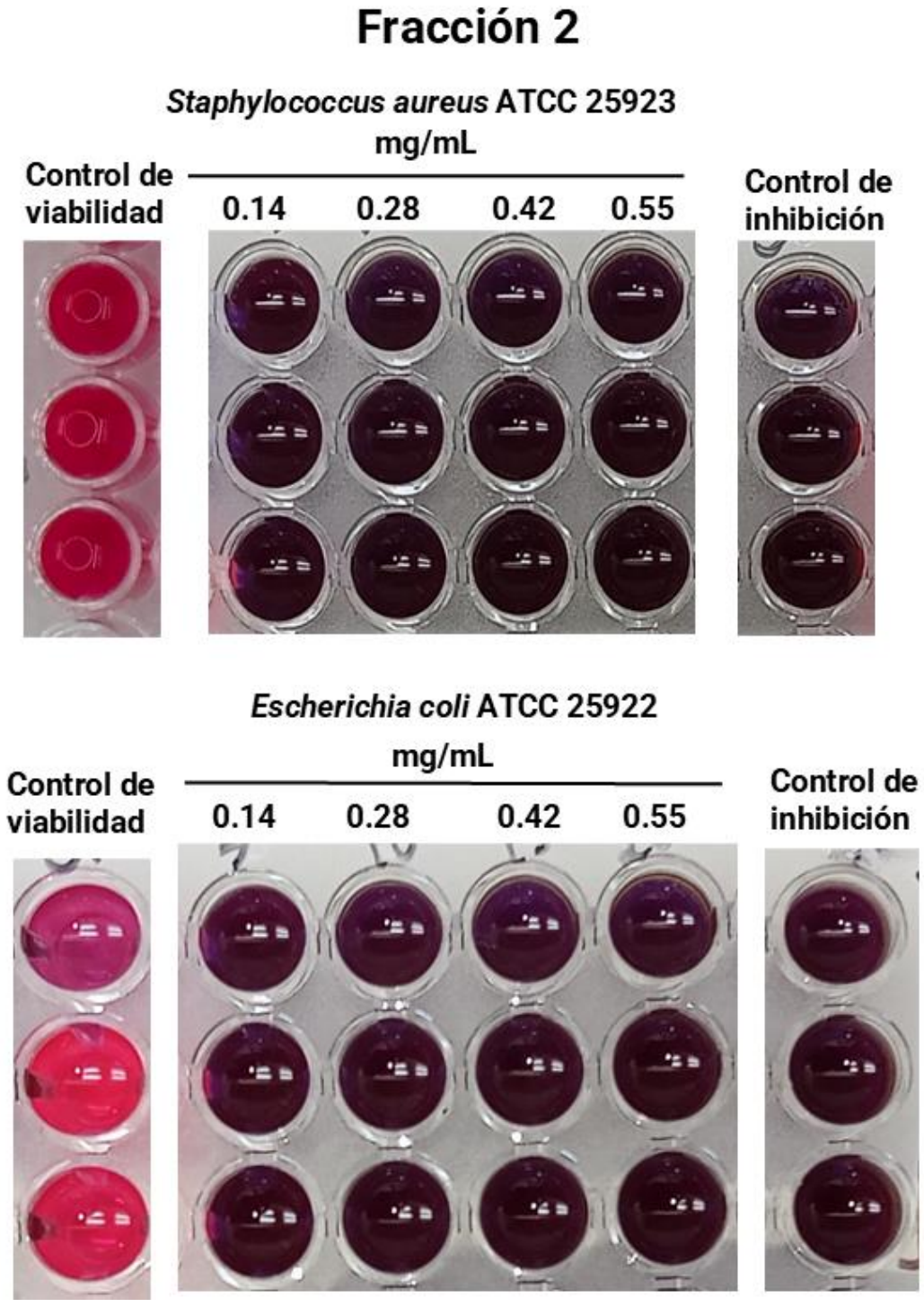
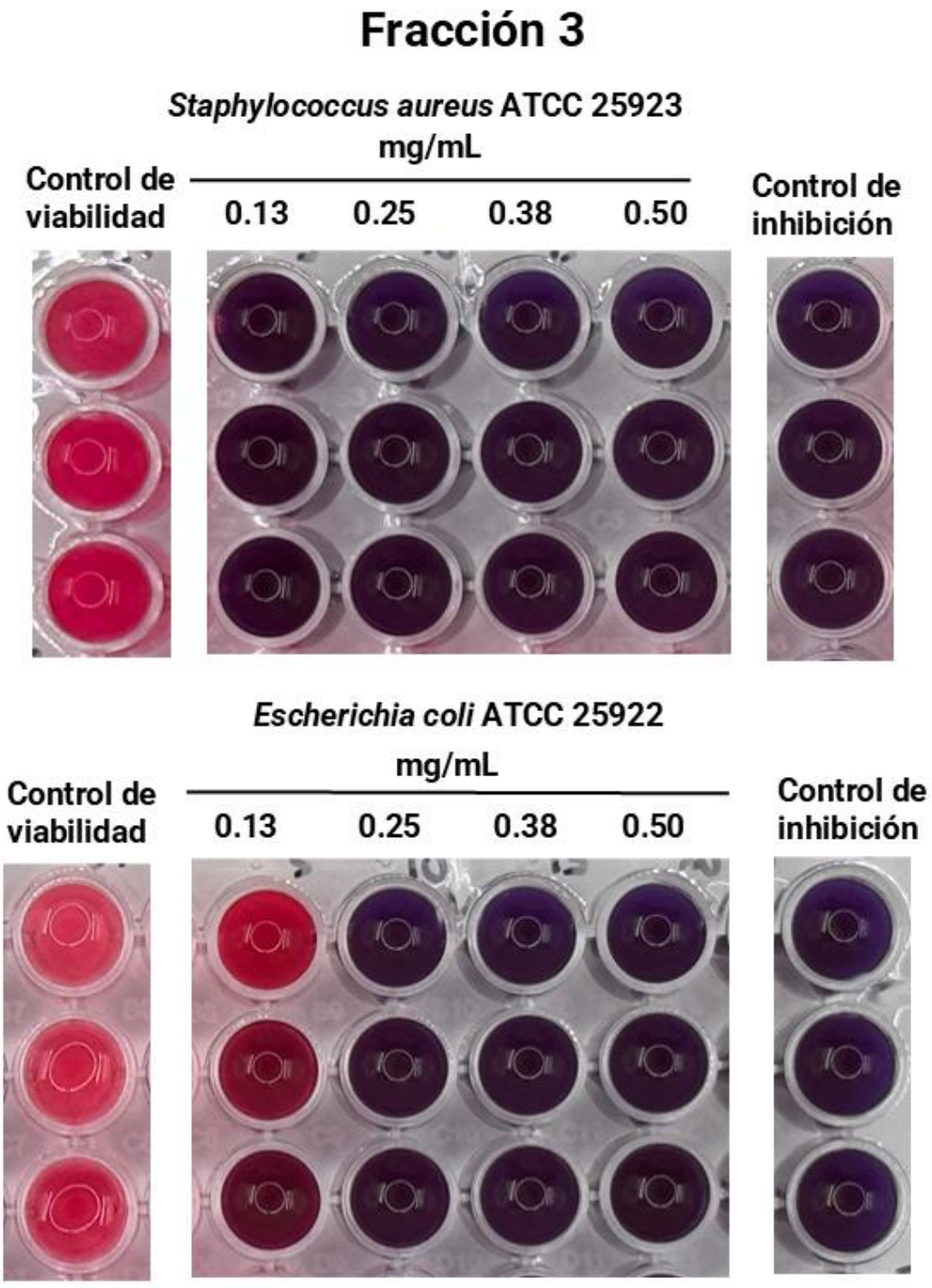


Figura 32. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 2. El resultado de la fracción 2 como se visualiza en la figura, tiene una buena y alta efectividad antimicrobiana para *E. coli* y *S. aureus*, logrando una MIC= 0.14mg/mL.



mostrando para *S. aureus* una MIC= 0.13mg/mL (la primera concentración) y para *E. coli* una MIC= 0.25mg/mL. Ambas con una lata inhibición respecto a colorimetría.

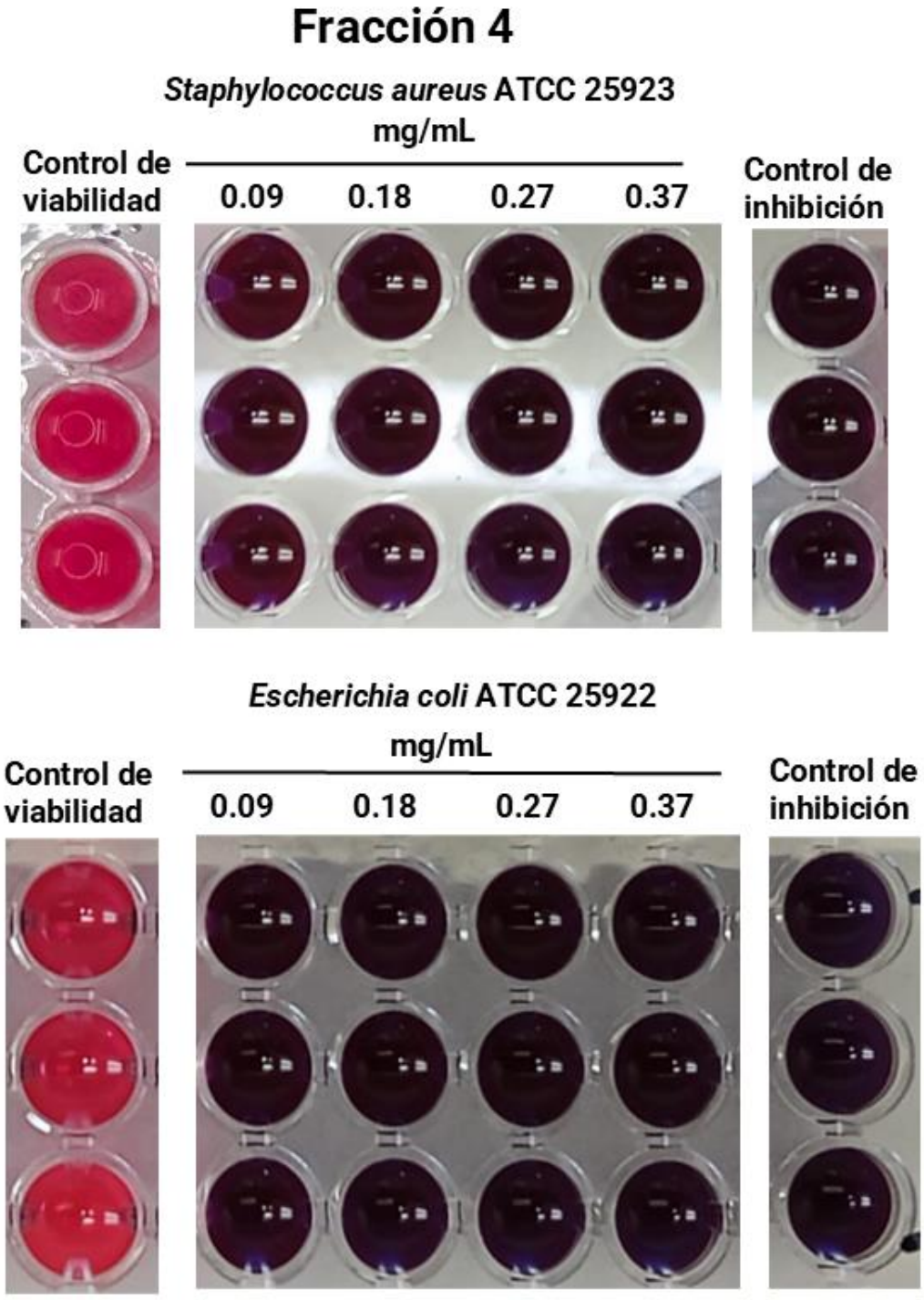


Figura 34. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 4. La efectividad antimicrobiana, que se muestra para la fracción 4 es con una alta inhibición por el color morado oscuro que muestran los tripletes de ambas bacterias, también logrando tanto para *S.aureus* como para *E.coli* una MIC= 0.09mg/mL.

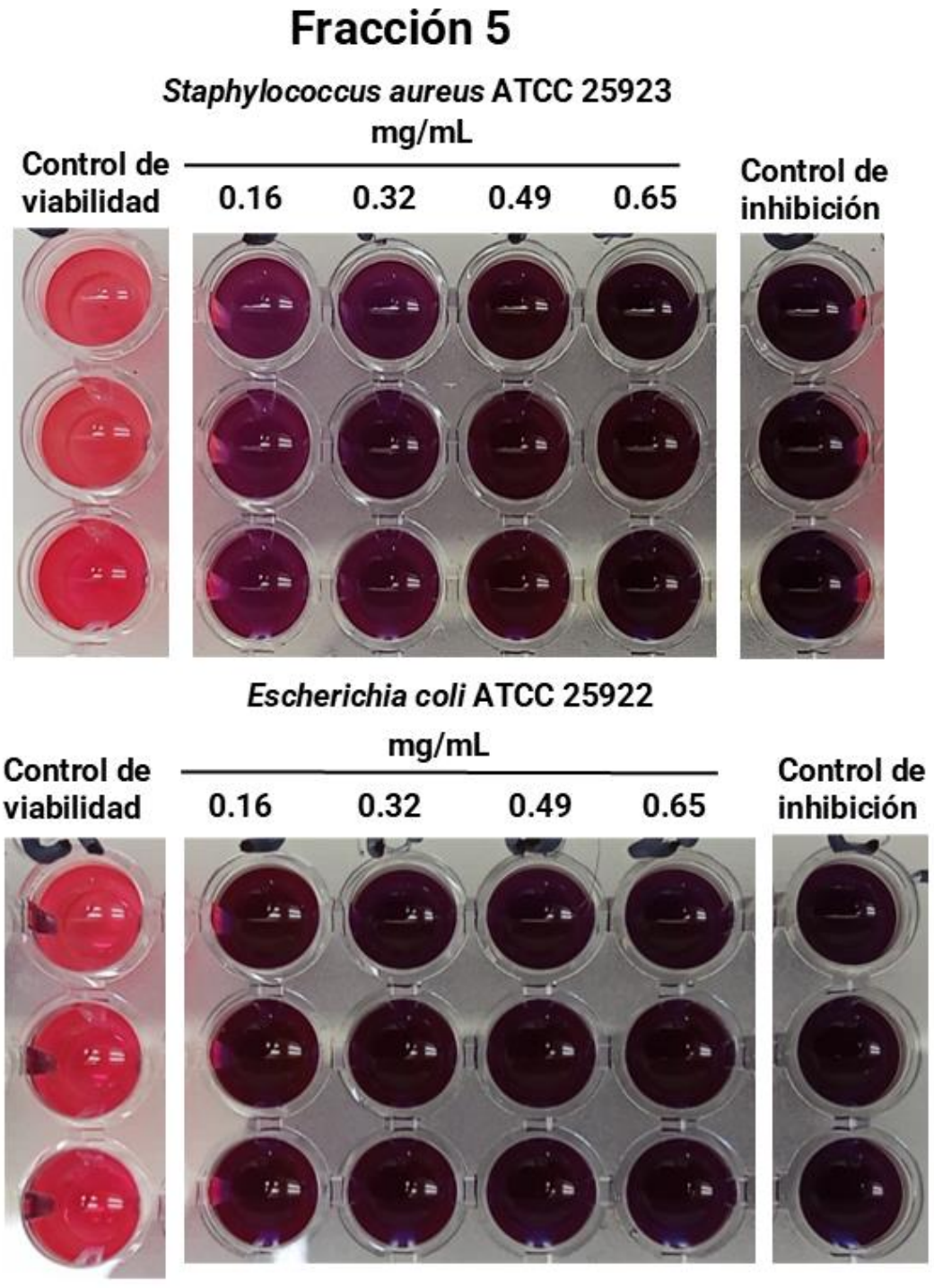


Figura 35. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 5. Al igual que la fracción 4, la fracción 5 muestra buena actividad antimicrobiana y alta inhibición respecto a colorimetría y una MIC= 0.16mg/mL, para ambas bacterias (*S.aureus* y *E. coli*).

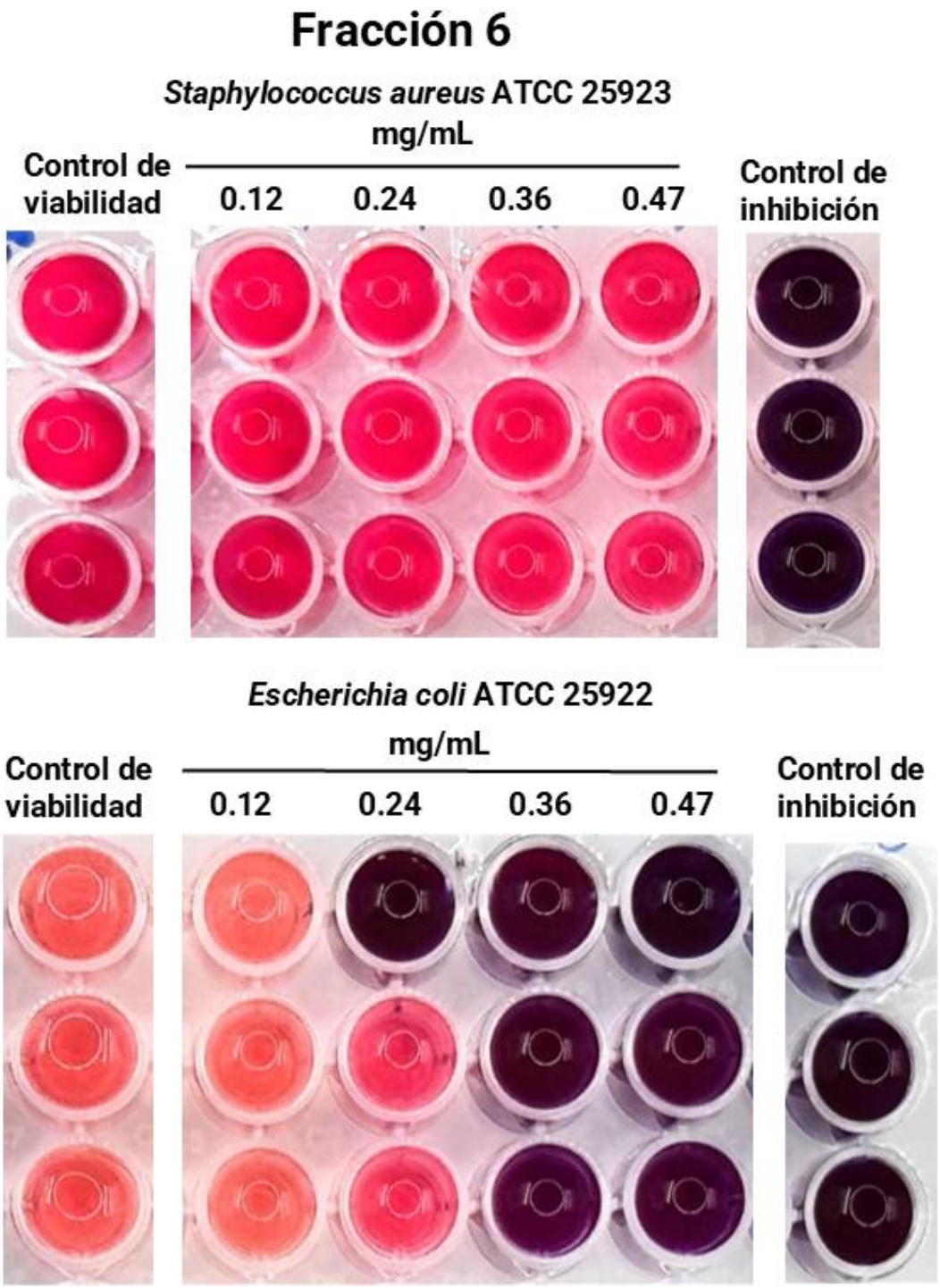


Figura 36. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 6. La presente figura muestra como la fracción 6 no tiene actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* (no existe MIC), por el lado contrario exhibe una MIC= 0.36mg/mL para *E.coli.* también se visualiza como el triplete de la concentración 0.24mg/mL para esta misma bacteria, no es homogéneo, esto se puede deber a que en el primer pozo no crecieron las bacterias colocadas, se infiere que la causa es la variación de temperatura en la incubadora y ambiente.

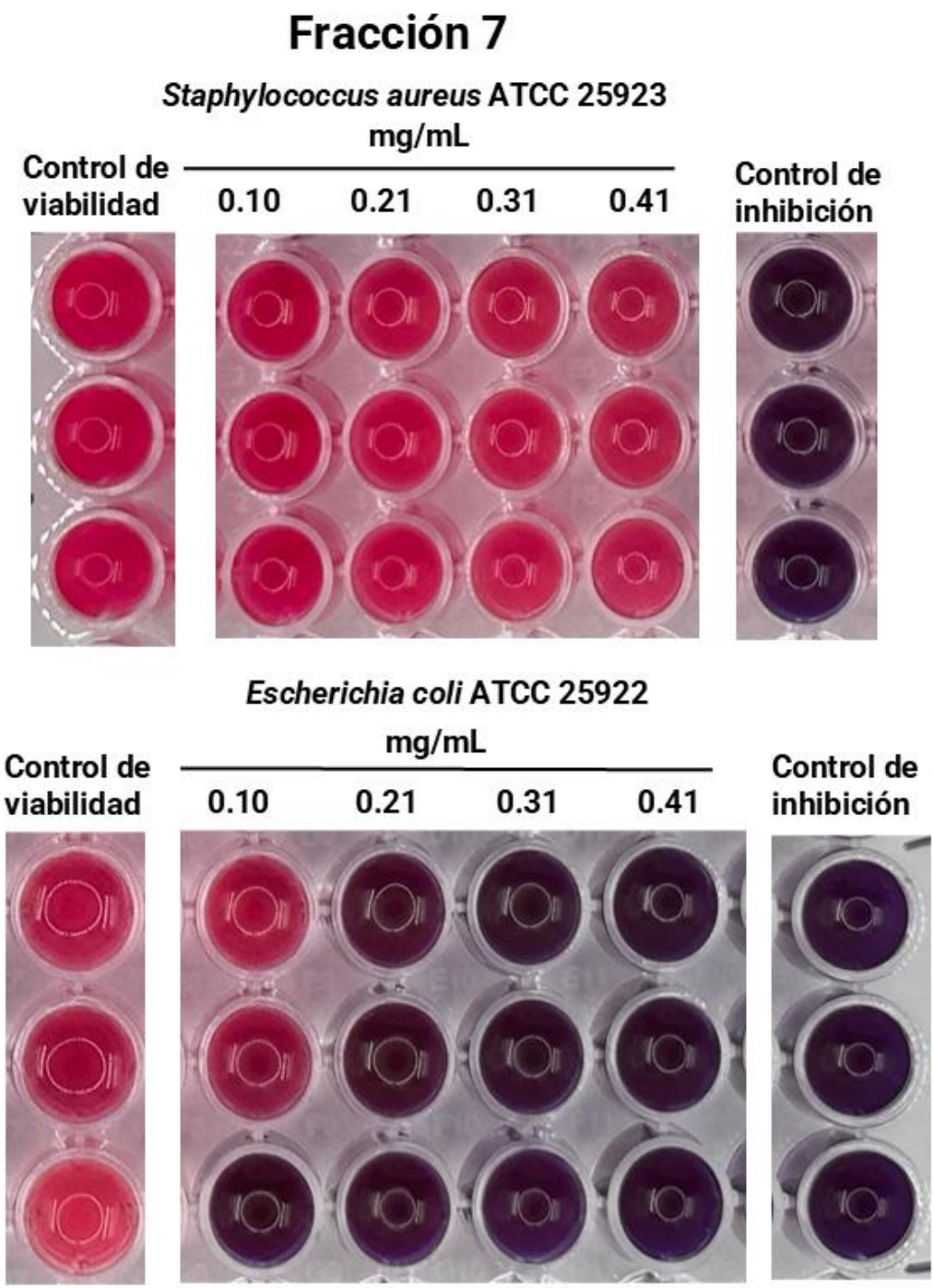


Figura 37. Ensayo comparativo de microdilución en caldo con resazurina para la fracción 7. En la presente figura se puede ver la tendencia de la fracción 7 la cual no tiene efecto inhibitorio sobre *S. aureus*, por lo tanto, no existe una MIC. Para el caso de *E. coli* si presenta una MIC= 0.21mg/mL. En la concentración 0.10 mg/mL se presenta el mismo problema de crecimiento parcial en el triplete causado muy probablemente por la variación de temperatura en la incubadora.

7.7 Determinación de MIC resultantes de TLC y cromatografía en columna

Tabla 10. Concentrado de las MIC para *S.aureus* y *E. coli*

TLC		
Fracción	**MIC**	
	S.aureus	***E. coli***
1	0.04	0.02
2	0.03	0.04
3	*0.01	*0.01

Tabla 11. Concentrado de las MIC para *S.aureus,* de la columna 1

Columna 1		
Fracción	**MIC (mg/mL)**	
	S.aureus	***E. coli***
1	0.07	0.07
2	0.03	0.03
3	0.03	0.03
4	0.02	0.03
5	0.06	0.03
6	*0.02	*0.01
7	X	0.04

Tabla 12. Concentrado de las MIC para *S.aureus,* de la columna 2

Columna 2		
Fracción	**MIC (mg/mL)**	
	S.aureus	***E. coli***
1	X	*0.08
2	X	0.37
3	*0.07	0.14

4	0.25	0.33
5	0.33	0.22
6	0.11	0.11
7	X	0.37

Tabla 13. Concentrado de las MIC para *S.aureus,* de la columna 3

Columna 3		
Fracción	**MIC (mg/mL)**	
	S.aureus	***E. coli***
1	X	0.17
2	0.14	0.14
3	0.13	0.25
4	*0.09	*0.09
5	0.16	0.16
6	X	0.36
7	X	0.21

*MIC más baja X= No hay inhibición

Tabla 14. Comparación de las MIC más bajas, entre las réplicas de la columna

Columna	**MIC (mg/mL)**	
	S.aureus	***E. coli***
1	0.02	0.01
2	0.07	0.08
3	0.09	0.09

Al analizar las **Tablas 11-14**, se observa que la columna 1 presentó las MIC más bajas en comparación con las columnas 2 y 3. Esto podría deberse a que los factores abióticos y bióticos afectan la producción de metabolitos secundarios en la liana. Aunque se trata de una especie vegetal presente durante todo el año, pueden existir variaciones en sus componentes según la

época de recolección utilizada para la extracción. En este estudio, la materia vegetal de la columna 1 fue recolectada en abril (sin lluvias), la de la columna 2 en julio (con lluvias) y la de la columna 3 en agosto (sin lluvias, pero recién terminadas), lo que podría explicar las diferencias observadas en las MIC, ya que van ligadas a la eficacia antimicrobiana que presenta el fraccionamiento del extracto. En la columna 1 la MIC es más baja es de MIC= 0.02 para *S. aureus* y MIC= 0.01 para *E. coli*.

7.8 Determinación de MIC control con ampicilina

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del control positivo con antibiótico, en las **Figuras 38, 39**.

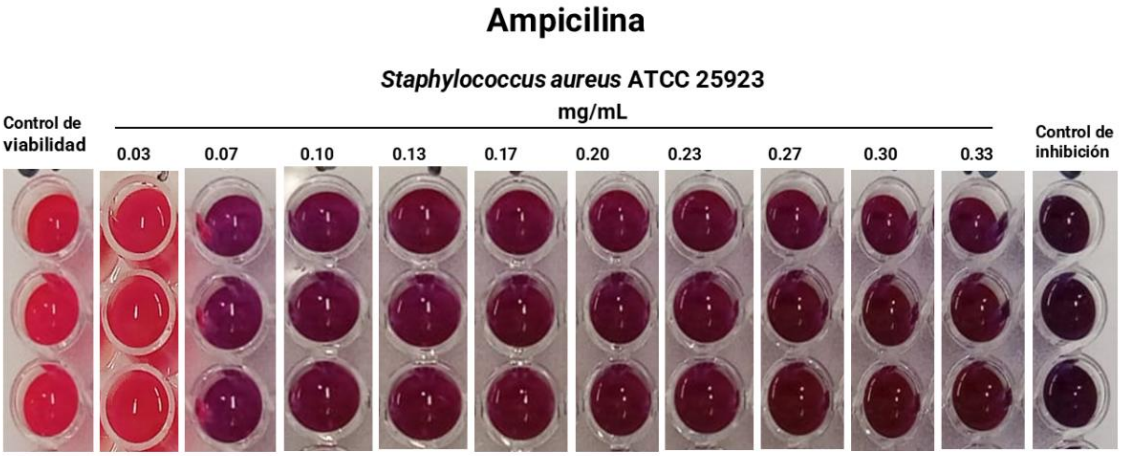


Figura 38. MIC para antibióticos de referencia con *S.aureus*

En este ensayo se determinó la MIC de ampicilina frente a *S. aureus* con el fin de compararla con la MIC más baja obtenida en las fracciones del extracto de *S. strobilophora*. La fracción 4 de la columna 1 presentó la MIC más baja, con un valor de 0.02 mg/mL, mientras que la ampicilina mostró una MIC= 0.07 mg/mL. Estos resultados indican que el extracto etanólico evaluado exhibió una MIC menor que la del antibiótico de referencia bajo las condiciones experimentales empleadas.

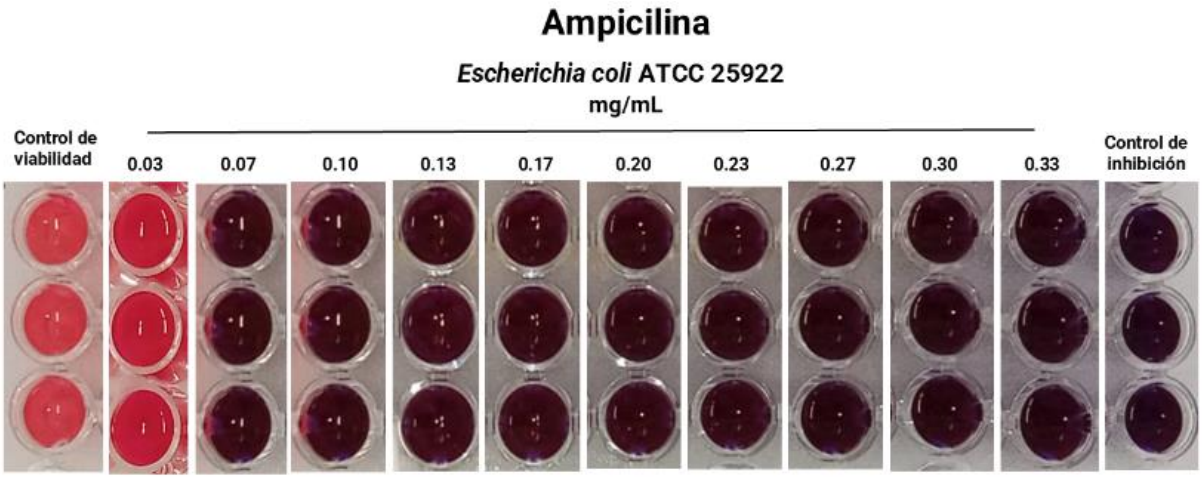


Figura 39. MIC para antibióticos de referencia con *E.coli*

En la figura se muestra la MIC obtenida para ampicilina frente a *E. coli*, con un valor de 0.07 mg/mL, en comparación con la MIC de 0.01 mg/mL registrada para la fracción 6 de la columna 1. Estos resultados indican que el extracto etanólico evaluado presentó una MIC menor que la del antibiótico de referencia bajo las condiciones experimentales empleadas.

Las MIC menores observadas en las **Figuras** anteriores (**38,39**), que la del antibiótico, sugiere mayor potencia antibacteriana in vitro, pero no implica que el extracto sea clínicamente más efectivo (falta farmacocinética, toxicidad, biodisponibilidad). Se infiere que la acción similar que tiene el extracto a un antibiótico es por alteración en la membrana celular, inhibición de síntesis de pared, inhibición de enzimas metabólicas, o formación de complejos con proteínas bacterianas. Esta actividad puede deberse a uno o varios compuestos actuando sinérgicamente, la presencia de múltiples compuestos pueden reducir la probabilidad de aparición rápida de resistencia en comparación con un único compuesto, como lo son los metabolitos secundarios especialmente, fenoles y flavonoides.

7.8 Determinación de porcentaje de inhibición y IC_{50} para las bacterias ensayadas

Las figuras presentadas a continuación muestran el comportamiento que tienen las fracciones frente a las bacterias ensayadas, en una relación porcentaje de inhibición y concentración final de fracción de extracto, lo que también se conoce como dosis-respuesta.

Se muestran las **Figuras 31-37** de las fracciones resultantes de la columna 3 de la evaluación frente a *S.aureus.* Estos resultados coinciden con reportes previos (Clushnie y Lamb, 2011) donde fracciones parcialmente purificadas de metabolitos secundarios exhiben

comportamientos no lineales en las primeras diluciones, estabilizándose conforme la concentración se aproxima a su intervalo óptimo de acción. En conjunto, los resultados demuestran que la fracciones frente a *S. aureus* presenta actividad antimicrobiana incipiente pero consistente**.**

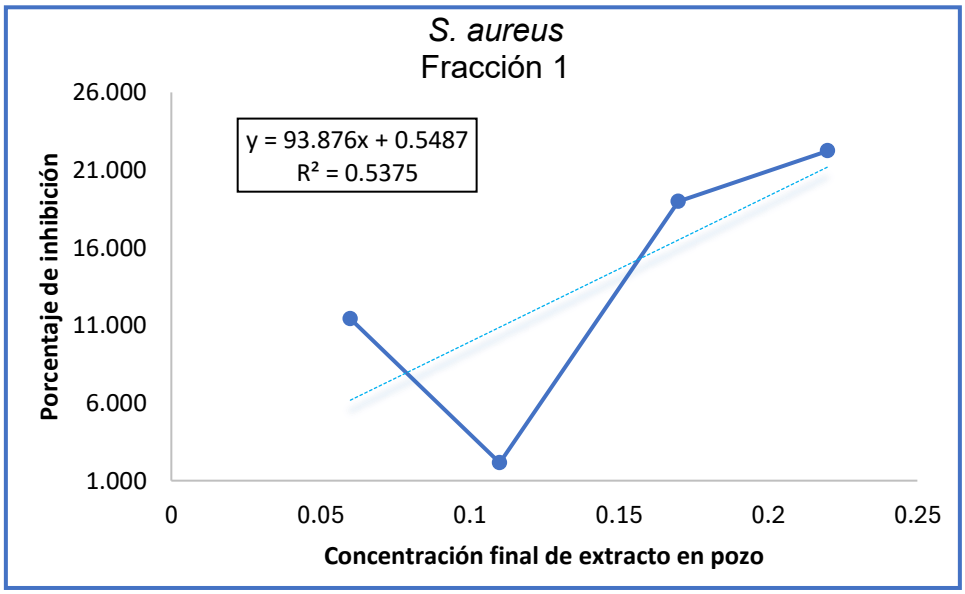


Figura 40. Resultado de dosis respuesta con fracción 1 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

Haciendo una correlación de la **Figura 40** con la **Figura 31** con *S.aureus,* se puede observar que no hubo inhibición a una concentración de 0.22 mg/ por lo tanto no hay porcentaje de inhibición. Se puede inferir respecto a la gráfica que, si extendemos la curva de respuesta de inhibición con mayor concentración de fracción 1, puede haber inhibición en algún punto de la curva. El ajuste lineal ($R^2 = 0.5375$) exhibe una correlación moderada, lo que indica que factores adicionales podrían estar influyendo en la respuesta, tales como variabilidad inherente a los metabolitos presentes en la fracción o posibles interacciones entre compuestos.

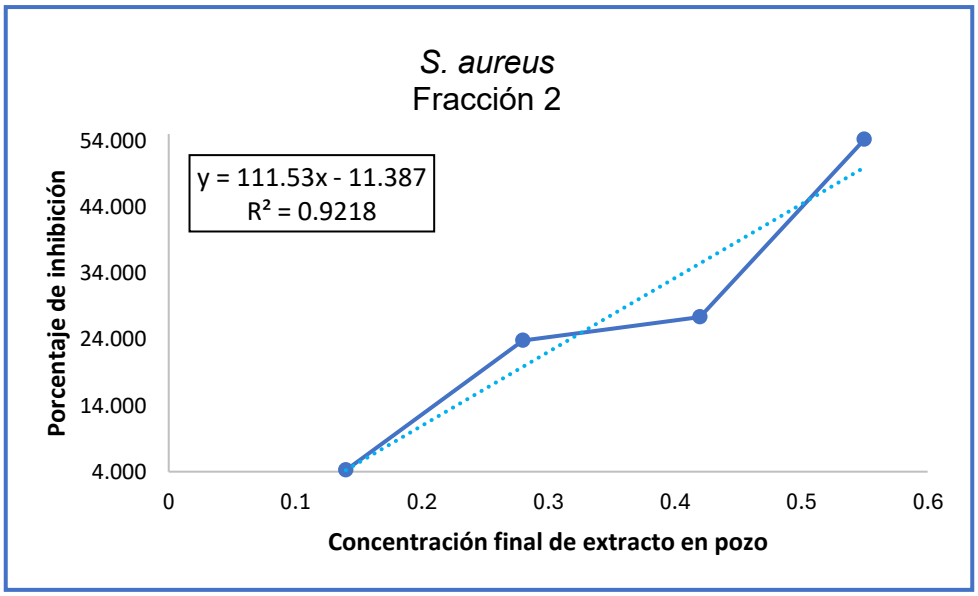


Figura 41. Resultado de dosis respuesta con fracción 2 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

La relación concentración–respuesta evidencia un incremento progresivo del porcentaje de inhibición de *S. aureus* conforme aumenta la concentración final del extracto en el pozo. El modelo lineal ajustado muestra un coeficiente de determinación elevado ($R^2 = 0.9218$), lo que indica que la mayor parte de la variabilidad en la inhibición puede explicarse por los cambios en la concentración. Esto sugiere un comportamiento dosis-dependiente claro, comparando con la **Figura 41** con la **32**. La pendiente positiva, indica una alta sensibilidad de la bacteria desde el primer incremento de fracción 2, lo que respalda la presencia de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana relevante. Aunque se aprecia una ligera desviación entre puntos experimentales y la recta de tendencia, el patrón general confirma que concentraciones superiores a 0.14 mg/mL generan la mayor actividad inhibitoria, alcanzando valores de 54% de inhibición. Con este resultado obtenido se puede extender el ensayo a hacer una curva con concentraciones más bajas de 0.14 mg/mL.

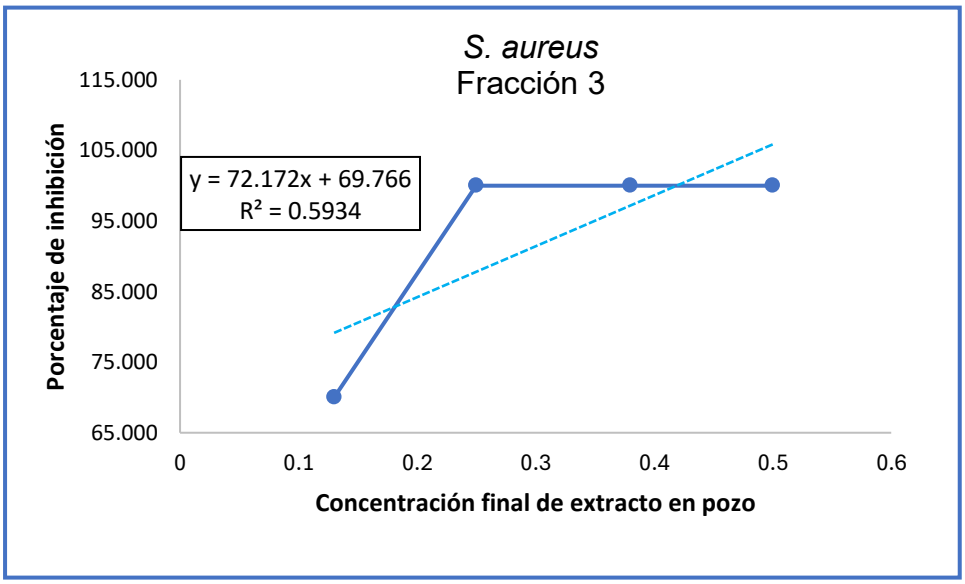


Figura 42. Resultado de dosis respuesta con fracción 3 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

La gráfica muestra un patrón de inhibición elevado de *S. aureus* incluso a concentraciones bajas de la fracción 3, con valores superiores al 65% desde 0.13 mg/mL, como se puede observar en la **Figura 33**. El incremento más marcado ocurre entre 0.15 y 0.25 mg/mL, donde la inhibición alcanza aproximadamente 100%. A partir de ese punto, la respuesta antibacteriana se estabiliza y no se observan aumentos adicionales relevantes al incrementar la concentración hasta 0.50 mg/mL, lo que sugiere que la actividad de la fracción alcanza un umbral de eficacia. El ajuste lineal presenta un R^2 moderado (0.5934), lo que indica que la relación concentración–respuesta no es estrictamente lineal, coherente con un efecto que se satura rápidamente. Con este resultado obtenido se puede extender el ensayo a hacer una curva con concentraciones más bajas de 0.13 mg/mL.

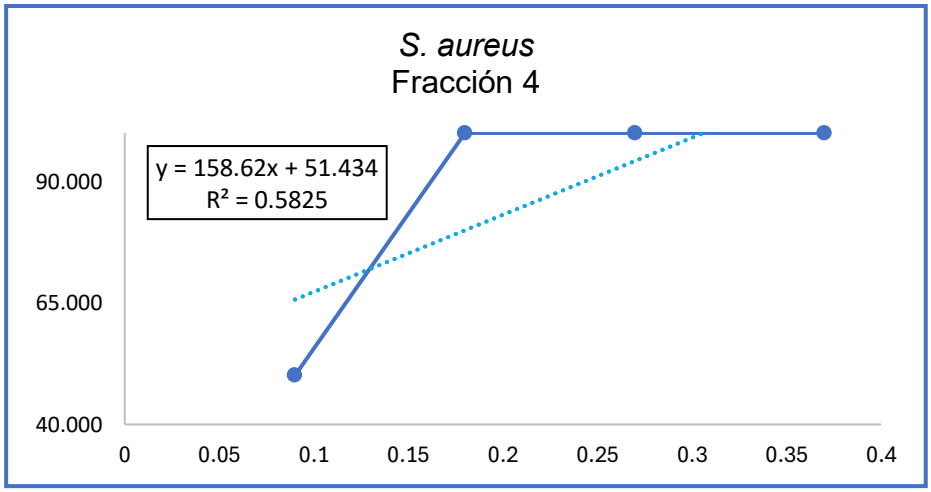


Figura 43. Resultado de dosis respuesta con fracción 4 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

La inhibición de *S. aureus* como se ve de igual forma en la **Figura 34**, inicia en un nivel intermedio alcanzando el 50% de inhibición con 0.09 mg/mL, pero presenta un incremento abrupto al aumentar la concentración a 0.18 mg/mL, donde prácticamente alcanza el máximo de actividad (100%). A partir de este punto, la curva se estabiliza, mostrando una meseta sostenida entre 0.18 y 0.35 mg/mL, lo que indica que el extracto alcanza su capacidad máxima de inhibición con cantidades relativamente bajas. El coeficiente de determinación $R^2 = 0.5825$ para la fracción 4, señala nuevamente que la relación concentración–respuesta no es estrictamente lineal, lo que es esperable en fracciones vegetales cuyos compuestos bioactivos generan un efecto rápido seguido de saturación. Con este resultado obtenido se puede extender el ensayo a hacer una curva con concentraciones más bajas de 0.09 mg/mL.

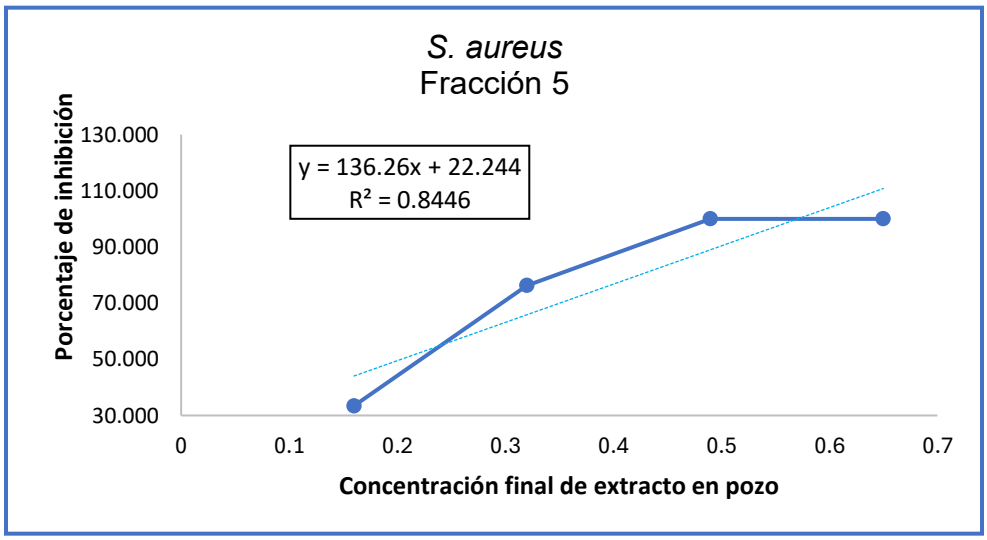


Figura 44. Resultado de dosis respuesta con fracción 5 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

La relación entre la concentración final de fracción y el porcentaje de inhibición para *S. aureus* muestra un comportamiento claramente dosis-respuesta, aunque con una ligera meseta en las concentraciones más altas. A medida que aumenta la concentración de fracción el porcentaje de inhibición llega al 100% con una concentración de 0.49 mg/mL lo que lleva a comparar con la **Figura 35** donde se observa inhibición desde la primer concentración, pero con un 33% de inhibición. Presenta una R^2= 0.8446, este valor se considera una correlación fuerte. Aunque la línea de tendencia es creciente entre 0.5 y 0.6 mg/mL existe ya una saturación de la fracción 5. Con este resultado obtenido se puede extender el ensayo a hacer una curva con concentraciones más bajas de 0.16mg/mL.

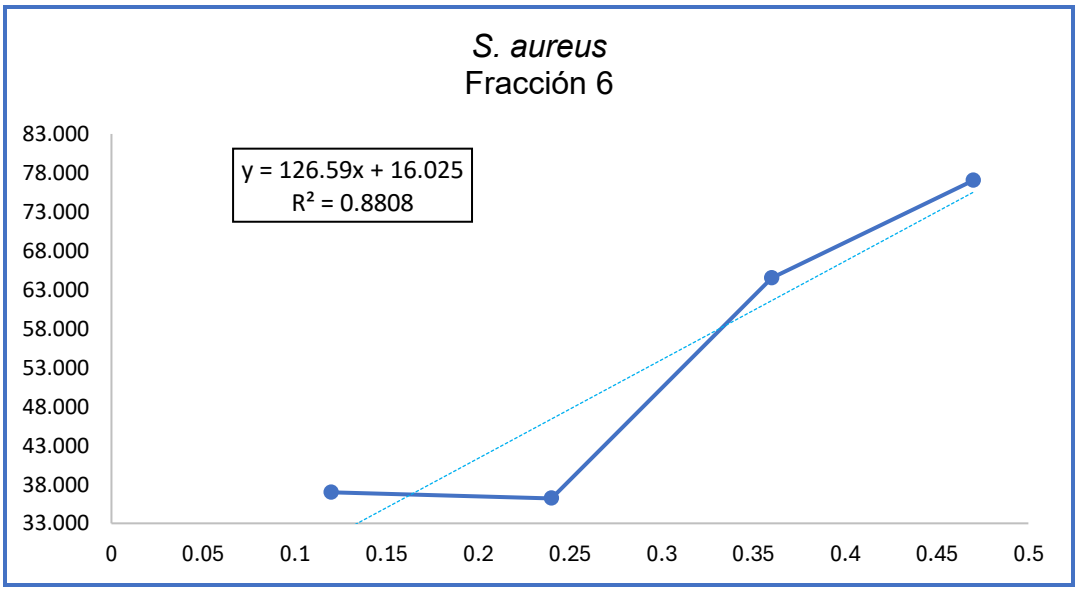


Figura 45. Resultado de dosis respuesta con fracción 6 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

Haciendo una correlación de la presente figura con la **Figura 36** con *S.aureus,* se puede observar que no hubo inhibición desde la concentración 0.12 mg/mL por lo tanto no hay porcentaje de inhibición. Se puede inferir respecto a la gráfica que, si extendemos la curva de respuesta de inhibición con mayor concentración de fracción 6, puede haber inhibición en algún punto de la curva. El ajuste lineal de $R^2 = 0.8808$, exhibe una correlación alta, lo que indica que factores adicionales podrían estar influyendo en la respuesta, tales como variabilidad inherente a los metabolitos presentes en la fracción o posibles interacciones entre compuestos. El incremento aparente del porcentaje de inhibición no implica actividad antibacteriana, la forma ascendente puede deberse únicamente a que el extracto, al estar más concentrado, interfiere más con la lectura. Esto genera una pendiente artificial, pero no tiene significado de muerte celular.

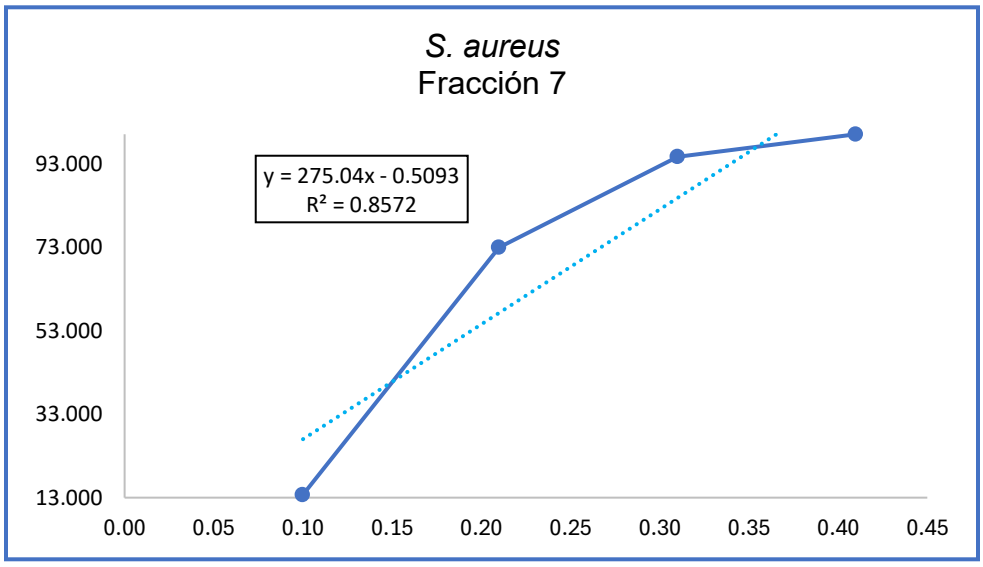


Figura 46. Resultado de dosis respuesta con fracción 7 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *S.aureus.*

La anterior figura demuestra el comportamiento de la fracción 7 que relacionando con la **Figura 37,** no hay inhibición desde el inicio de la curva por lo tanto tampoco existe porcentaje de inhibición, se puede inferir respecto al comportamiento de la línea de tendencia que si se aumenta la concentración de la fracción puede haber porcentaje de inhibición en algún punto. El incremento aparente del porcentaje de inhibición no implica actividad antibacteriana, la forma ascendente puede deberse únicamente a que el extracto, al estar más concentrado, interfiere más con la lectura. Esto genera una pendiente artificial, pero no tiene significado de muerte celular. El ajuste lineal de $R^2 = 0.8572$ es alto ajuste a la línea de tendencia.

Se muestran las **Figuras 47-53** de las fracciones resultantes de la columna 3 de la evaluación frente a *E.coli.*

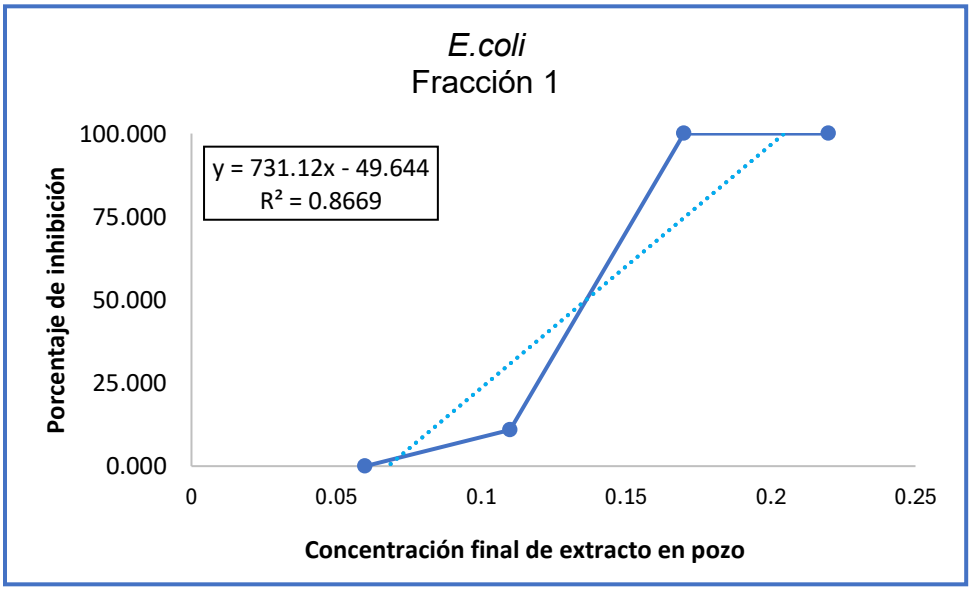


Figura 47. Resultado de dosis respuesta con fracción 1 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

En la figura anterior, se observa como en el salto de 0.11 mg/mL a la concentración 0.17 mg/mL inicia una meseta que relacionando con la **Figura 31,** es donde inicia la inhibición para *E.coli* con la fracción 1. Respecto al porcentaje de inhibición se satura al 100% desde el inicio de la meseta (0.17 mg/mL) por lo que se infiere que es la concentración ideal para lograr muerte celular. El modelo lineal presenta un coeficiente de determinación $R^2 = 0.8669$.

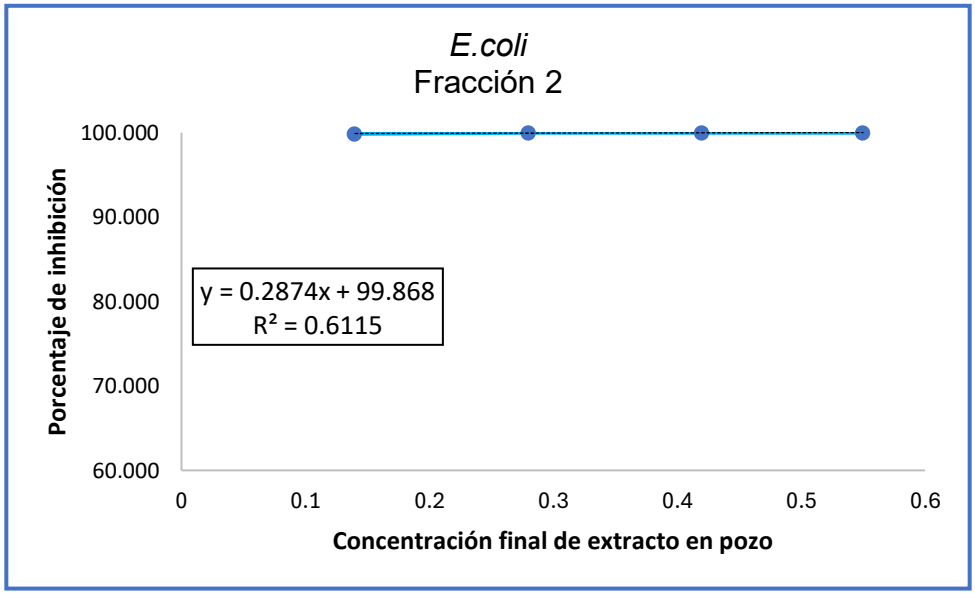


Figura 48. Resultado de dosis respuesta con fracción 2 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

La figura anterior, muestra que la fracción 2, presentó inhibición prácticamente total del crecimiento de *E. coli* en todas las concentraciones evaluadas. Los valores obtenidos se mantuvieron de forma constante alrededor de 100 por ciento, lo que indica que incluso la concentración más baja probada fue suficiente para ejercer un efecto inhibitorio máximo sobre la bacteria. Este comportamiento sugiere que la concentración mínima evaluada ya supera la MIC, de modo que el incremento posterior de la dosis no genera un efecto adicional medible. La ausencia de variación en la curva refleja una respuesta biológica saturada, característica de casos en los que la actividad antimicrobiana se encuentra en su límite superior desde el inicio del ensayo. En este contexto, el valor de la pendiente muy cercana a cero no representa un patrón dosis-respuesta, sino la estabilidad de la inhibición en niveles máximos. La correlación (R^2= 0.6115) moderada se explica principalmente por la poca dispersión entre puntos, no por un efecto real de la concentración. En conjunto la **Figura 32** y **48,** indica que el extracto posee una actividad antimicrobiana muy potente frente a *E. coli* en el rango de concentraciones probado, con un efecto inhibitorio completo desde la primera dosis.

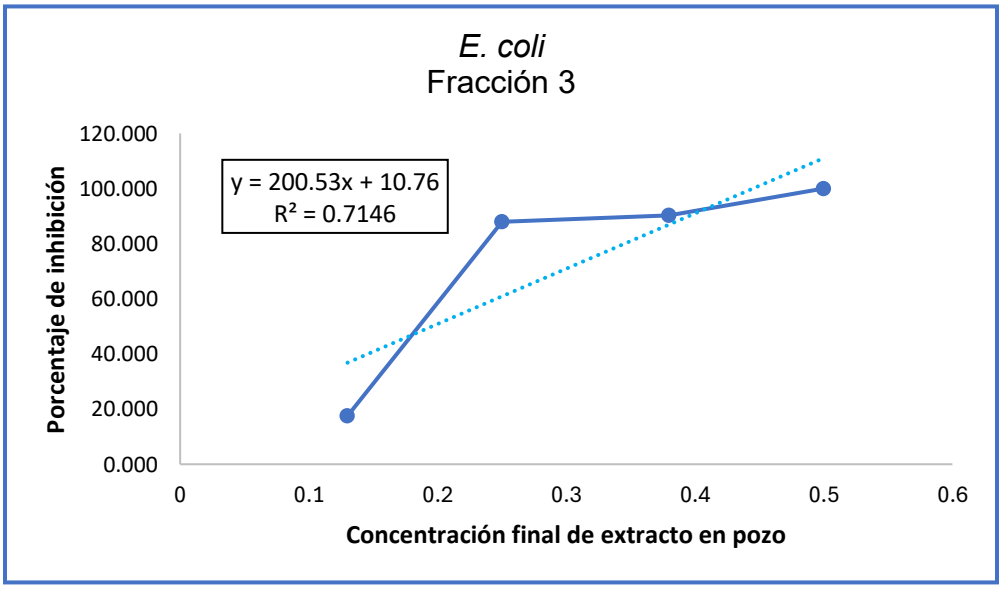


Figura 49. Resultado de dosis respuesta con fracción 3 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

La **Figura 49** correspondiente a *E. coli* evidencia un comportamiento claramente dosis-dependiente, en el cual la fracción 2 presenta actividad antimicrobiana desde la primera concentración evaluada y mantiene un incremento progresivo en la inhibición conforme aumenta la dosis. Este patrón sugiere que los compuestos presentes en el extracto actúan de manera efectiva sobre la bacteria, con una respuesta particularmente marcada entre 0.15 y 0.25 mg/mL, intervalo en el que se observa el ascenso más pronunciado de la curva. El coeficiente de determinación representa una correlación R^2= 0.7146 positiva moderada entre ambas variables. A concentraciones superiores (0.40 y 0.50 mg/mL), el porcentaje de inhibición continúa aumentando, pero con una pendiente menor, lo que podría indicar que la actividad del extracto comienza a aproximarse a un efecto máximo. En conjunto, la **Figura 49** y **33** demuestra que la fracción evaluada ejerce una inhibición significativa y progresiva sobre *E. coli*, con una respuesta dependiente de la concentración y con un efecto particularmente fuerte a partir de 0.25 mg/mL.

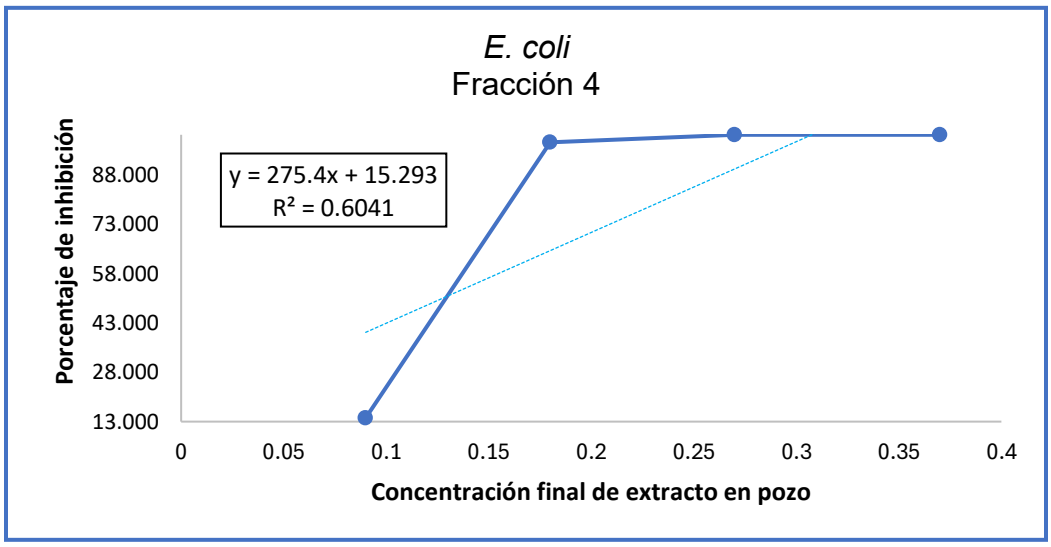


Figura 50. Resultado de dosis respuesta con fracción 4 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

La gráfica anterior, correspondiente a *E. coli* muestra un comportamiento claro de tipo dosis-respuesta, en la fracción 4 comienza a ejercer actividad antimicrobiana desde la primera concentración evaluada y alcanza niveles elevados de inhibición en un intervalo corto de incremento en la dosis. Este patrón es especialmente evidente entre 0.09 y 0.18 mg/mL. A partir de 0.18 mg/mL, la inhibición se estabiliza, situándose consistentemente por encima de 90%. Este comportamiento sugiere que la MIC, se encuentra dentro del rango de 0.09 a 0.20 mg/mL, ya que a partir de ese punto el incremento en la concentración no genera cambios significativos en la respuesta biológica. La presencia de una meseta en la curva es característica de un efecto máximo o cercano al máximo, donde los sitios de acción del extracto ya se encuentran saturados. El valor de R^2=0.6041 representa una correlación moderada entre la concentración de la fracción y la inhibición. Si bien no es un ajuste tan elevado como en otras figuras, es consistente con un fenómeno en el que la mayor parte de la variación ocurre en un único tramo crítico (0.09 a 0.20 mg/mL), seguido de una fase de estabilización que tiende a disminuir el ajuste lineal. En conjunto, la **Figura 32** y **50** evidencia que el extracto posee actividad antibacteriana significativa contra *E. coli*, con un efecto fuertemente dependiente de la concentración en el rango bajo y con una rápida transición hacia un efecto inhibitorio casi máximo.

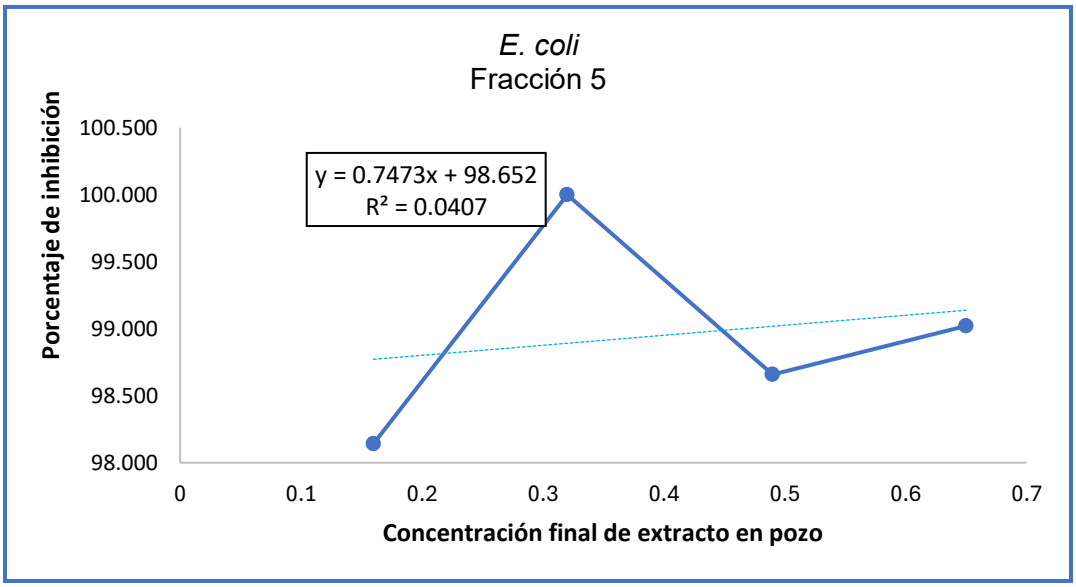


Figura 51. Resultado de dosis respuesta con fracción 5 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

La figura anterior, muestra que el extracto presentó inhibición casi total del crecimiento de *E. coli* desde la primera concentración evaluada. Los porcentajes de inhibición se mantuvieron consistentemente elevados, superiores a 98 por ciento, con un comportamiento relativamente estable a lo largo del rango de concentraciones. Este patrón indica que incluso la concentración más baja probada fue suficiente para ejercer un efecto inhibitorio muy marcado sobre la bacteria, lo que sugiere una alta potencia de la fracción 5 frente a *E. coli.* El valor de $R^2 = 0.0407$confirma que no existe una relación dosis-respuesta en este rango, pero esto no implica ausencia de actividad; por el contrario, indica que la inhibición fue tan alta y homogénea desde la primera concentración que la respuesta no depende del incremento adicional en la dosis.

Bajo este escenario, todas las concentraciones probadas se encuentran por encima del umbral necesario para detener el crecimiento bacteriano, y por ello la curva no muestra un incremento progresivo sino un efecto inhibitorio prácticamente completo desde el inicio, por lo que a futuro se podría realizar una curva mucho menor de concentraciones de 0.16 mg/mL.

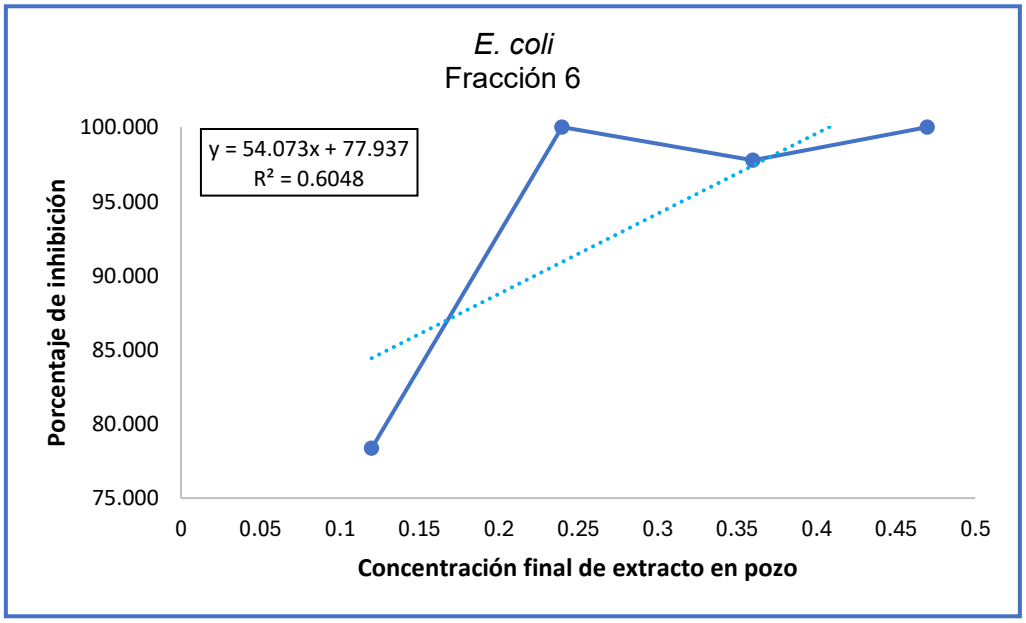


Figura 52. Resultado de dosis respuesta con fracción 6 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

La **Figura 52** muestra, la gráfica correspondiente a *E. coli* muestra que la fracción evaluada no ejerció una inhibición marcada en la primera concentración y un comportamiento cercano al máximo efecto biológico a partir de 0.36 mg/mL, en esta misma la inhibición registrada se aproxima al 100. Este aumento inicial es seguido por un ascenso abrupto hasta alcanzar prácticamente 100% de inhibición en 0.47 mg/mL, lo que sugiere que la MIC se ubica cerca de este intervalo. A partir de esta concentración, la curva muestra una fase de estabilización con valores que oscilan entre 97 y 100 por ciento para 0.36 y 0.47 mg/mL. Este patrón es consistente con un efecto inhibitorio máximo, donde la actividad biológica del extracto se encuentra saturada y un incremento adicional en la concentración no genera diferencias sustanciales en la respuesta. En este tipo de comportamiento, el extracto alcanza rápidamente su capacidad antimicrobiana plena contra la bacteria. El ajuste lineal presenta un R^2=0.6048, lo que indica una correlación moderada entre la concentración del extracto y el porcentaje de inhibición. La **Figura 36** confirma que la fracción 6 muestra una actividad antibacteriana notable contra *E. coli*, con una respuesta inicial dependiente de la concentración y una rápida transición hacia un efecto máximo.

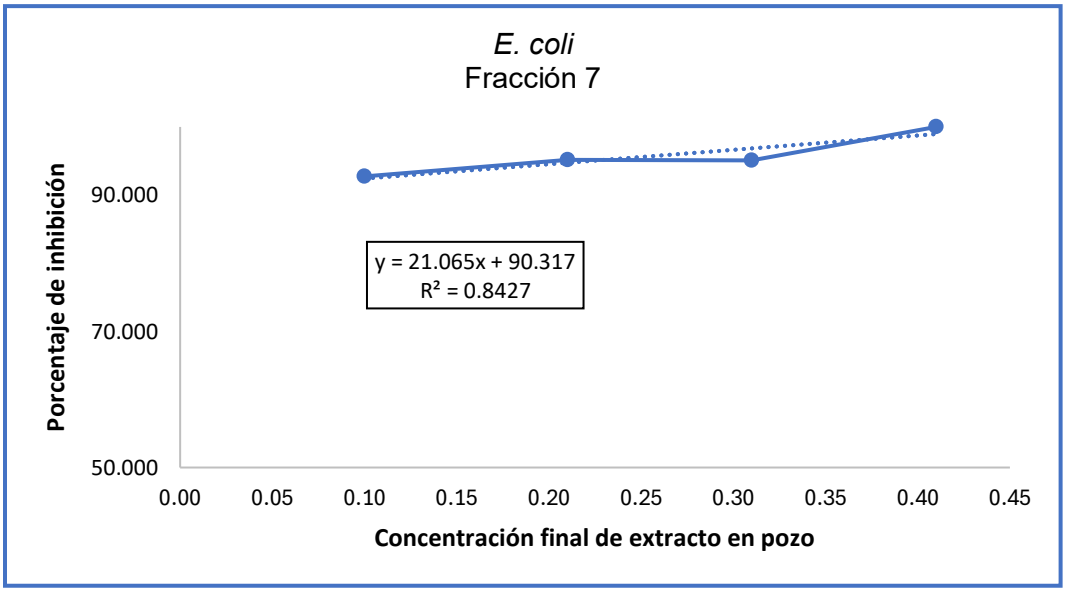


Figura 53. Resultado de dosis respuesta con fracción 7 de *R. strobilophora,* sobre porcentaje de inhibición de *E. coli.*

En la **Figura 53** correspondiente a *E. coli* se observa que el extracto produjo inhibición apenas apreciable en la **Figura 37** de la concentración 0.10 mg/mL. Los porcentajes de inhibición registrados se mantienen alrededor de 90%, con variaciones mínimas entre 0.10 y 0.40 mg/mL, lo que indica que la bacteria continuo inactiva de manera prácticamente lineal. La línea de tendencia (alta) presenta un R^2= 0.8427 . Por lo tanto, la gráfica confirma que la fracción 7 si ejerció efecto inhibitorio sobre *E. coli* dentro del rango de concentraciones evaluadas.

Tabla 15. En la siguiente tabla se concentran la IC_{50} de las bacterias descritas anteriormente

IC_{50} de las fracciones de la columna 3					
S. aureus	Fracción	IC_{50}	*E. coli*	Fracción	IC_{50}
	1	0.53		1	0.19
	2	0.35		2	-173.51
	3	-0.27		3	0.20
	4	-0.01		4	0.13
	5	0.20		5	-65.10
	6	0.27		6	-0.52
	7	0.18		7	-1.91

Los resultados concentrados en la **Tabla 16**, evidencian diferencias marcadas en la actividad antibacteriana de las fracciones evaluadas, tanto entre especies bacterianas como entre fracciones del extracto. En el caso de *S. aureus*, cuatro fracciones (2, 5, 6 y 7) mostraron valores de IC_{50} positivos y relativamente consistentes, ubicándose en un intervalo estrecho que oscila entre 0.18 y 0.35 mg/mL. Este comportamiento sugiere que la actividad inhibitoria frente a esta bacteria es atribuible a compuestos presentes en múltiples fracciones, lo que podría indicar la presencia de metabolitos con propiedades antimicrobianas distribuidos a lo largo del perfil cromatográfico. La fracción 7 destacó como la más activa frente a *S. aureus*, con un IC_{50} de 0.18 mg/mL, lo que la posiciona como candidata prioritaria para purificación e identificación de compuestos bioactivos.

En contraste, la actividad contra *E. coli* fue más variable y produjo IC_{50} positivos únicamente en tres fracciones (1, 3 y 4). Entre ellas, la fracción 4 presentó el valor más bajo (0.13 mg/mL), lo que sugiere que esta fracción posee mayor potencia inhibitoria específicamente sobre bacterias

Gram negativas. Esta diferencia en el comportamiento antibacteriano entre ambas especies puede relacionarse con las características estructurales propias de cada grupo bacteriano; las Gram negativas, como *E. coli*, poseen una membrana externa que dificulta la penetración de compuestos, por lo que resulta significativo que ciertas fracciones hayan mostrado actividad efectiva.

Un aspecto relevante es la presencia de valores negativos de IC_{50}, principalmente frente a *E. coli* (fracciones 2, 5, 6 y 7) y en menor medida frente a *S. aureus* (fracciones 3 y 4). Esto se puede deber, a la alta dispersión observada en los datos, constituye un elemento crítico en la interpretación de los valores de IC_{50} obtenidos. En estudios de inhibición bacteriana, la consistencia en las respuestas a diferentes concentraciones es indispensable para establecer patrones claros de comportamiento biológico. Sin embargo, la variabilidad marcada entre réplicas o entre puntos de concentración puede alterar significativamente la forma de la curva dosis respuesta. Esta dispersión puede deberse a múltiples factores metodológicos, como pequeñas variaciones en la preparación de muestras, diferencias en la densidad inicial del inóculo, interferencias con el medio de cultivo, concentración no homogénea del extracto, o sensibilidad del método instrumental utilizado. Desde un punto de vista estadístico, la dispersión amplia reduce la capacidad para detectar cambios progresivos en la inhibición y afecta directamente la precisión de cálculos paramétricos como el IC_{50}.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que el extracto etanólico contiene metabolitos con actividad antimicrobiana selectiva y refuerzan la viabilidad de continuar con el proceso de aislamiento, purificación y elucidación estructural.

8. CONCLUSIONES

- Referente al primer objetivo específico, se logró obtener el extracto etanólico de *Ramirezella strobilophora* proveniente del estado de Oaxaca, reportando por primera vez como se realiza el proceso de extracción etanólica con el presente trabajo, esto permitirá ahorrar tiempo y recursos en trabajos posteriores.
- Al separar las fracciones del extracto etanólico de *R. strobilophora* mediante cromatografía en capa fina (TLC), se comprobó que dichas fracciones presentan actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Este trabajo documenta por primera vez tanto el proceso de obtención de las fracciones como el desarrollo de los ensayos empleados para demostrar su actividad antimicrobiana, al igual que existe la presencia de flavonoides y fenoles en el extracto etanólico.
- Se logró separar los componentes del extracto etanólico de *R. strobilophora* en siete fracciones mediante cromatografía en columna y evaluar su actividad frente a *S. aureus* y *E. coli*. Los resultados muestran que cinco fracciones presentan actividad únicamente contra *S. aureus*, mientras que las siete fracciones exhiben actividad frente a *E. coli*. Esta serie de ensayos en microdilución en caldo con resazurina, constituye el primer reporte disponible sobre la actividad antimicrobiana de estas fracciones frente a las bacterias evaluadas.
- Gracias a los ensayos mencionados con las bacterias expuestas (*S. aureus* y *E. coli),* a dosis-respuesta, se plasma el primer antecedente de concentración minina inhibitoria, IC_{50} y porcentaje de inhibición reportadas con el extracto etanólico de *R. strobilophora.*
- En cuanto al objetivo general de la presente investigación, la evaluación del potencial antimicrobiano del extracto etanólico de *R. strobilophora* sobre cepas de colección de *S. aureus y E. coli* adquiere relevancia considerando su capacidad para generar resistencia antimicrobiana y la persistencia de cepas asociadas a infecciones nosocomiales. Los resultados sugieren que los compuestos presentes en el extracto, principalmente flavonoides y flavonas, podrían explorarse como

alternativas complementarias o precursores para el desarrollo de agentes antimicrobianos derivados de productos naturales.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar evaluación Fitoquímica mediante cromatografía de gases acoplada a masas, de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna.

- Purificar las fracciones obtenidas para su posterior evaluación para determinar otras funciones biológicas

- Evaluar las fracciones obtenidas por medio de resonancia magnética nuclear.

- Desarrollar un modelo matemático para obtener IC_{50} predecibles con ayuda de este.

- Poner a prueba el extracto etanólico de *R. strobilophora* frente a otras bacterias tanto gram negativas como gram positivas.

- Llevar a prueba antimicrobiana con *S. aureus* y *E. coli* con otros modelos biológicos como ratas o ratones.

- Evaluar la formulación de un producto farmacológico que ataque el crecimiento y/o presencia de *S. aureus* y *E. coli* en el cuerpo humano.

10. BIBLIOGRAFÍA

A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. (2015). *Medicinal y Aromatic Plants*, *04*(03). https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196.

Acosta-Quiroz, J., Verástegui-Gaona, C., Iglesias-Osores, S., Moreno-Mantilla, M. C., *y* Failoc-Rojas, V. E. (2019). Efecto inhibitorio, *in vitro* del extracto etanólico de *Plantago Major* "Llantén" frente a cepas de *staphylococcus aureus* y *streptococcus* betahemolíticos. *Med Natur*, *13*(2), 7–11.

Arroniz, J. V., Rosado, D. E. P., Córdoba, P. Z., García, E. M. G., Muñoz, C. A. V., y Hernández, J. L. S. (2023). Conocimiento y uso de plantas medicinales en Calpan, Puebla, México: Percepción de varios sectores sociales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *22*(5), 676–688.

Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., Meza-López, C., Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., y Meza-López, C. (s. f.). *Composición química y FTIR de extractos etanólicos de Larrea tridentata, Origanum vulgare, Artemisa ludoviciana y Ruta graveolens*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextypid=S1405-31952018000300309.

Barri, I. A. (2024). Desarrollo de nuevos glicósidos como potenciales agentes antitumorales para el tratamiento del cáncer de mama. En *Encuentro de Becaries de Grado y Posgrado de la UNLP (EBEC) (La Plata, 20 de noviembre de 2024)*.

Betrán, A., Lavilla, M. J., Cebollada, R., Calderón, J. M., y Torres, L. (2020). Resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias nosocomiales y adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Huesca 2016–2018. *Revista Clínica de Medicina de Familia*, *13*(3), 198–202.

Bitwell, C., Sen Indra, S., Luke, C., y Kakoma, K. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, *19*, e01585. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585.

Cárdenas Chumo, C. A., y Espinoza Gallegos, M. D. (2024). *Revisión sistemática de métodos de extracción y técnicas de tamizaje fitoquímico para cinco metabolitos secundarios de especies vegetales* (Tesis de licenciatura).

Casanova-Pérez, C., Delgado-Caballero, C. E., Cruz-Bautista, P., y Casanova-Pérez, L. (2022). Plantas medicinales usadas por los Tének en la Huasteca, México. *CienciaUAT*, 40–58. https://doi.org/10.29059/cienciauat.v16i2.157.

Clínica Universidad de Navarra. (2025). *Antimicrobiano: qué es y definición médica*. Diccionario Médico. https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/antimicrobiano#:~:text=Antimicrobiano%20es%20el%20t%C3%A9rmino%20utilizado,%2C%20virus%2C%20hongos%20y%20par%C3%A1sitos.

Conabio. (s. f.-b). *Choreque (Ramirezella strobilophora)*. EncicloVida. https://enciclovida.mx/especies/188532-ramirezella-strobilophora.

CONABIO. (2025). *Sistema Nacional de Información sobre Biodiversidad (SNIB): Registros de ejemplares* (versión 2024-12). México. http://www.snib.mx/ejemplares/docs/CONABIO-SNIB-Version202412.pdf.

Cushnie, T. P. T., y Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents, 38*(2), 99–107. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014

Da Silva, G. M., de Sousa, M. L. R., Rocha, W. C., y de Freitas, A. D. G. (2021). Estudo químico e antimicrobiano dos extratos de sementes e folhas do cumaru, *Dipteryx odorata* (Fabaceae). *Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, *25*(1), 34–38.

Dai, J., y Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, *15*(10), 7313–7352. https://doi.org/10.3390/molecules15107313.

Delgado salinas, A., y Ochotorena Booth, H. (2009). Contribuciones a la taxonomía de *Ramirezella* (Leguminosae, Papilionoideae). *Anales Del Instituto De Biología Serie Botánica*, *65*(001). https://revistas.unam.mx/index.php/bot/article/view/1861.

Delgado-Salinas, A., y Gama-López, S. (2015). *El género Ramirezella (Leguminosae: Phaseolinae)*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Delgado-Salinas, A., Gama-López, S., Martínez-Meyer, E., y JA, A. *Informe final del Proyecto JE014 El Género Phaseolus (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) para México.*

Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM). (2019, 24 de noviembre). *Ramirezella strobilophora* (Robinson) Rose, ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En *Portal de Datos Abiertos UNAM* (en línea). Universidad Nacional Autónoma de México. http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1397455. (Consultado el 13/11/2025).

De Prensa y Colaboradores, O. (2021, 17 mayo). Taninos: ¿antinutrientes o moléculas con potencial benéfico? *Centro de Investigación En Alimentación y Desarrollo (CIAD)*. https://www.ciad.mx/taninos-antinutrientes-o-moleculas-con-potencial-benefico/.

De Biología Unam, I. (s. f.). *IBUNAM - Instituto de Biología, UNAM*. Instituto de Biología, UNAM. https://www.ib.unam.mx/ib/colecciones-biologicas/herbario-nacional/.

Díaz Trujillo, F. J. (2022). *Diphysa americana* (Mill.) M. Sousa (Fabaceae): Árbol mesoamericano con potencial antimicrobiano.

Elizabeth, B. H. L., José, C. O. M., y Andrea, C. G. P. (2023). Analizar los atributos nutricionales de las hojas de la planta matico (*Piper aduncum*) y aceptabilidad sensorial de la infusión.

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S. *et al*. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*, *38*, 1015–1019. https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2.

Encyclopaedia Britannica. (2025, 8 de octubre). *Chromatography*. Encyclopaedia Britannica. https://www.britannica.com/science/chromatography.

Farmacopea de los Estados Unidos de América. (2022). *General Chapter, $\langle$565$\rangle$ Extractos Botánicos*. USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos de América.

Fernández-Rebaza, G., Balladares, A., Soto-Tantaraico, E., Zeña-Chiara, E., Salazar-Salvatierra, M., y Bonilla-Rivera, P. (2024). Caracterización de flavonoides y actividad antimicrobiana del extracto metanólico de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray. *Anales de la Facultad de Medicina*, 85(4), 398–406. https://doi.org/10.15381/anales.v85i4.27473

Flores, A. U., y Franco, A. V. (2021). Plantas medicinales empleadas en comunidades del Estado de Guerrero (México). *Revista de Salud Pública*, *23*(4), 1–8. https://doi.org/10.15446/rsap.v23n4.93234.

Galván Gutiérrez, R. A. (2019). *Aislamiento de inhibidores de la ureasa presentes en un extracto metanólico de raíz de cholla (Cylindropuntia cholla) por cromatografía en columna.*

Heredia, M. A. S., Granja, C. D. A., y Franco, J. G. V. (2020). Definición de la utilidad del método de Arrhenius en el estudio de estabilidad térmica de compuestos fenólicos en *Urera laciniata* Goudot ex Wedd. *FIGEMPA Investigación y Desarrollo*, *1*(1), 40–46. https://doi.org/10.29166/revfig.v1i1.1892.

Hernández Guiance, S. N., Marino, L., Isern, D. M., Coria, I. D., y Irurzun, I. M. (2019). Flavonoides: aplicaciones medicinales e industriales. *Invenio*, *22.*

Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, *34*, 33–41.

Ishimine, R. G., Vega, J. R., y Loza, M. G. L. (2021). Plantas medicinales antivirales: Una revisión enfocada en el COVID-19. Dialnet. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7747849.

Jaramillo-Ordoñez, C. E. (2020). Actividad antifúngica y antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Usnea laevis* frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Medica Herediana*, *31*(3), 169–174.

Juárez, J. C. F., y Velázquez, L. Á. P. OBTENCIÓN DE METABOLITOS DE PASIFLORA MEDIANTE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN. *Salud y educación ante los retos derivados de la pandemia covid-19*, 5.

Kumar, N., y Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, *24*, e00370. https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370.

MARLEN, F. V. A. (2023). *Actividad antimicrobiana de Hybosema ehrenbergii Harms.(Fabaceae)* (Tesis doctoral, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO).

Monagas, M., Brendler, T., Brinckmann, J., Dentali, S., Gafner, S., Giancaspro, G., Johnson, H., Kababick, J., Ma, C., Oketch-Rabah, H., Pais, P., Sarma, N., y Marles, R. (2022). Understanding plant to extract ratios in botanical extracts. *Frontiers In Pharmacology*, *13*, 981978. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.981978.

Mosquera, D. M., Cardona, J. E., Gutiérrez, R. H., y Hernández, M. S. (2012). Obtención de aceites vegetales provenientes de especies Amazónicas mediante la técnica de extracción asistida por microondas (EAM). *Vitae*, *19*(1), S57–S59.

Mueller, M., y Tainter, C. R. (2023, 13 julio). *Escherichia coli Infection*. StatPearls - NCBI Bookshelf. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/.

Njoku, DI, Guo, Q., Dai, W., Chen, JL, Mao, G., Sun, Q., ... y Peng, YK (2023). Aplicaciones multipropósito de la resazurina en técnicas microanalíticas: tendencias en ensayos microbiológicos, de catálisis y de detección de moléculas individuales. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *167*, 117288.

Ordoñez, E., López, A., y Reátegui, D. (2020). Infusions of medicinal plants: Antioxidant activity and total phenols. *Agroindustrial Science*, *10*(3), 259–266. https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2020.03.06.

Organización Mundial de la Salud y Servicio Catalán de la Salud (Catsalut). (2003/2010) [41].

Ortega-Cala, L. L., Monroy-Ortiz, C., Monroy-Martínez, R., Colín-Bahena, H., Flores-Franco, G., Luna-Cavazos, M., y Monroy-Ortiz, R. (2019). Plantas medicinales utilizadas para enfermedades del sistema digestivo en Tetela del Volcán, Estado de Morelos, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, *18*(2), 106–129.

Pasachova Garzón, J., Ramírez Martínez, S., y Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, *17*(32), 25–38.

Pelotto, J. P. (1997). Four Flavone Glucosides from *Ramirezella strobilophora* var. pubescens (Phaseolinae, Fabaceae. *Biochemical systematics and ecology.*

Pérez Zamora, C. M. (2019). *Desarrollo, caracterización y evaluación de formas farmacéuticas de uso en piel y mucosas que vehiculicen extractos vegetales con actividad antimicrobiana.*

Petiti, J., Revel, L., y Divieto, C. (2024). Standard Operating Procedure to Optimize Resazurin-Based Viability Assays. *Biosensors*, *14*(4), 156. https://doi.org/10.3390/bios14040156.

Ramírez-Velázquez, F. A., Almenares-López, D., Ramírez-Velázquez, F. A., y Almenares-López, D. (s. f.). Hiperglucemia en ayuno, medicamentos y plantas medicinales en un laboratorio clínico de Oaxaca, México. https://doi.org/10.19136/hs.a22n1.5030.

Reimers, E. A. L., Robledo, C. O. H., Rangel, P. P., y Aldaco, O. S. (2023). Estudio de plantas medicinales utilizadas en San José Iturbide, Guanajuato, México. *Polibotánica*, (56). https://doi.org/10.18387/polibotanica.56.14.

Rodríguez-García, C., Sánchez-Quesada, C., Toledo, E., Delgado-Rodríguez, M., y Gaforio, J. J. (2019). Alimentos naturalmente ricos en lignanos: ¿una herramienta dietética para la promoción de la salud? *Moléculas*, *24*(5), 917. https://doi.org/10.3390/molecules24050917.

Santos, P. G. (2024, 16 febrero). *Compuestos orgánicos volátiles COV, ¿Qué son y cómo monitorizarlos?* Envira. https://envira.es/por-que-importante-monitorizar-vocs-compuestos-organicos-volatiles/.

Segarra, S. M. T., y Cárdenas, K. E. P. (2021). *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina en alimentos. *Revista Vive*, *4*(12), 457–469. https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.106.

Shiriki, D., Ubwa, S. T., Ubwa, S. T., Yusufu, M. I., y Shambe, T. (2019). Extraction Methods and Inhibition Studies of Ten Plant Extracts on Nine Yam Rot Pathogenic Microorganisms. *Food And Nutrition Sciences*, *10*(04), 439–458. https://doi.org/10.4236/fns.2019.104033.

Sierra Castrillo, J., Gómez-Rave, L. J., Muñoz, A. X., Ramírez-Hoyos, F., Patiño-Rojas, I., Zapata-Baron, S., ... y Bermúdez-Pirela, V. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de *Persea americana* (Aguacate) variedad Choquette sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli.*

Steinmann, V. W. (2021). Flora and vegetation of the Zicuirán-Infiernillo Biosphere Reserve, Michoacán, Mexico. *Botanical Sciences*, *99*(3), 661–707.

Taylor, T. A., y Unakal, C. G. (2023, 17 julio). *Staphylococcus aureus Infection*. StatPearls - NCBI Bookshelf. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/.

Teka, T., Zhang, L., Ge, X., Li, Y., Han, L., y Yan, X. (2022). Stilbenes: Source plants, chemistry, biosynthesis, pharmacology, application and problems related to their clinical Application-A comprehensive review. *Phytochemistry*, *197*, 113128. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113128.

Torres-Fajardo, R. A., y Higuera-Piedrahita, R. I. (2021). Actividad antihelmíntica *in vivo* de terpenos y aceites esenciales en pequeños rumiantes. *Revista MVZ Córdoba*, *26*(3), e2317.

Tumpa, NI, Rahman, MS y Manchur, MA (2024). Actividad antimicrobiana y estabilizadora de membranas de extractos vegetales contra bacterias y hongos patógenos. Bangladesh Journal of Microbiology , 40 (2), 76–85. https://doi.org/10.3329/bjm.v40i2.73797.

Vallejo-Rosero, Y. J., Barrios-Correa, L., y Anaya-Gil, J. (2021). La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica. *Revista de química*, *35*(2), 19–25.

Velázquez-Vázquez, G., Pérez-Armendáriz, B., Ortega-Martínez, L. D., y Nelly-Juárez, Z. (2019). Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, *18*(3), 265–276.

View of Effect of phenolic acids on the antioxidant system of tomato plants (*Solanum lycopersicum* Mill.). (s. f.). https://archivo.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/45101/47802.

Villagómez, D. G. D., Ramírez, R. E. H., Cruz, D. C., y Gómez, C. V. (2023). Análisis fitoquímico: Una visión integral de los métodos de extracción de productos naturales. *Naturaleza y Tecnología*, *10*(1).

Vista de Metabolitos secundarios de las plantas (angioespermas) y algunos usos interesantes. (s. f.). https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/prepa1/article/view/5122/6591.

Wagner, H., y Bladt, S. (1996). *Análisis de fármacos vegetales: un atlas de cromatografía en capa fina*. Berlín, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Wieczorek, P. P., Witkowska, D., Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Oterman, M., y Zielińska, K. (2015). Bioactive Alkaloids of Hallucinogenic Mushrooms. En *Studies in natural products chemistry* (pp. 133–168). https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63462-7.00005-1.

World Health Organization: WHO. (2017, 27 febrero). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *Organización Mundial de la Salud*. https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed.

World Health Organization: WHO. (2018, 7 febrero). *E. coli*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli.

World Health Organization: WHO. (2023, 21 noviembre). *Resistencia a los antimicrobianos*. https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance.