

ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y CITOTÓXICA *in vitro* DE ACEITES VEGETALES
DE SEMILLAS DE FRUTAS TROPICALES Y ANDINAS.

ORFA ALEXANDRA ESPAÑA JOJOA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO

2021

ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y CITOTOXICA *in vitro* DE ACEITES VEGETALES
DE SEMILLAS DE FRUTAS TROPICALES Y ANDINAS

PRESENTADO POR:

ORFA ALEXANDRA ESPAÑA JOJOA

ASESORES:

SANDRA JAQUELINE MENA HUERTAS PhD.

ANDRES HURTADO BENAVIDES PhD.

JURADOS:

NEYLA BENITEZ CAMPO PhD.

CAROLINA MANOSALVA PhD.

OSCAR ARANGO BEDOYA PhD.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2021

NOTA DE RESPONSABILIDAD

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son responsabilidades
exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable
Consejo Superior de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

Sandra Jaqueline Mena Huertas, PhD
Firma del asesor de trabajo de grado

Andrés M. Hurtado Benavides, PhD
Firma del asesor de trabajo de grado

Neyla Benítez Campo, PhD
Firma del jurado

Carolina Manosalva, PhD
Firma del jurado

Oscar Arango Bedoya, PhD
Firma del jurado

Dedicatoria

Al finalizar este proyecto de crecimiento personal e intelectual, dedico el presente trabajo a Dios, por darme la fortaleza y estar a mi lado en cada una de las personas que me apoyaron.

A mi esposo y a mis hijas, por su comprensión y motivación diaria.

A mi nieto, por ser una bendición y la alegría de cada día, aún en los momentos más difíciles.

A mis padres y hermanos, por sus oraciones y por creer siempre en mí.

Con cariño:

ORFA ALEXANDRA ESPAÑA JOJOA

Agradecimientos

Agradezco al Fondo de Capacitación Docentes Hora Cátedra de la Universidad de Nariño, por financiar mis estudios en la Maestría en Ciencias Biológicas.

A la Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI), por la financiación del presente proyecto.

A la Industria de Productos Agroindustriales de Nariño (INPADENA), por el suministro de la materia prima (semillas de frutas).

A la Clínica Profesionales de la Salud PROINSALUD S.A.S., por el suministro de las cepas de origen infeccioso.

A la Dra. Jaqueline Mena Huertas, por brindarme sus conocimientos en arduas jornadas de trabajo y sobre todo por sus consejos y motivación en momentos difíciles.

Al Dr. Andrés Hurtado Benavides, por compartirme sus conocimientos y la disponibilidad en las asesorías.

A los evaluadores de este trabajo: Dra. Neyla Benítez, Dra. Carolina Manosalva y Dr. Oscar Arango, por sus valiosos aportes a este estudio.

A los docentes del Departamento de Biología en especial a los coordinadores de la Maestría en Ciencias Biológicas, gracias por su dedicación.

A los estudiantes de pregrado y egresados: Soany, Andrés, Andrea, Natalia, Nelly Paola, Mayra, Luis Ignacio por su colaboración en la realización de actividades de laboratorio.

A mis compañeros (as) de estudio mil gracias, por su apoyo y palabras de motivación constante.

RESUMEN

El incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales es un conflicto que agobia a toda la humanidad, por esta razón, investigadores de diferentes ciencias afines de la salud, entre ellos el Grupo de Investigación de Salud Pública de la Universidad de Nariño, buscan entre la biodiversidad de los vegetales una sustancia con potencial acción bactericida y bajo riesgo de citotoxicidad para el ser humano. Aceites de Semillas (AV) de frutas cultivadas en el departamento de Nariño: *Annona muricata* (guanábana), *Carica papaya* (papaya), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Psidium guajava* (guayaba), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Solanum betaceum* (tomate de árbol), *Solanum quitoense* (lulo) y *Mangifera indica* (mango), fueron extraídos por medio de tecnología de Fluidos Supercrítico (FSC) por el Grupo de Tecnologías Emergentes de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño, con el ánimo de explorar su potencial biológico. En este contexto y en un esfuerzo conjunto de los grupos de investigación, se planteó la necesidad de determinar *in vitro* la capacidad antibacteriana de los AV de las frutas previamente mencionadas frente a tres cepas bacterianas Gram negativas: *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), y dos cepas Gram positivas: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), para ser potencialmente utilizados en la industria alimenticia, cosmética y farmacológica.

La acción bactericida se determinó utilizando la técnica de difusión con sensidiscos en placa de agar, y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) utilizando microdiluciones en caldo y placas de microELISA. Los aceites de semilla se analizaron en concentraciones de 900, 750, 500 y 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$ frente a cada cepa certificada y sobre cepas resistentes a diferentes antibióticos, las cuales fueron donadas por la Clínica Profesionales de la Salud PROINSALUD S.A.S.

Para descartar efectos citotóxicos de los AV se realizaron diferentes pruebas en células sanguíneas, para ello inicialmente se determinó el efecto sobre viabilidad linfocitaria durante tres horas. En eritrocitos se determinó la inhibición de la hemólisis inducida por peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y también se realizaron pruebas de verificación de generación de alteraciones morfológicas producidas por los aceites de semillas sobre eritrocitos.

El AV de *P. guajava* presentó actividad antibacteriana sobre las cinco cepas bacterianas, los AV de *R. glaucus*, *A. muricata*, *P. edulis* y *S. betaceum* sobre cuatro cepas, el AV de *S. quitoense* sobre tres, el AV de *C. papaya* sobre dos cepas y el AV de *M. indica* sobre una cepa bacteriana. La CMI determinada osciló entre 500 y 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) entre 700 y 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$, indicando que se requiere una alta concentración de los AV para inhibir o eliminar el crecimiento bacteriano respectivamente.

Ninguna de las concentraciones de los AV evaluados evidenció citotoxicidad sobre linfocitos, ya que en todos los cultivos se observó un porcentaje de viabilidad superior al 90% durante 3 horas de estudio. Se evidenció actividad antihemolítica en todos los aceites oscilando entre 40,09% y 65,94% frente al control positivo. La única alteración morfológica observada en eritrocitos tratados con los AV fue la formación de equinocitos, en un porcentaje inferior al 4%.

Los AV de semillas de *P. guajava*, *R. glaucus*, *A. Muricata*, *P. edulis* y *S. betaceum*, *S. quitoense*, *C. papaya* y *M. indica* presentan actividad bactericida diferencial sobre cepas ATCC de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*. No presentan actividad citotóxica sobre linfocitos, inhiben la hemólisis de hematíes y no inducen la equinocitosis.

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de las propiedades biológicas de estos AV dando un valor agregado a las semillas de desecho, motivando así su empleo potencial en la industria alimenticia o cosmetológica. Sin embargo, se establece que no podrían

ser utilizados en la industria farmacológica para controlar infecciones bacterianas debido a que se requiere una elevada concentración para inhibir este tipo de afecciones.

Palabras clave: Aceites vegetales, cepas bacterianas, resistencia, citotoxicidad, actividad antihemolítica.

ABSTRACT

The increase in bacterial resistance to conventional antibiotics is an issue that concerns humanity; therefore, different researchers from health-related sciences including the Public Health Research Group of the Nariño University, are looking for a substance among the biodiversity of plants with a potential bactericidal action and low risk of cytotoxicity in humans. Seed Oils (SO) from fruits grown in the department of Nariño such as *Annona muricata* (soursop), *Carica papaya* (papaya), *Passiflora edulis* (passion fruit), *Psidium guajava* (guayaba), *Rubus glaucus* (Castilla blackberry), *Solanum betaceum* (tomate de árbol), *Solanum quitoense* (lulo) and *Mangifera indica* (mango) were extracted using the Supercritical Fluid (SCF) technology by Agroindustrial Engineering Group of Emerging Technologies of the Nariño University with the aim of exploring its biological potential. In this context with a joint effort of the research groups, it was determined the *in vitro* antibacterial capacity of the SO of the previously mentioned fruits against three Gram negative bacterial strains: *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), and two Gram positive strains: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), to be potentially used in the food, cosmetic and pharmacological industry.

The bactericidal action was determined using the diffusion technique with sensidisks on an agar plate and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) using broth microdilutions and microELISA plates. The seed oils were analyzed at concentrations of 900, 750, 500 and 250 μL / mL against each certified strain and on strains resistant to different antibiotics, which were donated by the Health Professionals Clinic PROINSALUD S.A.S.

To rule out cytotoxic effects of the SO, different tests were performed on blood cells, for which the effect on lymphocyte viability was initially analyzed for three hours. In the

erythrocytes were determined the inhibition of hemolysis induced by Hydrogen peroxide (H₂O₂) and also tests were carried out to verify the generation of morphological alterations produced by the seeds oils on erythrocytes.

The SO of *P. guajava* showed antibacterial activity on five bacterial strains, the SO of *R. glaucus*, *A. muricata*, *P. edulis* and *S. betaceum* on four strains, the SO of *S. quitoense* on three strains, the SO of *C papaya* on two strains and the SO of *M. indica* on one bacterial strain. The range of the MIC was between 500 and 900 μ L / mL and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) between 700 and 900 μ L / mL, indicating that a high concentration of SO is required to inhibit or eliminate bacterial growth, respectively.

None of the concentrations of the SO evaluated showed cytotoxicity on lymphocytes since in all crops a percentage of viability greater than 90% was observed during the 3 hours of the study. Antihemolytic activity was evidenced in all oils, ranging between 40.09% and 65.94% compared to the positive control. The only morphological alteration observed in erythrocytes treated with SO was echinocyte formation, in a percentage lower than 4%.

The SO of *P. guajava*, *R. glaucus*, *A. Muricata*, *P. edulis* and *S. betaceum*, *S. quitoense*, *C. papaya* and *M. indica* show differential bactericidal activity on ATCC strains of *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *E. faecalis*. They do not present cytotoxic activity on lymphocytes, they inhibit hemolysis of red blood cells and they do not induce echinocytosis.

The results of this work contribute to the knowledge of the biological properties of these SO, giving an added value to the waste seeds, thus motivating their potential use in the food or cosmetic industry. However, it is established that they could not be used in the pharmacological

industry to control bacterial infections because a high concentration is required to inhibit these types of conditions.

Keywords: seed oils, bacterial strains, resistance, cytotoxicity, anti-hemolytic activity.

Tabla de Contenido

1. Introducción	20
2. Justificación	26
3. Aporte de la investigación al desarrollo de la ciencia	30
4. Marco teórico	31
4.1. Enfermedades infecciosas y su tratamiento	31
4.1.1. Bacterias Gram negativas	32
4.1.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
4.1.1.2. <i>Escherichia coli</i>	33
4.1.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
4.1.2. Bacterias Gram positivas	34
4.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
4.1.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	36
4.2. Aceites vegetales	36
4.3. Extracción de aceites vegetales por Fluido Supercríticos (FSC)	38
4.4. Potencial inhibitorio de los aceites vegetales de semillas	39
4.4.1. <i>Annona muricata</i> L. (Guanábana)	40
4.4.2. <i>Psidium guajava</i> L (Guayaba)	40
4.4.3. <i>Solanum quitoense</i> (Lulo)	41
4.4.4. <i>Mangifera indica</i> (Mango)	42
4.4.5. <i>Passiflora edulis</i> (Maracuyá)	43
4.4.6. <i>Rubus glaucus</i> (Mora de Castilla)	43
4.4.7. <i>Carica papaya</i> (Papaya)	44

4.4.8. <i>Solanum betaceum</i> (Tomate de árbol).....	45
4.5. Citotoxicidad	45
4.6. Métodos de determinación antibacteriana	46
4.6.1. Método de difusión en agar con sensidiscos	46
4.6.2. Método de difusión en agar perforado.....	46
4.6.3. Método microdilución en caldo	47
5. Objetivos	49
5.1. General	49
5.2. Específicos.....	49
6. Metodología	51
6.1. Obtención de aceites vegetales de semillas	51
6.1.1. Recolección y adecuación de semillas	51
6.1.2. Molienda y análisis granulométrico.....	53
6.1.2.1. Molienda.....	53
6.1.2.2. Análisis granulométrico	53
6.1.3. Extracción de aceites de semillas por FSC	55
6.1.4. Caracterización de los aceites de semillas	57
6.1.4.1. Composición de Esteroles y tocoferoles	57
6.1.4.2. Composición de Ácidos grasos	57
6.2. Determinación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de los AV de semillas	58
6.2.1. Bacterias analizadas	58
6.2.2. Difusión en agar con sensidiscos	59
6.2.3. Difusión en agar perforado	61

6.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	62
6.2.5. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)	65
6.3. Determinación <i>in vitro</i> de citotoxicidad sobre células sanguíneas humanas	66
6.3.1. Obtención de células sanguíneas	66
6.3.1.1. Preparación de la suspensión de linfocitos	66
6.3.1.2. Preparación de suspensión de eritrocitos	68
6.3.2. Determinación de actividad citotóxica sobre linfocitos	68
6.3.3. Determinación de actividad hemolítica	69
6.3.4. Determinación de alteraciones morfológicas eritrocitarias	71
6.4. Diseño estadístico	73
6.4.1. Actividad antibacteriana	73
6.4.2. Citotoxicidad, inhibición hemolítica y alteraciones morfológicas	73
6.4.3. Identificación de las variables	74
6.4.3.1. Variables dependientes	74
6.4.3.2. Variables independientes	74
6.5. Consideraciones éticas	75
7. Resultados y discusión	76
7.1 Adecuación y caracterización de semillas	76
7.2. Rendimiento de aceites extraídos por FSC	77
7.3. Caracterización de los AV de semillas	78
7.3.1. Esteroles y tocoferoles	78
7.3.2. Ácidos grasos	81
7.4. Determinación de la actividad antibacteriana de los AV de semillas de frutas	83

7.4.1. Prueba de difusión con sensidiscos en placa de Petri	82
7.4.2. Efecto de los AV sobre bacterias de origen clínico.....	91
7.4.3. Determinación de la CMI.....	92
7.4.4. Determinación de la CMB	94
7.4.5. Determinación de la Concentración efectiva 50 (CE50).....	98
7.5. Evaluación de la actividad citotóxica de los AV de semillas de frutas.....	102
7.5.1. Viabilidad de linfocitos humanos.....	102
7.5.2. Inhibición hemolítica	108
7.5.3. Alteración morfológica eritrocitaria	110
8. Conclusiones	114
9. Recomendaciones	115
10. Presentación de resultados en congresos.....	116
11. Bibliografía	117
12. Anexos	144
12.1. Prueba confirmatoria de <i>E. coli</i> vs AV de semillas.....	144
12.2 Prueba confirmatoria de <i>K. pneumoniae</i> vs AV de semillas.....	145
12.3. Prueba confirmatoria de <i>P. aeruginosa</i> vs AV de semillas	146
12.4. Prueba confirmatoria de <i>S. aureus</i> vs AV de semillas	147
12.5. Prueba confirmatoria de <i>E. faecalis</i> vs AV de semillas.....	148
12.6. Aval comité de ética de la Universidad de Nariño.....	149
12.7. Carta de aceptación de la Clínica PROINSALUD S.A.S.....	151
12.8. Protocolo de manejo de material biológico.....	152
12.9. Consentimiento informado.....	155

12.10. Financiación del proyecto	157
12.11. Constancias de participación en Congresos	159
12.12. Artículo sometido para publicación.....	162

Listado de Tablas

Tabla 1 <i>Apertura de poro de tamices</i>	54
Tabla 2 <i>Condiciones de extracción con FSC de AV</i>	566
Tabla 3 <i>Controles de calidad y microdiluciones de aceites de semillas</i>	6464
Tabla 4 <i>Concentración de AV en cultivo de Linfocitos</i>	699
Tabla 5 <i>Ensayo para determinar la inhibición hemolítica</i>	7070
Tabla 6 <i>Ensayo para valorar morfología eritrocitaria</i>	7272
Tabla 7 <i>Condiciones de las semillas de frutas secas</i>	766
Tabla 8 <i>Rendimiento de aceite de semillas de frutas</i>	788
Tabla 9 <i>Esteroles y Tocoferoles de aceites de semillas de frutas</i>	799
Tabla 10 <i>Ácidos grasos de aceites de semillas de frutas</i>	82
Tabla 11 <i>Concentración Mínima Inhibitoria de los AV de semillas de frutas</i>	933
Tabla 12 <i>Concentración Mínima Bactericida de AV de semillas de frutas</i>	955
Tabla 13 <i>Respuesta bacteriana frente a los AV de semillas de frutas</i>	100

Listado de Figuras

Figura 1 <i>Diagrama del proceso de extracción con fluidos supercríticos</i>	38
Figura 2 <i>Semillas secas de ocho frutas cultivadas en el departamento de Nariño</i>	52
Figura 3 <i>Molienda de semillas de frutas</i>	53
Figura 4 <i>Tamizado de semillas para análisis granulométrico</i>	54
Figura 5 <i>Extracción de aceite de semillas de frutas</i>	55
Figura 6 <i>Procedimiento in vitro de la actividad antibacteriana en placa de Petri</i>	61
Figura 7 <i>Disposición de controles y diluciones en placa de microElisa</i>	63
Figura 8 <i>Procedimiento determinación de CMI y CMB</i>	65
Figura 9 <i>Procedimiento determinación actividad anti-hemolítica</i>	71
Figura 10 <i>Procedimiento determinación alteraciones morfológicas</i>	73
Figura 11 <i>Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre E. coli</i>	84
Figura 12 <i>Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre K. pneumoniae</i>	86
Figura 13 <i>Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre P. aeruginosa</i>	87
Figura 14 <i>Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre S. aureus</i>	88
Figura 15 <i>Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre E. faecalis</i>	89
Figura 16 <i>Determinación in vitro de la CMI de AV de semillas de frutas y MTT</i>	94
Figura 17 <i>Concentración efectiva 50 (CE50) por regresión lineal</i>	99
Figura 18 <i>Porcentaje de viabilidad de linfocitos vs AV de semillas de frutas</i>	103
Figura 19 <i>Citotoxicidad de AV sobre linfocitos humanos</i>	104

Figura 20 <i>Viabilidad de linfocitos humanos incubados 1h con AV de semillas</i>	105
Figura 21 <i>Viabilidad de linfocitos humanos incubados 2h con AV de semillas</i>	106
Figura 22 <i>Viabilidad de linfocitos humanos incubados 3h con AV de semillas</i>	107
Figura 23 <i>Porcentaje de inhibición de hemolisis por AV de semillas de frutas</i>	109
Figura 24 <i>Porcentaje de equinocitos en presencia de aceites de semillas de frutas</i>	110
Figura 25 <i>Anormalidades morfológicas eritrocitarias</i>	112

1. Introducción

El departamento de Nariño gracias a su posición geográfica presenta diversidad de pisos térmicos y climas, lo que le permite producir gran variedad de cultivos, entre ellos las frutas, utilizadas en la elaboración de jugos, mermeladas, dulces, almibares, jaleas y bocadillos entre otros. Este uso genera una considerable cantidad de residuos como cascaras y semillas, las cuales normalmente son eliminadas en el relleno sanitario y en ocasiones utilizadas como abono orgánico.

El tratamiento de enfermedades infecciosas con fármacos a base de plantas se ha incrementado en los últimos años, debido a que tanto su costo como la ocurrencia de efectos colaterales son menores en comparación con los antibióticos convencionales; estos, al ser obtenidos de algunos hongos y bacterias contienen moléculas que de alguna manera podrían ser fácilmente reconocidas por las bacterias, probabilidad que disminuye con los extractos y otros productos obtenidos de plantas (Shrestha y Dhillion 2003). Gran parte de la bioprospección se ha centrado en la búsqueda de compuestos con actividad biológica, utilizando la información etnobotánica para la selección de plantas con algún uso farmacológico (Bermúdez, Oliveira-Miranda, y Velázquez 2005).

La resistencia a los antimicrobianos hace referencia a la condición del microorganismo de sobrevivir cuando es expuesto a la acción de una sustancia antibiótica debido por lo general a adaptaciones genéticas y en otros casos al uso inapropiado de los antibióticos (OMS 2017a). A nivel mundial es un problema generalizado que conlleva a complicaciones de la salud, sobrecostos debido a las estadías prolongadas y cambio de tratamiento farmacológico, ausentismo laboral e incluso la muerte del paciente (OMS 2017a).

Según la European Centre for Disease Prevention and Control (EARS-Net 2016), en la Unión Europea (EU/EEA) el fenotipo de *Klebsiella pneumoniae*, aumentó la resistencia a las

carbapenemasas y una acción de resistencia individual y combinada a fluoroquinolonas, cefalosporinas y aminoglucósidos de tercera generación; *Escherichia coli* aumentó su resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y a la acción combinada de cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos de tercera generación y observaron un descenso en la ocurrencia del *Staphylococcus aureus* meticilinoresistentes (*SARM*). Sin embargo, su seguimiento continúa siendo prioritario. Un agravante a esta situación y que dificulta la identificación fenotípica y el tratamiento, es la frecuente resistencia que puede presentar una cepa bacteriana frente a una misma familia de antibióticos (Alós 2014). En un servicio de urgencias de España, se reportó que la cepa de *E. coli* ST448 phylogroup B1 causante de sepsis urinaria con evolución fatal, presentó la coexistencia de los genes blaKPC-3, blaVIM-1, blaSHV-12, blaOXA-9, blaTEM-1a y blaCMY-2- β -lactamasa y además era productora de carbapenemasa (Porres-Osante et al. 2014). La prevalencia de la resistencia presentada por las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se han convertido en uno de los principales desafíos para el tratamiento antibiótico tradicional, en gran parte debido a la actual pandemia de enzimas CTX-M (principalmente la CTX-M15) y aunque la mayoría de los estudios se han centrado en pacientes hospitalizados, hoy en día debido a la colonización intestinal se encuentran en la comunidad portadores asintomáticos de bacterias entéricas productoras de BLEE; se calcula que en el mundo existen 1.753 millones de personas colonizadas (Woerther et al. 2013).

En Colombia en el periodo comprendido entre los años 2012 a 2016 las tres Enterobacterias aisladas de UCI y fuera de esta con mayor prevalencia versus resistencia fueron *K. pneumoniae* (762 / 711), *Enterobacter cloacae* (239/ 225) y *Escherichia coli* (138/84); la carbapenemasa más frecuente fue KPC (*K. pneumoniae* carbapenemasa) (Ovalle y Saavedra 2016). A nivel de las bacterias Gram negativas no fermentadoras, la de mayor prevalencia fue *Pseudomonas aeruginosa* con 1528

aislamientos (1462 resistentes), la carbapenemasa más prevalente fue VIM (Verona integron-encoded metallo beta lactamase). Por otra parte, en las bacterias Gram positivas de 3462 aislamientos de *Staphylococcus aureus* el 31,6% presentaron resistencia a la oxacilina y *Enterococcus faecium* de 308 aislamientos el 68,2% mostraron resistencia frente a ampicilina (Ovalle y Saavedra 2016). En este sentido, debido a su alta frecuencia de aislamiento como agentes causantes de infecciones de vías urinarias, gastrointestinales, vías respiratorias y heridas quirúrgicas, entre otras, las bacterias *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis* y por presentar algún mecanismo de resistencia a antibióticos tradicionales han sido seleccionadas para la realización del presente trabajo de investigación.

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud en los países en desarrollo, varias se han utilizado ancestralmente en diferentes culturas para tratar diversas enfermedades (Bermúdez, Oliveira-Miranda, y Velázquez 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza rutinariamente la medicina tradicional, para satisfacer sus necesidades de atención básica de salud y que gran parte de los tratamientos caseros implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Bermúdez, Oliveira-Miranda, y Velázquez 2005).

El tratamiento de enfermedades infecciosas con fármacos a base de plantas se ha incrementado en los últimos años, debido a que tanto su costo como la ocurrencia de efectos colaterales son menores en comparación con los antibióticos obtenidos de hongos y de algunas bacterias, contienen moléculas que de alguna manera podrían ser fácilmente reconocidas, probabilidad que se disminuye con los extractos y otros productos obtenidos de plantas (Shrestha y Dhillion 2003). Gran parte de la bioprospección se ha centrado en la búsqueda de compuestos con actividad biológica, utilizando la información etnobotánica para la selección de plantas con algún uso farmacológico (Bermúdez,

Oliveira-Miranda, y Velázquez 2005)(Bermúdez, Oliveira-Miranda, y Velázquez 2005), cosmetológico (Aburjai y Natsheh 2003; Awad El-Gied, Abdelkareem, y Hamedelnieh 2015) y como protector de alimentos (Luna Guevara et al. 2015). De similar manera, es muy importante evaluar la citotoxicidad con el fin de identificar posibles efectos nocivos a nivel estructural y/o funcional contra las células humanas (Ávalos-Soto et al. 2014).

Los residuos de frutas como semillas y cáscaras representan un potencial para la industria de nuevos productos como los aceites vegetales (AV), los cuales al ser obtenidos por tecnología de fluidos supercríticos (FSC) son amigables con el medio ambiente y ofrecen un producto de uso alimenticio, químico, cosmetológico y de biocombustibles (Viganó, da Fonseca, y Martínez 2014). Se ha descrito la obtención de ácidos grasos como: ácido palmítico, oleico, esteárico, linoleico y linolénico, representativos en el uso en alimentos, farmacéutica y cosmetología a partir de las semillas de *Annona muricata* (guanábana), *Psidium guajava* (guayaba), *Solanum quitoense* (lulo), *Mangifera indica* (mango), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Carica papaya* (papaya) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol) (A. F. Cerón, Osorio M., y Hurtado B. 2012; D. Dorado, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa 2016); estos AV de semilla presentaron además capacidad antioxidante debido a su contenido de vitamina E y compuestos fenólicos (Nivia et al. 2007; D. Dorado, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa 2016; Pantoja Chamorro, Hurtado Benavides, y Martínez Correa 2017); es necesario avanzar en el estudio de su potencial actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, y verificar la capacidad citotóxica y mutagénica para utilizarlos en posibles aplicaciones farmacológicas o industriales.

Colombia es considerado uno de los 14 países megadiversos del mundo poseedor de una gran riqueza vegetal y cultural (Andrade C 2011). Gracias a su ubicación geográfica se dispone de gran variedad de frutales de excelente calidad organoléptica y alto contenido de sólidos solubles

(Asohofrucol 2009), características aprovechadas a nivel industrial para la producción de jugos, pulpas, mermeladas, conservas, confitería, colorantes, entre otros, generando una gran cantidad de residuos orgánicos entre ellos semillas y cascaras (Cerón et al., 2012; Pantoja-Chamorro et al., 2017).

El grupo de Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) de la Universidad de Nariño, interesado en dar valor agregado a los residuos de las semillas de ocho frutas cultivadas en Nariño: *Annona muricata* (guanábana), *Psidium guajava* (guayaba), *Solanum quitoense* (lulo), *Mangifera indica* (mango), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Carica papaya* (papaya) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol), extrajeron los aceites vegetales (AV) de estas semillas e identificaron la composición de ácidos grasos saponificables e insaponificables (Cerón, Hurtado, y Ayala 2016a; D. Dorado, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa 2016; Dorado y Hurtado-Benavides, Martínez-Correa 2016; Pantoja-Chamorro, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa 2017). Estos AV fueron obtenidos mediante la tecnología de fluidos supercríticos con CO₂ (FSC), metodología amigable con el medio ambiente y libre de residuos orgánicos, ofreciendo un producto con prometedora aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y en la industria alimentaria.

En este sentido, fue de interés unánime junto al grupo de Salud Pública de la Universidad de Nariño profundizar en el conocimiento del potencial bactericida y citotóxico *in vitro* de los aceites vegetales obtenidos de las semillas de estas frutas, seleccionadas por su alta producción en el departamento de Nariño, alta acogida en la cocina tradicional, buena producción de semillas y fácil segregación de estas (Hurtado-Benavides et al., 2016).

El objetivo de este estudio fue determinar *in vitro* el poder antibacteriano de los AV de semillas de ocho frutas andinas: *Annona muricata* (guanábana), *Psidium guajava* (guayaba), *Solanum quitoense*

(lulo), *Mangifera indica* (mango), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Carica papaya* (papaya) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol), frente a tres cepas bacterianas Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y dos cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); adicionalmente, teniendo en cuenta que iban a ser utilizados por seres humanos, se valoró la actividad citotóxica sobre eritrocitos y linfocitos.

Estos aceites podrían resultar en una alternativa farmacéutica, en cosmetología y en la industria alimenticia como protector de alimentos; de esta manera se busca conferir valor agregado a los residuos de frutas desechados y sin mayor utilidad en la actualidad, disminuyendo el impacto al medio ambiente. Por lo tanto, la pregunta de investigación propuesta es:

¿Cuál es el potencial citotóxico sobre eritrocitos y linfocitos humanos y la actividad antibacteriana *in vitro* sobre: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* de los aceites vegetales obtenidos de semillas de las frutas: *Annona muricata* (guanábana), *Psidium guajava* (guayaba), *Solanum quitoense* (lulo), *Mangifera indica* (mango), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Carica papaya* (papaya) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol)?

2. Justificación

La diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) y la creciente resistencia a las fluoroquinolonas, ceftriaxona y cefixima, complica mucho el diagnóstico y tratamiento de las infecciones (Alós 2014), incrementando la morbimortalidad, aumento de la permanencia hospitalaria y con ello el costo de atención y la posible diseminación del microorganismo intra y extra hospitalariamente (Oteo y Belén Aracil 2015). En España se busca priorizar la identificación de los genes BLEE del tipo CTX-M y SHV18, 19, TEM y disminuir el impacto epidemiológico (Oteo y Belén Aracil 2015). Las carbapenemasas aparecieron a finales del siglo XX y les ha tomado alrededor de una década en expandirse por todo el mundo (Oteo et al. 2014). Actualmente en España se ha registrado un aumento entre las EPC de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de OXA-48 o VIM-1, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* (Oteo et al. 2014). La multiresistencia bacteriana se ha convertido en un verdadero desafío para la medicina, tal es el caso de VIM-2 una de las MBL (metalo beta lactamasas) que fue identificada en dos de tres microorganismos: *Citrobacter freundii* y *Pseudomonas aeruginosa*, aislados de un paciente español internado en la unidad de cuidados intensivos (UCI) por hemorragia gastrointestinal secundaria que evoluciono a necrosis gástrica y sepsis grave causándole la muerte (Porres-Osante et al. 2014).

En las bacterias Gram positivas el panorama no es más alentador, en *Staphylococcus aureus* inicialmente se reportó la producción de la enzima penicilinasas y con ella la resistencia a la penicilina, más adelante se reportaron cepas meticilino-resistentes (SARM) y actualmente se han reportado cepas resistentes a los betalactámicos, todo esto debido a que el *S. aureus* es portador del gen *mecA* que confiere resistencia a múltiples fármacos (Nodarse Hernández y Abad 2013). SARM y *Enterococcus spp* multiresistentes son causante de infecciones nosocomiales representando un reto

para su control ya que se han descrito cepas de SARM resistentes a vancomicina y linezolid y se han descubierto nuevos clones (ST398), y variantes *mec* (*mecC*) de origen animal difíciles de identificar con técnicas moleculares para identificar el gen *mecA* (Canton y Ruiz-Garbajosa 2013). En Europa se han aislado cepas de *Enterococcus faecium* resistente al linezolid, a ampicilina (por β -lactamasas) y baja sensibilidad a daptomicina, por lo tanto el aislamiento, la identificación y control de estos microorganismos supone un incremento en las medidas epidemiológicas para disminuir la colonización y los brotes epidemiológicos (Canton y Ruiz-Garbajosa 2013).

Tradicionalmente se han utilizado plantas con fines medicinales. El conocimiento de su uso y aprovechamiento se transmiten desde los ancestros a las siguientes generaciones, y su aprovechamiento se ha mantenido debido entre otras razones a que se cultivan de manera fácil, son eficaces, bajo costo, los efectos secundarios casi nulos, su alta accesibilidad y por otra parte la creciente dificultad de acceso al sistema de salud moderno (Shrestha and Dhillion 2003). Son muchas las especies vegetales utilizadas alrededor del mundo como recursos medicinales, por lo tanto, se hace necesario identificar su potencial biológico, para validar científicamente su uso en la medicina (Salomé-Abarca et al. 2015). Las empresas farmacéuticas principalmente de Estados Unidos producen antibióticos de origen fúngico y bacteriano, sin embargo son muy pocos los bactericidas que se obtienen a partir de plantas (Ranjbar y Babaie 2016).

Determinar la citotoxicidad permite identificar *a priori* los posibles efectos nocivos contra las células, bien sea en su estructura o en el desarrollo normal de sus funciones (Ávalos-Soto et al. 2014), este parámetro no ha sido estudiado en los AV obtenidos de las semillas de los frutos de interés para este estudio; sin embargo, existen reportes sobre evaluación de la ausencia de citotoxicidad de extractos de corteza de guayaba y mango sobre eritrocitos (Durán, Montero, y Marrugo 2013), y otros trabajos en los que se utilizan tallos, hojas y pulpa de Anonáceas en los

cuales se reportó citotoxicidad sobre células cancerosas (Liu 2003; Lina Castro, Alzate, y Guerrero 2010; Solís Fuentes et al. 2010).

Gracias a la biodiversidad de Colombia podemos obtener bienes fundamentales tales como alimentos, combustibles, medicinas, vivienda, tejidos y servicios culturales relacionados con el desarrollo de la sociedad (Andrade C 2011). Por su topografía y ubicación geográfica se genera una amplia diversidad climática que ha permitido que Colombia presente un estimado de 62819 especies de las cuales 8803 especies son endémicas posicionando al país en el tercer lugar en endemismo (SIB Colombia 2018).

De manera particular el departamento de Nariño ubicado estratégicamente al sur occidente del país, presenta diversas regiones bioclimáticas entre la costa Pacífica, la sierra Andina y la región Amazónica; su actividad económica se basa en agricultura, ganadería, minería y pesca. La tecnificación es incipiente y se basa en conocimiento de técnicas tradicionales (Rangel, Lowy, y Aguilar 1997).

Diversas plantas se han utilizado ancestralmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas y sus procesos inflamatorios (Cogo et al. 2010). Las frutas son algunos de estos alimentos ya que tiene la capacidad de proporcionar nutrientes como vitaminas, minerales, carbohidratos y aceites vegetales y otros compuestos bioactivos responsables de su actividad antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, previenen las enfermedades cardiovasculares, diabetes y en general procesos degenerativos asociados a la edad avanzada (Wolfe, Wu, y Liu 2003). Pelegrini et al., (2008) identificaron la existencia de un péptido en las semillas de guayaba con actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram-negativas, Jiamboonsri y colaboradores (2011), evaluaron el potencial inhibitorio de extractos vegetales de semillas de mango sobre *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (SARM); Martini et al., (2009) reportaron actividad antibacteriana de

compuestos aislados de hoja de *Rubus ulmifolius* contra *H. pylori* cepa G21- CagA. Lam et al. (2009), demostraron actividad antifúngica de una nueva proteína de las semillas del maracuyá. Castro et al., (2010) reportaron actividad insecticida, larvicida, citotóxica y anticancerígena a partir del uso de tallos, hojas y pulpa de *A. cherimoli*; Sapaat et al., (2012) reportaron actividad helmíntica de extractos de semilla de papaya.

En la cosmetología los productos vegetales especialmente los aceites esenciales, son utilizados por su baja toxicidad, bajo costo-beneficio, abundante materia prima, aroma agradable y emoliencia (Aburjai y Natsheh 2003). Entre los usos que se han dado a los extractos vegetales están: para la piel (humectantes, antiinflamatorios, anti-ecemas, anti-acné, eliminación de radicales libres, antienvjecimiento y perfumería), en el cuidado del cabello (estimulantes del crecimiento, tinturas, anti-caspa, acondicionadores) (Aburjai y Natsheh 2003). En la industria alimenticia los ácidos grasos, además de ser un factor de importancia nutricional, pueden utilizarse para cubrir alimentos perecederos y prolongar su vida útil liberándolos de la acción de los microorganismos (Figueroa Martínez, Hurtado Benavides, y Ceballos Ortiz 2016).

El grupo de Tecnologías Emergentes de Agroindustria (TEA) de la Universidad de Nariño, interesados por dar un uso adicional a los desechos de frutas cultivadas en la región andina del departamento de Nariño, extrajeron y caracterizaron los compuestos de los aceites de semillas de *Annona muricata* (guanábana), *Psidium guajava* (guayaba), *Solanum quitoense* (lulo), *Mangifera indica* (mango), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Carica papaya* (papaya) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol) (Cerón, Osorio y Hurtado, 2012; Ceron, Hurtado y Ayala, 2016; Dorado Achicanoy, 2016; Pantoja-Chamorro, Hurtado-Benavides y Martínez-Correa 2017). Teniendo en cuenta trabajos de investigación previos realizados con extractos de *Rosmarinus officinalis* L. y *Ruta graveolens* L. sobre *Helicobacter pylori* (Mena-Huertas et al. 2016), estudios de

citotoxicidad, mutagenicidad y genotoxicidad realizados con extractos obtenidos de *Carica candamarcensi* (Mena-Huertas et al. 2011) y, determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de plantas frente a *Helicobacter pylori* (Huertas y Chamorro 2007). El grupo de investigación de Salud Pública con la finalidad de determinar el potencial biológico de estos extractos de semillas, consideró necesario realizar estudios *in vitro* con los aceites vegetales (AV) de las especies relacionadas previamente, con el fin de identificar actividad antibacteriana viable para ser utilizados en cosmetología, en el tratamiento y control de patologías de tipo infeccioso en seres humanos o bien para ser utilizados en la industria alimenticia como preservante o aditivo como recubrimiento o glaseado superficial de alimentos en pro de la disminución de la transpiración y la deshidratación mejorando la apariencia de los alimentos, adicionalmente para prevenir la contaminación causada por las bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, microorganismos de interés en salud pública; además se evaluó la citotoxicidad sobre células sanguíneas humanas, teniendo en cuenta que los AV podrían ser utilizado en seres humanos.

3. Aporte de la Investigación al Desarrollo de la Ciencia

El aporte del presente trabajo de investigación al desarrollo de las Ciencias Biológicas fue demostrar si alguno de los AV extraídos de las semillas de ocho frutas cultivadas en Nariño presentaba actividad antibacteriana y además que presente baja actividad citotóxica, información importante para que puedan ser utilizados en procesos farmacológicos, cosmetológicos o en la conservación de alimentos.

4. Marco Teórico

4.1. Enfermedades infecciosas y su tratamiento

En la actualidad el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas comunes es cada vez más complejo, conllevando al incremento de las complicaciones, discapacidad, sobre costos, prolongando las estadías en los hospitales y la mortalidad (OMS 2017b). La efectividad de los antimicrobianos está puesta a prueba, microorganismos que normalmente eran sensibles están desarrollando resistencia a los antibióticos tradicionales generando un problema de salud pública, intervenciones quirúrgicas como trasplantes, quimioterapias o cirugías menores se convertirían en procedimientos de alto riesgo (OMS 2017a). Las bacterias resistentes y multirresistentes se identifican actualmente como patógenos importantes tanto en los entornos nosocomiales como comunitarios (Cornaglia 2009). La resistencia antibacteriana está regulada por genes específicos de los mismos microorganismos y se incrementa debido a la presión ejercida por el uso indiscriminado de los antibióticos (Gómez 2015).

La exposición continua, la sub o sobredosificación y la medicación inadecuada de antibióticos han conllevado al desarrollo de cepas resistentes o multirresistentes que generan infecciones agudas que requieren de una detección temprana, desafortunadamente, los procedimientos tradicionales de identificación del microorganismo y el reporte del antibiograma, retrasa el inicio del tratamiento acertado. En la actualidad se dispone de métodos moleculares que permiten la diferenciación de cepas bacterianas productoras de mecanismos de resistencia (Oteo y Belén Aracil 2015). Entre las bacterias resistentes tenemos las Enterobacterias productoras de BLEE (betalactamasas de espectro extendido), los *Staphylococcus aureus* meticilinorresistentes (SAMR), la *Klebsiella Pneumoniae* productora de enzimas KPC (Carbapenemasas) (Gómez 2015) y en los *Enterococcus* la resistencia

adquirida a beta-lactámicos, la producción de betalactamasas, la resistencia a aminoglucósidos (RAN) y a los glucopeptidos (Cercenado 2011). Esto evidencia la necesidad de realizar estudios en busca de alternativas de tratamiento a las infecciones, con moléculas de un origen diferente a las empleadas en los antibióticos convencionales.

4.1.1. Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas son microorganismos agrupados en varias familias, caracterizados estructuralmente por presentar una capa fina de peptidoglicano cubierta externamente por una capa de Lipopolisacáridos razón por la cual se tiñen de color rojo o rosado mediante la técnica de Gram. Este grupo bacteriano está conformado por diferentes especies cuya clasificación se basa en su morfología, características genotípicas, tolerancia al oxígeno, pH y temperatura. Poseen diferentes factores de virulencia y patogenicidad que desencadenan la respuesta inmune (Mollinedo P. y Gonzáles V. 2014).

4.1.1.1. *Klebsiella pneumoniae*.

El género *Klebsiella* se caracteriza por ser bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, fermentan la glucosa con producción de gas, la mayoría: reducen nitratos a nitritos, son oxidasa negativa y catalasa positiva, inmóviles y presentan capsula. Habitan de manera inocua en el suelo, agua y vegetación y hacen parte de la microbiota intestinal de mamíferos incluido el hombre (Puerta-García y Mateos-Rodríguez 2010). Están asociadas a infecciones en tracto genital, urinario, respiratorio, septicemias, pero es fundamentalmente un oportunista. Los géneros más importantes son: *K. granulomatis*, *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae* (Lopardo y Predari 2016). *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* son considerados reportes del

Centro para el Control y Prevención de Enfermedades Infecciosas CDC, no se ha incrementado el porcentaje de cepas resistentes, pero continúan siendo un microorganismo de atención mundial. *K. pneumoniae* es el agente etiológico de neumonías, bacteriemias, meningitis, infecciones del tracto genitourinario, enteritis, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones de las vías hepatobiliares, peritonitis e infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Lopardo y Predari 2016).

4.1.1.2. *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una Enterobacteria, descrita en 1885 por Theodore von Escherich, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, presenta flagelos periticos y cápsula, pueden o no ser móviles. Son de metabolismo fermentativo y también pueden realizar respiración oxidativa. Habita normalmente en el intestino grueso de animales de sangre caliente incluido el hombre, es una bacteria ubicua. La mayoría de cepas son oportunistas y están asociadas a infecciones en personas inmunocomprometidas. Los factores de virulencia son los antígenos somáticos (O), flagelar (H) y capsular (K). Se han descrito 8 categorías distintas (patotipos o patovares) de las cuales 6 patotipos causan afecciones diarreicas: *E. coli* Enteropatógeno (EPEC), *E. coli* Enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* Enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* Enteroagregativo (EAEC), *E. coli* productor de Toxina Shiga (STEC) y *E. coli* de Adherencia Difusa (DAEC); y 2 patotipos de invasión extraintestinal (ExPEC): *E. coli* Uropatógeno (UPEC) y *E. coli* de la meningitis neonatal (NMEC). Los patotipos DEC son un grupo heterogéneo con diferentes factores de virulencia e interacción con la mucosa intestinal del hospedador, causantes de diferentes síndromes diarreicos y con distinta epidemiología (Lopardo y Predari 2016).

4.1.1.3. *Pseudomonas aeruginosa*.

Pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae* morfológicamente son bacilos ligeramente curvados Gram negativos, presentan flagelos polares monótrico o lofótricos, la superficie bacteriana puede presentar muchas fimbrias o pili y la mayoría de cepas producen una capsula exopolisacárida de alginato (Montero 2012). Son bacterias no fermentadoras, oxidasa positiva y pueden crecer bien a 42 °C; se encuentran de manera ubicua en suelo, agua, plantas, animales y contaminan implementos de uso médico como dispositivos intrauterinos, humidificadores, catéteres, válvulas convirtiéndose de esta manera en un potencial patógeno para el hombre, representan un problema a nivel de los nosocomios infectando a pacientes inmunocomprometidos especialmente personas con cáncer, quemaduras y con fibrosis quística (Gibb et al. 2002; Luján Roca 2014).

Las colonias de *P. aeruginosa* presentan un olor similar a las uvas, afrutado o dulzón y una coloración típica debido a los pigmentos fluorescentes que producen: pioverdina (amarillo-verdoso), piocianina (azulado) o piorrubina (rojizo) (Montero 2012). Entre los factores de virulencia que posee están: la capsula, adhesinas, fimbrias (*pili*), pigmentos difusibles, endotoxinas, exotoxinas A, S, T y producción de enzimas, biopelículas, los cuales contribuyen a que se asocie con infecciones en cualquier parte del cuerpo especialmente tracto respiratorio, tracto urinario, bacteriemia, piel y tejidos blandos, oído y cavidad ocular (Montero 2012).

4.1.2. Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas se caracterizan por que poseen una pared externa muy gruesa de peptidoglicano en la cual se evidencia la presencia de los ácidos teicoicos, externamente algunas especies pueden presentar una capa de proteínas. Con la tinción de Gram se tiñen de morado o azul intenso. Los diferentes grupos bacterianos se clasifican de acuerdo a la estructura, producción de enzimas, capsula, factores de virulencia, patogenicidad y requerimientos de oxígeno; por ejemplo, el

polisacárido C de la pared sirve para la serotipificación de los *Streptococcus*; la producción de capsula una estructura polisacaridica está relacionada con la virulencia, morfología colonial y factor de inhibición de la fagocitosis de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b (Quispe 2014).

4.1.2.1. *Staphylococcus aureus*.

Pertenecen a la familia *Staphylococaceae*, son bacterias Gram positivas con forma de cocos agrupados en pares, tétradas, cadenas cortas, racimos o simplemente como células individuales, tiene un diámetro de 0,5, a 1,5 μm . Carecen de movilidad, no producen endosporas ni cápsulas aunque algunas cepas producen capsula de limo, son anaerobias facultativas, fermentan la glucosa y producen la enzima catalasa (Cervantes-García, García-González, y Salazar-Schettino 2014). Hacen parte de la microbiota de piel y mucosas y habitualmente se lo aísla de nasofaringe (20-30%) y zonas húmedas de la piel a partir de las cuales puede infectar cualquier tejido. Los factores de virulencia son muy variados e incluyen: ácidos teicoicos (componentes de la pared celular), enzimas como: catalasa, coagulasa, estafiloquinasas, hialuronidasas, lipasas, fosfolipasa C, DNAsas, proteasas, fosfatasa; toxinas como: leucocidinas, hemolisinas (α, β, γ y δ), exfoliatinas, toxina del shock tóxico y enterotoxinas (Bennett, Dolin, y Blaser 2014). Crecen en medios de cultivo común ya que no son exigentes, las colonias son pequeñas, brillantes, elevadas, de bordes enteros, cremosos y pigmentados de dorado (debido a la producción de carotenoides); en agar sangre producen β hemolisis y para su identificación de otras especies se utilizan las pruebas de catalasa, coagulasa y crecimiento en agar Manitol salado ya que toleran elevadas concentraciones de NaCl (7,5%) (Cervantes-García, García-González, y Salazar-Schettino 2014).

4.1.2.2. *Enterococcus faecalis*.

Enterococcus son bacterias Gram positivas que se agrupan en pares o cadenas cortas, inicialmente se conocieron como *Streptococcus faecalis* hacen parte de la flora gastrointestinal de humanos y otros mamíferos y también en el tracto genitourinario y en la saliva (Pérez, Martínez, y Zhurbenko 2010). Pueden también ser encontrados en suelo, comida, agua, plantas, animales, pájaros e insectos (Ronconi y Merino 2003). Son considerados patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterocóccicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central (aunque son raras), intraabdominal y pélvica (Pérez, Martínez, y Zhurbenko 2010). Son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación y tratamiento térmico, entre otras), por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos congelados y desecados. Son responsables de infecciones clínicas, hospitalarias y comunitarias que incluyen la infección urinaria, la bacteriemia, la endocarditis, la diverticulitis y la meningitis (Ronconi y Merino 2003).

4.2. Aceites vegetales

La producción agrícola, el procesamiento y el consumo de productos vegetales conllevan a la eliminación de gran cantidad de desechos que corresponden aproximadamente a un tercio del total producido y en las frutas del 40 al 50% se pierde en las etapas posteriores al consumo (Viganó, da Fonseca, y Martinez 2014). Estos desechos se utilizan tradicionalmente como abono orgánico, alimento para animales o simplemente se eliminan en el relleno sanitario para su posterior descomposición (L. J. Cerón, Hurtado, y Ayala 2016b), generando gases (principalmente metano) que contribuyen al efecto invernadero (Viganó, da Fonseca, y Martinez 2014). Por ello es necesario

encontrar un uso adicional a dichos desperdicios y obtener subproductos de utilidad diversa: farmacéutica, cosmetológica y como conservantes alimenticios. El grupo de Tecnologías Emergentes de Agroindustria (TEA) de la Universidad de Nariño, extrajo aceites vegetales de las semillas de ocho especies frutales cultivadas en la región andina del departamento de Nariño, con el fin de dar una respuesta a las anteriores situaciones planteadas.

Los aceites vegetales (AV) son sustancias líquidas o semilíquidas obtenidas por diferentes métodos de extracción, compuestos por una fracción saponificable compuesta por triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres (palmítico, esteárico, oleico, palmitoleico, linoleico, linolénico) y por una fracción insaponificable compuesta de sustancias antioxidantes (vitamina E y compuestos fenólicos), esteroides, fosfolípidos, colorantes, y sustancias aromáticas (A. F. Cerón, Osorio M., y Hurtado B. 2012; Daniela J. Dorado, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa 2016; Pantoja Chamorro, Hurtado Benavides, y Martínez Correa 2017; Mojica, Ramírez-Rueda, y Espitia 2015).

La importancia de la composición de los ácidos grasos presentes en los AV de semilla radica en su potencial utilidad a nivel farmacéutico por ejemplo el ácido oleico, linolénico y linoleico, así como los compuestos minoritarios esteroides y tocoferoles se utilizan para la prevención de cáncer y problemas cardiovasculares (Cerón, Hurtado, y Ayala 2016a; Xiang et al. 2017).

En la industria cosmetológica los ácidos grasos esenciales se utilizan en la fabricación de productos para el cuidado de la piel como humectantes, antiinflamatorios, perfumes, cremas antiacné y antienvjecimiento prematuro. A nivel del cuero cabelludo se utilizan en la elaboración de tintes, acondicionadores y emulsiones que evitan la caspa y la caída del cabello (Aburjai y Natsheh 2003; Moruš et al. 2014).

En la industria alimenticia los ácidos grasos, además de ser un factor de importancia nutricional, estos aceites naturales no convencionales pueden utilizarse para cubrir alimentos

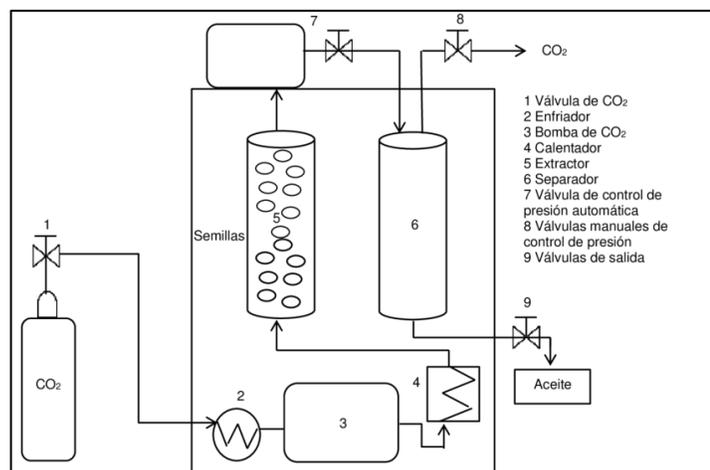
percederos y prolongar su vida útil (Luna Guevara et al. 2015; Hurtado-Benavides, Andrés M. Dorado et al. 2016).

4.3. Extracción de aceites vegetales por fluido supercríticos (FSC)

En la Figura 1, se representa el proceso de la tecnología de fluido supercrítico la cual consiste en un sistema de extracción que consta de una bomba de alta presión que incrementa la presión del fluido por encima de su presión crítica, una celda de extracción (muestra) la cual se calienta a una temperatura superior a la del punto crítico donde el CO₂ presurizado es llevado a una temperatura adecuada permitiendo su fluidez a través de la muestra hasta obtener un producto (Velasco, Villada, y Carrera 2007).

Figura 1

Diagrama de proceso de extracción con fluidos supercriticos EFS



Fuente: Pantoja-Chamorro, (2017) Diagrama de proceso de extracción con fluidos supercríticos.

[Figura]. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/1699/169950127005.pdf>

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión superiores a su punto crítico, en el cual no podrá licuarse aun cuando se aumente la presión y tampoco podrá vaporizarse aun cuando se incremente la temperatura, bajo estas condiciones la sustancia no es ni gas ni líquido,

logrando así difundirse a través de los sólidos como un gas, y disolver los materiales como un líquido, el fluido más utilizado para la extracción de FSC es el dióxido de carbono (CO₂) (Velasco, Villada, y Carrera 2007).

Las ventajas de utilizar esta tecnología reside en su carácter verde puesto que es amigable con el medio ambiente debido a que el CO₂ utilizado como solvente de extracción no es tóxico, es inodoro, incoloro y permite obtener extractos libres de disolventes orgánicos (Cerón et al., 2016; Hurtado-Benavides et al., 2016). Yeganegi et al., (2018) compararon extractos obtenidos de tallos de *Equisetum telmateia* por tres métodos: FSC con CO₂ (99,99% de pureza), maceración y fraccionamiento, concluyendo que, aunque con FSC el rendimiento fue menor, este presentó mayor actividad antibacteriana debido a la concentración del 21% de compuestos biológicamente activos, mientras que los extractos etanólicos contenían únicamente el 9%.

4.4. Potencial inhibitorio de aceites vegetales de semillas

Las plantas debido a su variada composición química poseen propiedades nutricionales, antiinflamatorias, antioxidantes, anticancerígenas, antihelmínticas, antifúngicas y antibacterianas, entre otros (Awad El-Gied, Abdelkareem, y Hamedelnieel 2015). La actividad antibacteriana sobre diferentes especies bacterianas ha sido reportada en diferentes trabajos realizados con AV de semilla de papaya, mango y guayaba (Jiamboonsri et al. 2011; Engels et al. 2009; Pelegrini et al. 2008; Nivia et al. 2007); y de igual manera se ha reportado actividad antifúngica con los AV de semillas de maracuyá (Lam y Ng 2009). El grupo de Tecnologías Emergentes de Agroindustria (TEA), reporta hasta el momento la composición química y la actividad antioxidante de los AV obtenidos de semillas de ocho especies frutales cultivadas en la región andina del departamento de Nariño y se

encuentra desarrollando investigaciones para determinar el potencial de actividad biológica de estos aceites (Cerón et al. 2012; Dorado et al. 2016; Pantoja Chamorro et al. 2017).

4.4.1. *Annona muricata* L. (Guanábana)

Es una planta frutícola originaria de Suramérica, perteneciente a la familia de las *Anonaceas*, se distribuye en la región Tropical y Subtropical, las especies más conocidas en nuestra región son: *A. muricata* (guanábana) y *A. cherimolia* (chirimoya) de promisoría importancia para el sector industrial alimenticio y de cosmetología. Tradicionalmente diferentes partes de la planta se han utilizados debido a sus propiedades antitumorales, antihelmíntica, antidiarreica, ayuda a contrarrestar problemas hepáticos, en el tratamiento de neuralgias, reumatismo, dolores articulares y como insecticida entre otras (Solís Fuentes et al. 2010). Los estudios realizados en estas anonáceas han demostrado por una parte que las semillas poseen acetogeninas que presentan actividad citotóxica, pesticida, antitumoral y antiparasitaria (Lina Castro, Alzate, y Guerrero 2010), y ciclopéptidos con actividad antitumoral, antifúngica y antiviral (Solís Fuentes et al. 2010). El valor de la fruta radica en su consumo en fresco y productos elaborados debido al sabor dulzón de la pulpa, sin embargo actualmente se está prestando atención a los residuos generados como cáscaras y semillas los cuales además de ser utilizados en elaboración de abonos orgánicos, se evalúan como potenciales compuestos bioactivos (Hurtado-Benavides, Andrés M. Dorado et al. 2016).

4.4.2. *Psidium guajava* L (Guayaba)

La guayaba pertenece a la familia Myrtaceae, es una fruta de cultivo y consumo mundial. El fruto de forma oval, presenta cascara amarillo pálido y la pulpa varía entre blanco a rosado, la pulpa incluye las semillas. Es una fruta muy apetecida debido a su potencial industrial, es utilizada para la

preparación de jugos, mermeladas, jaleas, bocadillos, dulces, como complemento alimenticio para bebés (Yam Tzec et al. 2010). Adicionalmente es utilizada como antiespasmódico y las infusiones de las hojas para tratar cólicos, tos, gingivitis, escorbuto, hemorragias uterinas, bronquitis, hipertensión arterial y algunas parasitosis intestinales; el uso medicinal ancestral de la guayaba es apoyado por numerosos estudios biomédicos sobre las propiedades de los extractos de hojas, Sin embargo, se considera que aun los estudios clínicos sobre el uso de este recurso vegetal en el tratamiento de dolencias gastrointestinales son insuficientes (Lozoya et al. 2002). Se reportan efectos de los extractos foliares de *P. guajava* sobre el sistema nervioso central, inhibición de la transcriptasa reversa retroviral, acción antimutagénica, agente antipalúdico, citotóxico, antidiabético, antipirético, antiparasitario, antialérgico, antiinflamatorio, antibiótico, antioxidante y protección miocárdica (Gondim et al., 2009). Pelegrini et al., (2008) identificaron en semillas de guayaba, la primera proteína vegetal (Pg-AMP1) rica en glicina con actividad antibacteriana.

4.4.3. *Solanum quitoense* (Lulo)

El lulo, naranjilla o nuquí es una fruta originaria de zona andina de Ecuador y se cultiva ampliamente en Colombia entre los 1.200 y 2.100 m.s.n.m. Pertenece a la familia de las *Solanaceae*, es un arbusto pequeño, con frutos redondeados de cascara amarilla y pulpa verde que incluye la semilla, de sabor ácido muy apetecido a nivel mundial (ICA. 2011). En Colombia se cultiva en los departamentos de Huila, Valle del Cauca, Tolima, Boyacá y Nariño, es una fruta de alta demanda internacional especialmente España.

Es una planta que crece rápida y espontáneamente en temperaturas entre los 17 y 20 °C, en sitios sombreados y con buena humedad. Los tallos son robustos, semileñosos, cilíndricos, las hojas anchas, ovaladas, borde ondulado, peciolo de hasta 15 cm y cubiertas de tricomas. La pulpa se

comercializa como pasta y se utiliza principalmente en la elaboración de jugos y como saborizante (Jurado y Muñoz 2009). Del uso alimentario de *S. quitoense* se genera una cantidad significativa de desechos entre cáscara y semillas, de las cuales Cerón, et al., (2012), obtuvieron AV con un rendimiento de 8.5 % demostrando su potencial como materia prima oleaginosa, de posible utilidad en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmetológica, por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados.

4.4.4. *Mangifera indica* (Mango)

Es una fruta tropical, originaria de la India, pertenece a la familia de las anacardiáceas, adaptada a diferentes pisos térmicos, desde nivel del mar hasta los 1.650 m de altitud. Se adapta muy bien gracias a la polinización cruzada dando como resultado más de 200 ecotipos o subpoblaciones genéticas diferenciadas (DANE 2015). En Colombia los departamentos con mayor producción de mango son: Magdalena y Tolima, seguidos por los departamentos de Cundinamarca y Antioquia, entre otros (DANE 2015).

En la industria alimenticia se utiliza la pulpa en jugos, postres o consumo directo incluida la cáscara; en la medicina se ha demostrado un efecto antiinflamatorio, analgésico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Ojewole 2005).

Trabajos demuestran el potencial biológico de los aceites obtenidos a partir de la semilla de mango; Awad El-Gied et al., (2015) reportaron actividad antimicrobiana producida a partir de crema y ungüento de uso tópico sobre *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* y *M. smegmatis*; y Jiamboonsri et al., (2011) demostraron el poder inhibitorio del extracto de semilla de mango tailandés en contra del *S. aureus* meticilino-resistente.

4.4.5. *Passiflora edulis* (Maracuyá)

El maracuyá o fruta de la pasión pertenece a la familia de las *Pasifloraceas*, fruta exótica originaria de la amazonia del Brasil, comprende 12 géneros y 500 especies, se conoce como fruta de la pasión, no por ser afrodisiaca sino porque la flor contiene los símbolos de la pasión de Cristo (Abadía 2014). Es una fruta de gran demanda, se cultiva entre los 300 y 1000 m.s.n.m. en regiones de América, Asia y África. La fruta es de forma redondeada u ovoide, la corteza de color amarillo, lisa, dura y un poco cerosa y de un espesor de 3 mm aprox. el sumo y la pulpa son de color amarillo, un poco ácidas, incluyen la semilla, estas son de color negro o marrón oscuro e incluidas en la pulpa (Abadía 2014). Lam y Ng (2009) demostraron actividad antifúngica de una nueva proteína extraída de las semillas del maracuyá. Ferreira et al. (2011) demostraron actividad antioxidante, pero no antibacteriana sobre cuatro especies bacterianas.

La fruta es utilizada en la producción de jugos, pulpas y concentrados por cual ocupa un renglón importante en la producción en el departamento de Nariño. Los desechos del procesamiento son utilizados en primer lugar como abonos orgánicos, sin embargo el grupo de Tecnologías Emergentes de Agroindustria de la Universidad de Nariño después de obtener los AV de las semillas de esta fruta identificó sus componentes y determinó la actividad antioxidante (Pantoja-Chamorro, Hurtado- Benavides, y Martinez-Correa 2017).

4.4.6. *Rubus glaucus* (Mora de Castilla)

Pertenece a la familia de las rosáceas, el fruto es un agregado de pequeñas drupas que incluyen las semillas, son de color púrpura, unidas a un receptáculo cónico que se separa fácilmente de la planta, la semilla es de forma arriñonada y su color varía de púrpura a rojo intenso (Pantoja-

Chamorro, Hurtado-Benavides, y Martínez-Correa 2017). Es originaria de la zona andina de América, se cultiva entre los 1.200 a 3.500 m.s.n.m. En Colombia se cultiva en los departamentos de Nariño, Cauca, Huila, Tolima, Valle del Cauca, Caldas, Quindío, Risaralda, Antioquia, Cundinamarca, Santanderes y Meta (Sora, Fischer, y Flórez 2006).

La mora es una planta perenne de arbusto pequeño, con tallos rastreros y espinosos, por lo general se presentan tallos machos, hembras y látigo. La planta presenta floración y fructificación permanente, con tiempo de cosecha cada cinco a seis meses aproximadamente, tradicionalmente se utiliza en la elaboración de jugos, postres y mermeladas (Cancino-Escalante et al. 2015). Martini et al., (2009) reportaron actividad antibacteriana a partir de extractos obtenidos de hoja de *Rubus ulmifolius* sobre la cepa de *H. pylori* strain G21 CagA.

4.4.7. *Carica papaya* (Papaya)

La papaya pertenece a la familia de las caricáceas, originaria de Centroamérica. Los principales países productores son India, Brasil, Indonesia, Nigeria, México, Etiopía, Colombia, Tailandia y Guatemala. En Colombia el departamento de Córdoba es el principal productor seguido por los departamentos de Valle del Cauca, Meta y Nariño, entre otros. Se cultiva desde 0 a 1.600 m.s.n.m. y a una temperatura entre los 32 °C a 17 °C (DANE 2016).

Es una fruta con alto nutritivo e industrial, representa un producto de gran utilidad y variados usos; posee un alto contenido vitaminas, minerales y fibra, además posee actividad antioxidante, antiparasitaria, antiinflamatoria, por su gran contenido en agua es muy utilizada para la piel y procesos gástricos (Rodríguez Cabello et al. 2014). Trabajos previos reportaron actividad antifúngica (He et al. 2017) y actividad antihelmíntica sobre *H. diminuta* (Sapaat et al. 2012) de aceites de semilla de papaya.

4.4.8. *Solanum betaceum* (Tomate de árbol)

Es uno de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial debido a su gran consumo, comercialización e industrialización. Asimismo, este fruto se reconoce por sus propiedades antioxidantes y es la principal fuente de licopeno, de vitaminas A, C (ácido ascórbico) y E, potasio, magnesio, hierro y fósforo (Macé 2010) y de flavonoides; varios de estos compuestos están asociados con la prevención de serias enfermedades como el cáncer y las afecciones cardiovasculares (Luna Guevara et al. 2015). Es un arbusto pequeño de corteza grisácea, con hojas alternas, originario de los Andes, los países productores son: Perú, Chile, Ecuador, Argentina, Bolivia y Colombia. El fruto es una baya ovoide de 4 a 8 cm x 3 a 5 cm, la cáscara es lisa, brillante y de color rojo o amarillo, la pulpa es agrídulce e incluye las semillas, se utiliza en jugos, dulces, postres; sus usos medicinales están relacionados con afecciones de garganta y resfriados (Macé 2010).

4.5. Citotoxicidad

La toxicología se dedica a analizar las sustancias químicas que se lanzan al mercado con el fin de ser utilizadas en bien de la salud humana (Arencibia, Rosario, y Curveco 2003). Entre los métodos de análisis de dichas sustancias se encuentra la determinación de citotoxicidad la cual determina a partir de patrones celulares conocidos, los efectos adversos contra la integridad celular así como la vitalidad y cumplimiento de las funciones normales de las células como la reproducción (Arencibia, Rosario, y Curveco 2003). Un agente citotóxico es toda sustancia que destruye o causa efectos tóxicos sobre las células de un tejido y que pueden ser detectados por diversos modelos experimentales validados como cultivos de líneas celulares, ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid, ensayo de reducción del Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-

difeniltetrazólico (Arencibia, Rosario, y Curveco 2003; Jaqueline Mena-Huertas et al. 2011; Durán, Montero, y Marrugo 2013).

4.6. Métodos de determinación antibacteriana

Las pruebas de sensibilidad se realizan de un cultivo primario en medio sólido y se deben procesar colonias aisladas de un microorganismo. Depende del microorganismo y del agente antimicrobiano la selección del método más adecuado que permita por una parte el crecimiento del microorganismo, la difusión completa del agente antimicrobiano y la interpretación correcta de los resultados (CLSI, 2012).

4.6.1. Método de difusión en agar con sensidiscos

Este método está basado en la presencia o ausencia de una zona de inhibición de crecimiento, que se mide en milímetros. La interpretación de la prueba se basa en la correlación entre el diámetro de la zona de inhibición (mm) con la CMI ($\mu\text{g/mL}$) para cada agente antimicrobiano y microorganismo. Se utiliza agar Mueller Hinton formulado y avalado de acuerdo a los criterios del CLSI. El medio debe tener una profundidad de 4mm con pH de 7,2 a 7,4. El inóculo del microorganismo es una suspensión ajustada a la turbidez equivalente al estándar 0.5 McFarland. Los sensidiscos se elaboran con papel Whatman 5,6 mm de diámetro, estériles e impregnados del agente antibacteriano, el cual se deja secar durante una hora, de no utilizarse inmediatamente se deben conservar en refrigeración a 8 °C, protegidos con papel desecante. Las cajas se incuban a 35 ± 2 °C de 16 a 24 h dependiendo del microorganismo a probar (CLSI, 2010).

4.6.2. Método de difusión en agar perforado

El procedimiento se realiza en una caja de Petri con agar Mueller Hinton bajo las mismas condiciones que para el método de difusión en disco, el agente antimicrobiano se incorpora dentro del agar en pozos perforados asépticamente de 6 mm de diámetro, cada pozo contiene una concentración diferente del agente antimicrobiano. La suspensión de la bacteria se ajusta al estándar de turbidez 0.5 McFarland. Esta afectado por los mismos factores del método de difusión en disco: agar Mueller Hinton, pH, concentración de los cationes divalentes, turbidez del inóculo e incubación (CLSI, 2010).

4.6.3. Método de microdilución en caldo

Es un método cuantitativo e involucra pequeños volúmenes de caldo. Se realiza en policubetas de 96 pocillos de plástico estériles de fondo cónico o redondo, con capacidad de 100 μL , Para preparar las placas de microdilución, se realizan diluciones al doble de los agentes antimicrobianos en caldo o agua estéril. El método más conveniente para obtener las diluciones, consiste en prepararlas por separado y colocar 0.1 (+/- 0.02) mL en cada uno de los 96 pocillos mediante una pipeta automática mono o multicanal (CLSI, 2012). Cada policubeta debe incluir un pocillo de control de crecimiento (sin antibiótico) y un control negativo (caldo sin inocular). Una vez preparadas las policubetas, con las diluciones se inoculan con el microorganismo a evaluar, para esto se prepara una suspensión equivalente a 5×10^5 del patrón 0.5 de McFarland (1×10^7 UFC/mL), si el volumen final en cada pocillo es de 0.1 mL el volumen de inóculo a agregar es de 10 μL , se debe agregar dentro de los 15 minutos siguientes a su preparación. Las policubetas se deben sellar inmediatamente con tapa o papel adhesivo para evitar la evaporación durante la incubación y realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo (CLSI, 2012).

La interpretación de la CMI es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el pocillo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo. Opcionalmente para la lectura se pueden utilizar equipos de lectura, que determinan el crecimiento o no del microorganismo. Para validar la prueba se debe obtener en el pocillo control de crecimiento un botón de aproximadamente 2 mm de diámetro o turbidez neta (CLSI, 2012).

Se debe realizar recuento de colonias para verificar que la concentración del inóculo final obtenido es de 5×10^5 UFC /mL. Se toma 0,01 mL del inóculo y se diluye en 10 mL de solución fisiológica 0,9 % (dilución 1:1000), distribuir 0.1 mL sobre la superficie de agar Nutritivo; incubar 24 h a 37 °C, la presencia de 50 colonias indica que la densidad de inóculo final es de 5×10^5 UFC/mL.

El medio de cultivo recomendado es el caldo Mueller Hinton, el cual permite el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos de rápido crecimiento (CLSI, 2010).

5. Objetivos

5.1. General

Determinar *in vitro* la actividad citotóxica sobre eritrocitos y linfocitos humanos y la actividad antimicrobiana sobre bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, de aceites vegetales obtenidos mediante fluidos supercríticos de semillas de ocho frutas tropicales y andinas cultivadas en el departamento de Nariño.

5.2. Específicos

- ✚ Evaluar el efecto de los aceites vegetales de semillas de *Annona muricata* (guanábana), *Psidium guajava* (guayaba), *Solanum quitoense* (lulo), *Mangifera indica* (mango), *Passiflora edulis* (maracuyá), *Rubus glaucus* (mora de castilla), *Carica papaya* (papaya) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol), sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- ✚ Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Efectiva EC_{50} de los aceites vegetales de semillas preseleccionados sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas provenientes de infecciones de humanos.
- ✚ Valorar la citotoxicidad *in vitro* en eritrocitos y linfocitos humanos de los aceites vegetales obtenidos por fluidos supercríticos de semillas de las frutas: guanábana, guayaba, lulo, mango, maracuyá, mora de castilla, papaya y tomate de árbol.

Hipótesis sobre Actividad Antimicrobiana

- ✚ **H₀:** Por lo menos uno de los Aceites Vegetales (AV) estudiados, presenta actividad antibacteriana sobre organismos Gram positivos o Gram negativos.

- ✚ **Ha:** Los AV estudiados no presentan actividad inhibitoria frente a las bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Hipótesis Sobre Citotoxicidad

- ✚ **Ho:** Los AV obtenidos de las semillas de ocho especies de frutas andinas no presentan actividad citotóxica *in vitro* sobre linfocitos o eritrocitos humanos.
- ✚ **Ha:** Alguno de los AV estudiados presentan citotoxicidad sobre linfocitos o eritrocitos humanos.

6. Metodología

Se realizó una investigación tipo experimental, *in vitro*, cuantitativa, para determinar el potencial biológico relacionado con la inhibición bacteriana y efecto citotóxico sobre células sanguíneas, de los AV obtenidos de semillas de ocho frutas de amplio uso en el departamento de Nariño.

6.1. Obtención de aceites vegetales de semillas

6.1.1. Recolección y adecuación de las semillas

La materia prima utilizada para la extracción de los AV de semillas de las frutas: *Annona muricata* (guanábana), *Mangifera indica* (mango), *Solanum quitoense* (lulo), *Psidium guajava* (guayaba) y *Solanum betaceum* (tomate de árbol), fueron suministradas por la empresa Industria de Productos Agroindustriales de Nariño – INPADENA ubicada en el municipio de San Juan de Pasto (Nariño – Colombia). Las semillas de *Passiflora edulis* (maracuyá), *Carica papaya* (papaya) y *Rubus glaucus* (mora de castilla) fueron obtenidas de los residuos posterior al consumo casero. Para la adecuación del material vegetal, se tuvo en cuenta la metodología y los resultados del proyecto “Aprovechamiento de residuos agroindustriales de frutas para la obtención de aceites con potencialidad en la industria cosmética, utilizando la tecnología de extracción con fluidos supercríticos” (Cerón et al. 2016; Dorado et al. 2016; Pantoja et al. 2017).

La adecuación de la materia prima incluyó la separación de las semillas de los restos vegetales como pulpa, cascara y otros desechos que las acompañaban, utilizando abundante agua y frotándolas en coladores hasta eliminar completamente los desechos, posteriormente se lavaron y se colocaron sobre mallas para eliminar el exceso de agua y pasar al proceso de secado el cual se realizó en

bandejas metálicas en el horno de secado BINDER con convención forzada Modelo FD 23 Classic Line (USA), ubicado en el laboratorio 404 del bloque de Docencia de la Universidad de Nariño, la temperatura y tiempo varió de acuerdo al tipo de semilla (Cerón et al. 2012; Cerón et al. 2016; Dorado, 2016; Pantoja Chamorro, 2016; Pantoja-Chamorro et al. 2017). Las semillas secas se empacaron en bolsas de polietileno con cierre hermético a temperatura ambiente hasta su utilización. En la Figura 2, se presenta la imagen de las semillas secas lista para la extracción de aceites.

Figura 2

Semillas secas de ocho frutas cultivadas en el departamento de Nariño



Después de realizada la adecuación de las semillas, se llevaron al laboratorio de Fluidos Supercríticos donde se determinó el peso y el porcentaje de humedad. Las semillas secas se pesaron en una balanza digital marca FENIX con capacidad de 6 kg. Antes de utilizar la balanza se verificó

con patrones de masa de 100 y 30 g. La humedad de las semillas se determinó en un analizador de humedad marca Precisa-XM60.

6.1.2. Molienda y análisis granulométrico de semillas de frutas

6.1.2.1 Molienda.

En la Figura 3 se observa el proceso de la molienda de las semillas realizada en un molino de discos, ubicado en Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Para caracterizar el material se realizó un análisis granulométrico a las semillas molidas, posteriormente fueron almacenadas en bolsas plásticas con cierre hermético a 4 °C, hasta su posterior uso en la extracción.

Figura 3

Molienda de semillas de frutas



6.1.2.2 Análisis granulométrico.

En este estudio se determinó el tamaño promedio de partícula de las semillas secas y molidas, de acuerdo a los parámetros establecidos en la NTC 2441 de 1996. De esta manera 100 g de semilla molida de cada fruta, fueron tamizados utilizando una tamizadora modelo (PS-35 serie 1182) en la serie de tamices (10-80, A.S.T.M.E.). El equipo se observa en la Figura 4. El procedimiento se realizó por espacio de 10 minutos.

Figura 4

Tamizado de semillas para análisis granulométrico



Se determinó el tamaño promedio de partícula de las semillas teniendo en cuenta la Ecuación (1) (Dorado-Achicanoy, 2016), que considera la apertura del tamaño del tamiz, donde queda retenida la fracción (Tabla 1).

$$(1) \quad \overline{Dp} = \sum X_i * Dp_i \quad (\text{Dorado-Achicanoy, 2016})$$

Tabla 1

Apertura de poro de tamices

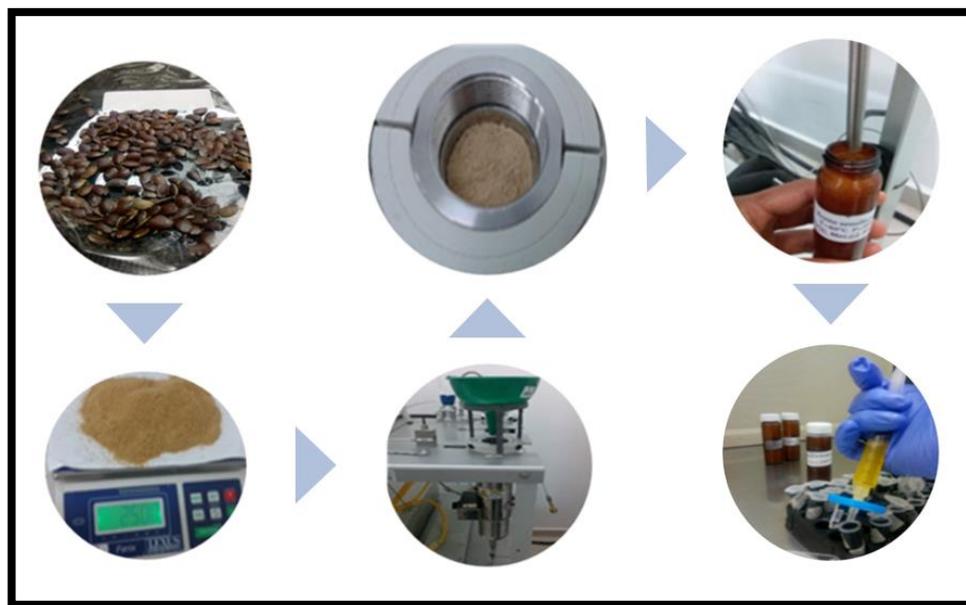
Tamices ASTM	Abertura (μm)
10 mallas	2000
20 mallas	850
30 mallas	600
40 mallas	425
80 mallas	212

6.1.3 Extracción de aceites de semillas mediante Fluido Supercríticos (FSC)

Para la obtención de los aceites de semillas de frutas se utilizó un equipo de extracción con fluidos supercríticos SFE-500 (Waters, USA), ubicado en el Laboratorio de Fluidos Supercríticos e Ingredientes Naturales de la Universidad de Nariño. En la Figura 5 se representa de manera general el proceso de extracción de aceite de semillas de las frutas: preparación de las semillas, molienda, extracción por FSC, obtención del AV y distribución en alícuotas de vidrio color ámbar, con cierre hermético para evitar procesos de descomposición por exposición a Luz solar u oxidación. Se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su uso el cual no superó los 2 meses de conservación.

Figura 5

Extracción de aceite de semillas de frutas



En la Figura 1, se observa el diagrama del proceso de extracción en el equipo de extracción de fluidos supercríticos. El equipo posee una celda de extracción de 500 mL de capacidad y cuenta con un sistema de regulación y control de presión, temperatura y flujo de entrada de CO_2 , que opera a

través del software Process Suite (Versión 5.9). El CO₂ fue adquirido en la empresa colombiana Cryogas con una pureza del 99,8%, en cilindros (con sifón) de 25 kg a una presión de 55 bar.

Los experimentos se realizaron empleando las condiciones óptimas de presión y temperatura (Tabla 2), el tiempo de extracción empleado fue de 150 minutos y el flujo de CO₂ se definió en 30 g.min⁻¹, obteniendo una relación de 22,5 g CO₂/g semilla. Estas condiciones fueron tomadas de los reportes de la literatura del Grupo TEA (Cerón et al. 2012; Cerón et al. 2016; Dorado, 2016; Pantoja-Chamorro, 2016; Pantoja-Chamorro et al. 2017).

Tabla 2

Condiciones de extracción con FSC de AV

Semillas	Temperatura (°C)	Presión (bar)
<i>P. guajava</i>	52	357
<i>A. muricata</i>	50	381
<i>P. edulis</i>	60	350
<i>M. indica</i>	65	349
<i>C. papaya</i>	36	381
<i>R. glaucus</i>	60	350
<i>S. quitoense</i>	60	350
<i>S. betaceum</i>	64	381

Fuente: Hurtado-Benavides (2016).

Para la extracción de aceites de semillas se tomaron muestras de 200 gramos de semilla molida y 50 gramos de perlas de vidrio (5 mm) para evitar trayectorias preferenciales de CO₂. El rendimiento se calculó a partir de la cantidad de aceite vegetal obtenido por unidad másica de materia prima en términos porcentuales, según la ecuación 2 (Pantoja-Chamorro, et al. 2017).

$$(2) \text{ Rendimiento } \left(\% \frac{p}{p} \right) = \frac{\text{masa aceite}}{\text{masa semilla molida}} * 100 \text{ (Pantoja-Chamorro, et al. 2017).}$$

Los aceites se filtraron a través de membrana PVDF (0,45 μ m), se envasaron 1 mL en tubos endorff estériles color ámbar y se conservaron a 4 °C hasta la utilización.

6.1.4 Caracterización de los aceites de semillas

Una muestra de cada AV (1 mL) fue enviada al laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño para el análisis de la composición de esteroides, tocoferoles y ácidos grasos.

6.1.4.1 Composición Esteroides y Tocoferoles.

El equipo utilizado para este procedimiento fue un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS), marca Shimadzu QP2010S (Shimadzu Scientific Corporation, Kyoto, Japón), equipado con una columna SHXRI-5MS (Shimadzu; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), con un detector selectivo de masas QP2010S (*full scan*) a 70eV y un inyector *splitless* a una temperatura de 270°C, con fase móvil de Helio UAP a un flujo de 1,0 mL/min. Para el análisis, se tomaron 300 μ L de aceite (100 mg en el caso del extracto de *M. indica*), se diluyeron a 1 mL empleando como solvente diclorometano de alta pureza (grado HPLC). Las soluciones resultantes se agitaron en vortex por 30 segundos y se adicionó sulfato de sodio anhidro para su inyección en el GC-MS. La identificación tentativa de los compuestos de interés se realizó por comparación de espectros de masas obtenidos con aquellos de las bases de datos NIST y WILEY. Por otra parte, la cuantificación se realizó mediante el método del estándar interno utilizando como patrón una solución de colesterol 50 ppm.

6.1.4.2 Composición ácidos grasos.

El equipo utilizado para este procedimiento fue un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Shimadzu QP2010S GC-MS, equipado con una columna DB-WAX (JyW Scientific 30m x 0,25mm x 0,25 μ m), con un detector selectivo de masas QP2010S (*full scan*) a 70eV, y un inyector *Split*, a una temperatura de 280°C, con fase móvil de Helio UAP a un flujo de 1,0 mL/min. La preparación y análisis de los ácidos grasos presentes en los extractos de semillas se realizó a partir de ésteres metílicos correspondientes. Para el análisis se tomaron 0,2 mL de aceite (100 mg en el caso del extracto de *M. indica*, previamente disuelto en hexano), se sometieron a derivatización empleando como reactivo derivatizante 5 mL de una solución de HCl/metanol al 5% v/v. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos derivatizados fueron extraídos con 2 mL n-hexano grado HPLC. Finalmente se adicionó sulfato anhidro para la inyección de las muestras en el Cromatógrafo de Gases / Espectrómetro de Masas. La identificación de los compuestos de interés se realizó por comparación de los espectros de masas, empleando la base de datos NIST y WILEY, la cuantificación se realizó por porcentaje relativo de área.

6.2. Determinación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los aceites de semillas de frutas

La determinación de la actividad antibacteriana se realizó por dos metodologías: difusión con sensidiscos en caja Petri y agar perforado, esto con el fin de seleccionar la metodología con mejores resultados para cada AV (Intorasoot et al. 2017). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó por el método de micro dilución en caldo en placa de microelisa (CLSI 2012).

6.2.1 Bacterias analizadas

Los organismos de ensayo bacteriano utilizados fueron cepas certificadas American Type Culture Collection: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Enterococcus*

faecalis (ATCC 29212), las cuales se activaron en caldo Infusión de Cerebro Corazón (BHI) y en agar BHI; todas las cepas se incubaron a 37 °C durante 22 horas (Merck), cada cepa fue confirmada por medio de batería bioquímica, medios selectivos, tinción de Gram. Los cultivos se repicaron y mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su utilización.

De igual manera se realizaron pruebas con bacterias obtenidas de infecciones de pacientes hospitalizados en la Clínica Profesionales de la Salud - Proinsalud S.A. (Pasto, Nariño), las cuales eran resistentes a antibióticos comerciales, así: *S. aureus* resistente a Amoxicilina/ácido Clavulanato, Ampicilina/Sulbactam, Ampicilina, Cefazolina, Oxacilina y Penicilina; *P. aeruginosa*, resistente a Aztreonam, Cefepima, Imipenem, Meropenem y Piperaciclina/tazobactam; *E. coli*, resistente a Acido Nalidixico, Ampicilina, Aztreonam y a las Cefalosporinas (productora de Betalactamasa de Amplio Espectro). Estas cepas provenientes de infecciones humanas fueron aisladas por el personal de la clínica, identificadas y testeadas para antibiograma, se transportaron en el medio de cultivo Cary-Blair hasta el Cepario de la Universidad de Nariño, donde fueron cultivadas en agar BHI para la confirmación de cada cepa por medio de baterías bioquímicas, medios selectivos, tinción de Gram. Posteriormente se conservaron a temperatura de 4 °C, hasta su posterior utilización.

Todos los procedimientos bacterianos relacionados con el cultivo, identificación, mantenimiento y eliminación de cultivos y demás desechos se realizaron de acuerdo al Manual de Bioseguridad de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2005).

6.2.2 Difusión en agar con sensidiscos

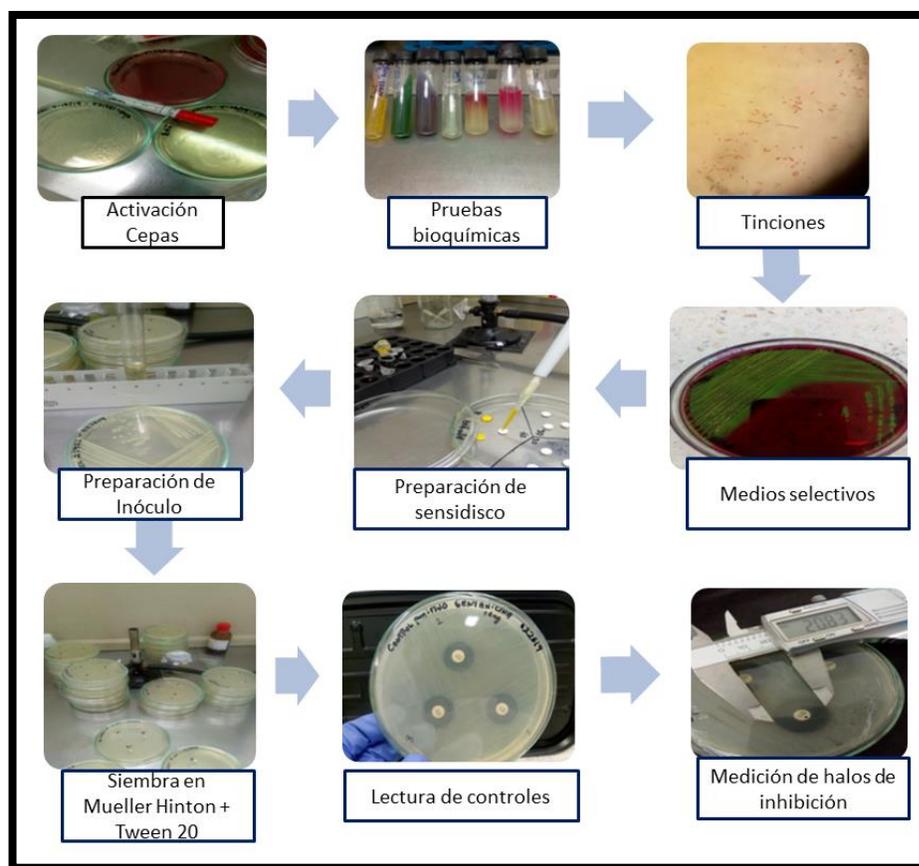
Esta prueba se realizó con sensidiscos comerciales sin antibiótico (Antimicrobial Susceptibility Test Disc, Oxoid) de 6 mm de diámetro, los cuales se impregnaron con 20, 30 y 40 µL de cada uno de los AV puro, a los cuales se dio vortex durante 30 segundos (Intorasoot et al.

2017), se dejaron secar a 37 °C durante una hora. Posteriormente se preparó el inóculo de cada microorganismo en caldo Nutritivo (CN) hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL), 100 μ L de este cultivo se sembraron en tres sentidos con escobillones estériles, sobre la superficie de placas de Petri conteniendo agar Mueller Hinton (AMH) mas Tween-20 al 0,5% (v/v) (Sigma), adicionado para mejorar la solubilidad del AV en el medio (Prabuseenivasan, Jayakumar, y Ignacimuthu 2006). Finalmente se colocaron en la superficie del agar los sensidiscos previamente preparados, como controles de la prueba se depositó un sensidisco comercial de Oxacilina (control positivo): para *S. aureus* y *E. faecalis*, para *E. coli* y *K. pneumoniae* se utilizó un sensidisco de Gentamicina, para *P. aeruginosa*: Ceftazidime, para completar el ensayo se colocó un sensidisco preparado previamente con Tween 20 (control negativo), además, se llevó a incubar una caja Petri sin inóculo bacteriano (control de esterilidad del medio), otra caja Petri solo con inóculo bacteriano (control de inóculo) y una caja Petri donde se sembraron estrías de cada AV (control de esterilidad de los AV)(Awad El-Gied et al. 2015). Las cajas se incubaron a 37 °C durante 22 horas. Algunas modificaciones se aplicaron al cultivo del *E. faecalis*, al medio de cultivo AMH se adicionó agar BHI al 5% y fueron incubadas a 42 °C durante 24 horas (Díaz Pérez, Martínez, Rodríguez, y Zhurbenko 2013). Al cabo de este tiempo, se evaluaron las cajas control de esterilidad: del medio, de los AV, Tween 20 y control de inóculo ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL), posteriormente se realizó la medición del halo de inhibición en torno a los sensidiscos comerciales (control positivo), y se evaluó la presencia/ausencia de halos de inhibición en torno a los sensidiscos con AV de las semillas de frutas. Cada uno de estos halos se midió en milímetros con ayuda de un calibrador y se registraron los datos obtenidos, el proceso realizado se representa en la Figura 6. Los valores de los halos de inhibición se compararon con el control positivo y negativo de cada cepa. Todas las pruebas se

realizaron por triplicado. Los AV que presentaron inhibición antibacteriana se seleccionaron para continuar con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Figura 1

Procedimiento para la determinación in vitro de la actividad antibacteriana en placa de Petri



6.2.3 Difusión en agar perforado

Se realizó según el método utilizado por (Cruz-Carrillo y Rodríguez, 2010), se adicionó al AMH, Tween-20 al 0,5% (v/v) (Sigma) para mejorar la solubilidad del AV (Prabuseenivasan, Jayakumar, y Ignacimuthu 2006). Para cada AV puro, se realizó el siguiente procedimiento: inicialmente las placas se inocularon con 100 μ L de inóculo bacteriano, equivalente al tubo 0,5 de la

escala de McFarland (1.5×10^7 UFC/mL). En cada caja Petri se realizaron tres perforaciones de 6 mm de diámetro con sacabocado estéril, se adicionaron en cada pozo 10 μ L del medio fundido para sellar el fondo y evitar la dispersión del AV, posteriormente en cada pozo se adicionaron 20, 30 y 40 μ L del AV a evaluar, se utilizó una caja Petri adicional como control positivo en la cual se adicionó 20 μ L de un antibiótico comercial líquido Gentamicina para *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* y Ceftriazona para *P. aeruginosa*, en una caja Petri adicional se realizó el control negativo adicionando a los pozos 20 μ L de Tween 20. Se realizará control de esterilidad del medio (caja Petri sin inóculo) y control de inóculo (1.5×10^7 UFC/mL) y control de esterilidad de los aceites. Todas las cajas se incubaron a 37 °C durante 22 horas (Prabuseenivasan, Jayakumar, y Ignacimuthu 2006), todas las pruebas se realizaron por triplicado. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de los halos del control positivo con ayuda de un calibrador, se registraron los datos y se compararon con los reportes de la CLSI (2015), para establecer la sensibilidad o resistencia.

6.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Una vez identificados los AV con actividad antimicrobiana, se determinó con ellos la CMI, aplicando la técnica de microdilución en caldo en placa de microelisa. Este es un método cuantitativo y permite utilizar pequeños volúmenes de medio de cultivo, extracto e inóculo, se realizó en policubetas de 96 pocillos de plástico estériles de fondo plano, con capacidad de 100 μ L, las diluciones se realizaron al doble y directamente en cada pozo. Inicialmente se preparó un inóculo equivalente a 5×10^5 del patrón 0.5 de McFarland (1×10^7 UFC/mL) (CLSI, 2012). En la Figura 7 se representa la identificación de controles, diluciones y orden de los AV analizados para facilitar su montaje e interpretación.

Figura 2

Disposición de controles y diluciones en placa de microElisa

Cepa bacteriana		AV	CI	CAV	CMC	CP	D1	D2	D3	D4
Cepa- ATCC	<i>S. betaceum</i>									
	<i>S. quitoense</i>									
	<i>A. muricata</i>									
	<i>P. guajava</i>									
	<i>P. edulis</i>									
	<i>M. indica</i>									
	<i>C. papaya</i>									
	<i>R. glaucus</i>									
Cepa- ATCC	<i>S. betaceum</i>									
	<i>S. quitoense</i>									
	<i>A. muricata</i>									
	<i>P. guajava</i>									

Disposición de muestras y controles. CI: control inóculo, CAV: control de los aceites vegetales de semillas, CMC: control medio de cultivo, CP: control positivo, D1: 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$, D2: 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$, D3: 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$, D4:250 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Con la ayuda de micropipetas mono y multicanal se realizó el montaje de las placas con las diluciones y controles de calidad de la prueba, estos se indican en la Tabla 3. El inóculo bacteriano se adicionó al final del montaje para garantizar su utilización en un tiempo inferior a los 15 minutos siguientes a su preparación (CLSI, 2012).

Tabla 3*Controles de calidad y microdiluciones de aceites de semillas*

Controles y diluciones	Caldo MH+Tween 20 μL	AV μL	Inóculo μL	Antibiótico	Volumen Final μL	Concentración final μL/mL
CI	90	-	10	-	100	-
CAV	90	10	-	-	100	-
CMC	100	-	-	-	100	-
CP	65	-	10	25	100	-
D1	-	90	10	-	100	900
D2	15	75	10	-	100	750
D3	40	50	10	-	100	500
D4	65	25	10	-	100	250

Nota. CI: control de inóculo; CAV: control de los aceites vegetales de semillas; CN: control negativo; CP: control positivo

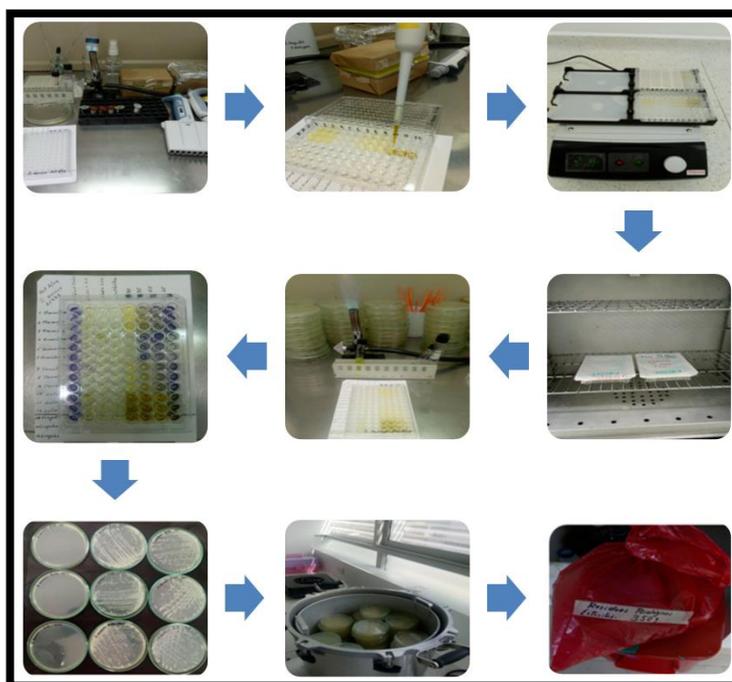
Una vez preparadas las placas, se taparon para evitar la evaporación y se llevaron a agitación a 350 rpm durante 1 min en el equipo Compact Digital Microplate Shaker, Thermo Scientific, para permitir la homogenización de los contenidos, posteriormente se llevó a incubar a 37°C durante 22 horas (Zampini, Cudmani, y Isla 2007), adicionalmente se realizó un control de pureza del inóculo subcultivando 1mL en agar MH (CLSI, 2012), las pruebas se realizaron por triplicado. Una vez realizado este procedimiento se realizó la lectura de la prueba en placa adicionando a cada pocillo 10μL del reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Chem Cruz Biotechnology, Inc) el cual se preparó 1mg/mL en agua destilada estéril, el viraje de color a purpura indica viabilidad de los microorganismos bacterianos mientras que si el color permanece amarillo intenso o tenue indica inhibición bacteriana lo cual permite establecer presuntamente la CMI (Ávila, D. N. M., Ramírez-Rueda, y Mayorga 2015).

6.2.5 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Culminado el tiempo de incubación de las placas y antes de agregar el reactivo MTT, se procedió a realizar la prueba confirmatoria, sembrando en forma masiva 10 μ L de las diluciones 90,75 y 50 μ L en agar MH, las cajas se sellaron con papel vinipel y se llevaron a incubar a 37°C durante 22 horas al cabo de las cuales se realizó recuento de colonias. La interpretación de la CMB es la menor concentración de cada AV capaz de inhibir el 99.9% de las bacterias analizadas, impidiéndole crecer en un medio de cultivo (Horna Quintana, 2005). El recuento de colonias o unidades formadoras de colonia (UFC) se obtuvo teniendo en cuenta que el inóculo fue de 10 μ L por lo tanto, cada colonia equivale a 100 UFC multiplicado por el factor de dilución 10 (Camaró-Sala et al. 2015; Cantón et al. 2000). El procedimiento realizado se muestra en la Figura 8.

Figura 3

Procedimiento determinación de la CMI y CMB



Todos los cultivos se descartaron de acuerdo a los protocolos de bioseguridad (OMS, 2005), fueron entregados en bolsa roja al personal de servicios generales después de ser pesados, para que sean incinerados por la empresa EMAS con quienes tiene el contrato la Universidad de Nariño (Pasto, Nariño).

6.3. Determinación *in vitro* de citotoxicidad sobre células sanguíneas humanas

Se decidió trabajar con células sanguíneas humanas (eritrocitos y linfocitos) debido a que son un buen modelo celular para evaluar citotoxicidad, ya que por una parte son de fácil cultivo en laboratorio y adicionalmente se han desarrollado técnicas estandarizadas que permiten un adecuado montaje experimental y análisis de resultados.

6.3.1 Obtención de células sanguíneas

Las muestras de sangre total anticoagulada con EDTA se obtuvieron de individuos voluntarios, sanos y con previo consentimiento informado, los criterios de selección fueron: jóvenes entre 18 a 25 años, no fumadores, que no hayan ingerido alcohol un mes antes del ensayo ni durante las pruebas. Una vez firmado el consentimiento se procedió a extraer 5 mL de sangre total en tubos con K₂ EDTA para evitar la formación de coágulos, se utilizaron inmediatamente (Corrêa 2019). Las muestras y los ensayos se descartaron de acuerdo a los protocolos de bioseguridad (OMS, 2005).

6.3.1.1 Preparación de la suspensión de linfocitos.

Se siguió el protocolo de Durán et al., (2013) acorde con el método de Böyum (1968), mediante gradiente de densidades con Ficoll-Hipaque (Hystopaque-1077 Sigma). Inicialmente se extrajeron 5 mL de sangre los cuales se adicionaron a 5 mL de fosfato buffer salino (PBS : NaCl

137mM, KCL 2,7mM, N_2HPO_4 1mM, KH_2PO 2mM, pH 7,4), se homogenizó suavemente, esta mezcla se adicionó a un tubo cónico preparado previamente con 3 mL de Hystopaque-1077 frío, la adición se realizó por las paredes del tubo inclinado, evitando perturbar la interface permitiendo observar en la parte inferior la capa de Hystopaque-1077 y la capa superior conformada por la mezcla de sangre y PBS. Se llevó el tubo a centrifugar a 400 g durante 20 min, a una temperatura de 20 °C, aceleración de ascenso cero y sin freno en el descenso de velocidad. Al finalizar la centrifugación se obtuvieron cuatro estratos: el primero en la base del tubo, contenía eritrocitos y granulocitos, el segundo Hystopaque-1077, el tercero contenía los linfocitos como también plaquetas, por último, en el estrato superior se conformaba por el plasma. Con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se recuperó la capa tres correspondiente a los linfocitos y plaquetas y se transfirió a un tubo de 15 mL y se aforó hasta 10 mL con PBS pH 7,4, se homogenizó suavemente. Este tubo se llevó a centrifuga a 300 g, durante 10 min, a 20°C. Al finalizar la centrifugación, se descartó el sobrenadante por inversión del tubo evitando descartar el pellet de linfocitos, los cuales se resuspendieron completamente con movimientos suaves y gracias a la adición de 1000 μ L de PBS pH 7,4, posteriormente se aforó el tubo hasta 10 mL con PBS pH 7,4, se homogenizó por inversión del tubo y se centrifugó nuevamente con las condiciones anteriormente descritas, al cabo de la cual se descartó el sobrenadante obteniendo 500 μ L de sedimento al cual se adicionó 9 mL de medio de cultivo básico RPMI-1640 (sigma) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), se llevaron a una suspensión de 10^6 células/mL. Se verificó la pureza de la extracción por visualización a través de microscopio (tinción de Giemsa), y se determinó la viabilidad inicial por método de exclusión con azul de tripán. La solución se utilizó inmediatamente.

6.3.1.2 Preparación de los eritrocitos.

De la primera capa (eritrocitos) se tomó 1 mL con micropipeta de 1000 μ L y se dispensaron en otro tubo falcón estéril, se aforó hasta 10 mL con solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS: KH_2PO_4 0.4mM, Na_2HPO_4 0.3mM, NaCl 0.136 M, D-Glucosa 6mM, KCl 5mM, pH 7.4), se mezcló suavemente para evitar la destrucción de las células por daño mecánico. Se llevó a centrifugar a 400 g durante 20 min, a una temperatura de 20 °C, al terminar la centrifugación se descartó el sobrenadante con ayuda de una pipeta de 1000 μ L, este procedimiento se realizó en dos oportunidades para garantizar el lavado de los eritrocitos eliminando los granulocitos. Se descartó el sobrenadante con pipeta y hasta obtener la capa de eritrocitos (aproximadamente 1 mL). Se mantuvieron en refrigeración a 6 °C hasta el momento de su utilización.

6.3.2 Determinación de actividad citotóxica in vitro sobre linfocitos

Los linfocitos mantenidos en medio RPMI-1640 (sigma) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, fueron utilizados para evaluar la citotoxicidad de los AV frente a estas células sanguíneas. Esta solución se dispensó en tubos eppendorf color ámbar y estériles. Se evaluó la viabilidad inicial de estas células adicionando a 10 μ L de cultivo celular la misma cantidad de azul de tripán, se dejó actuar el reactivo por espacio de 5 min y se realizó el recuento de las células viables las cuales no se tiñen con el colorante y permanecen refringentes, en contraste, las células muertas se tornaron de color azul. Una vez evaluada la viabilidad inicial, se procedió a realizar el montaje de las pruebas con los AV, los ensayos se realizaron obteniendo un volumen final de 500 μ L por cada tubo eppendorf, las diluciones realizadas se observan en la Tabla 4. Inmediatamente se llevaron a incubación a 37 °C para garantizar la vitalidad de las células, durante 3 horas, realizando lecturas cada hora por medio de la adición del azul de tripán 0,4%, posteriormente se realizó el recuento con la ayuda de cámara de Neubauer en un conteo total de 500 células observadas en

microscopio óptico (Primo Star –Zeiss Alemania) con el objetivo de 40X (Durán, Montero, y Marrugo 2013).

Tabla 4

Concentración de AV en cultivo de Linfocitos.

Cultivo de Linfocitos en RPMI	AV de Semillas	Dilución final
μL	μL	$\mu\text{L}/\text{mL}$
500	5	2,5
500	3,8	1,9
500	2,5	1,25
500	0,5	0,25

Como control positivo se utilizó Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) adicionado al 5% y como control negativo únicamente medio RPMI-1640 y linfocitos. El porcentaje de viabilidad absoluta y los resultados se calcularon y graficaron verificando su ajuste a la distribución lineal a lo largo del tiempo (ecuación 3), se consideraron citotóxicos al obtener una viabilidad igual a cero (0), ligeramente citotóxicos entre 40-79 % de viabilidad, y no citotóxicos con una viabilidad superior o igual a 80% (S. J. Mena-Huertas et al. 2016) .Los ensayos se realizaron por triplicado.

$$(3) \quad \% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No. de células teñidas}}{\text{Total de células contadas}} \times 100 \quad (\text{Durán, Montero, y Marrugo 2013}).$$

6.3.3 Determinación de Actividad hemolítica

Se evaluó la inhibición de la hemólisis inducida por H_2O_2 , según el método de Durán et al., (2013). Los eritrocitos lavados se midieron 500 μL y se aforaron a 10 mL con PBS pH 7,4, se mezclaron por inversión suave para evitar el daño mecánico, se realizó recuento de células, hasta

lograr una solución equivalente a 1×10^5 eritrocitos/mL, de esta suspensión se midieron 1000 μL en tubos ependorff color ámbar y estériles se adicionó inicialmente AV a razón de las diluciones 100, 75, 50 y 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Tabla 5).

Tabla 5

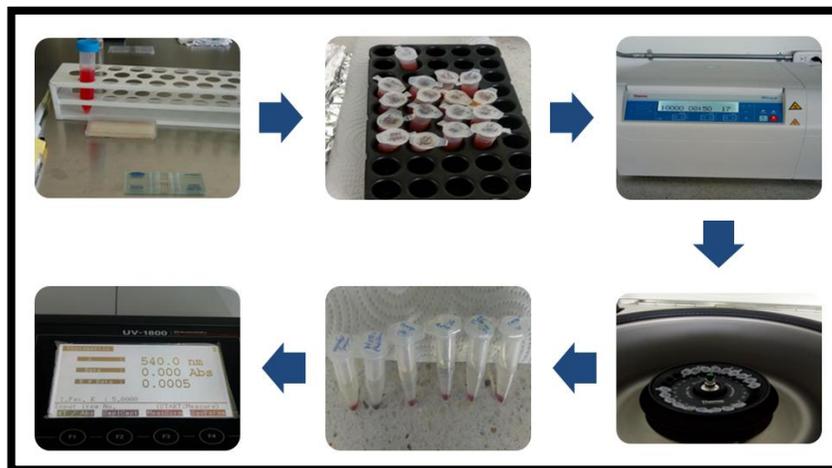
Ensayo para determinar la inhibición hemolítica

Suspensión de Eritrocitos	AV	Dilución final
μL	μL	$\mu\text{L}/\text{mL}$
1000	10	100
1000	7,5	75
1000	5	50
1000	2,5	25

Se dejó actuar los aceites por espacio de 5 min en agitación constante, posteriormente se adicionó Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 5% (v/v), se incubaron a 37°C y en agitación constante durante 30 min. Se llevaron a centrifugar a 1200 g, durante 10 min a temperatura ambiente, se leyó la hemoglobina liberada en el sobrenadante de cada muestra en espectrofotómetro (Thermo Scientific Megafuge Reino Unido) a 540 nm, frente a blanco de PBS pH 7,4 (Figura 9).

Figura 4

Procedimiento determinación actividad antihemolítica



Como control positivo se preparó una solución de eritrocitos con hemólisis total, a la cual se adicionó 100 μL de H_2O_2 , como control negativo se utilizó una solución de eritrocitos sin ningún aditivo y adicionalmente se montó un tubo con eritrocitos y AV (Durán, Montero, y Marrugo 2013). Las pruebas se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se registraron en una Tabla de Excel.

6.3.4 Determinación de alteración morfológica eritrocitaria

De la suspensión de eritrocitos preparada se midieron 500 μL en un tubo plástico estéril y se aforó a 10 mL con HBSS pH 7,4 de tal manera que al realizar el conteo en cámara de Neubauer la concentración de hematíes sea de 1×10^5 células/mL, se adicionó cada AV por ensayo realizado, de acuerdo a la Tabla 5, se llevaron a incubación durante 1 hora a 37°C en agitación constante y preservados de la luz, al cabo de este tiempo se adicionó glutaraldehído al 0,2% (Durán et al. 2013) (Tabla 6).

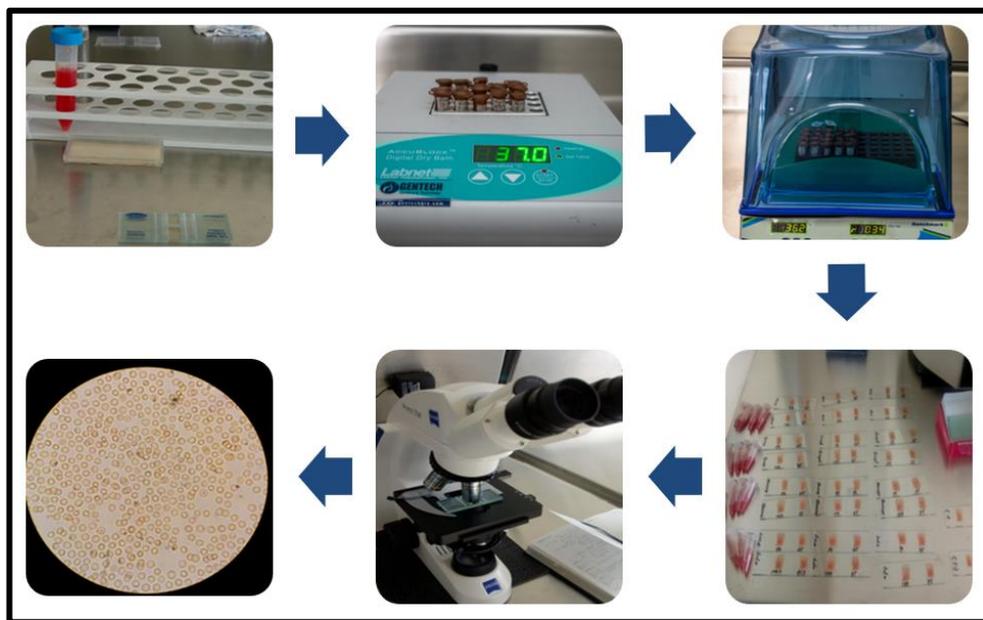
Tabla 6*Ensayo para Valorar Morfología Eritrocitaria*

Eritrocitos en HBSS	AV	Concentración final
μL	μL	μL
500	5	100
500	3,8	75
500	2,5	50
500	0,5	25

Se mezcló la suspensión y se midió 10 μL de esta suspensión sobre portaobjetos nuevos y lavados con alcohol isopropílico para eliminar la grasa, se realizó un extendido, una vez secas las preparaciones se leyeron en microscopio óptico (Primo Star –Zeiss Alemania) con objetivo de 100X y aceite de inmersión. En los extendidos se realizó un recuento en 500 células de las anomalías morfológicas relacionadas con equinocitosis y estomatocitosis (Durán et al. 2013). Para el control positivo se realizó una suspensión de eritrocitos con peróxido de hidrógeno al 30% (donde se observaba una población con alto porcentaje de anomalía en su morfología más no lisis eritrocitaria), por el contrario, el control negativo únicamente contenía la suspensión de eritrocitos en HBSS pH 7,4 (Figura 10). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Figura 5

Procedimiento determinación alteraciones morfológicas



6.4. Diseño estadístico

6.4.1 Actividad antibacteriana

El diseño experimental fue de tipo factorial 8 x 5 x 3, con tres replicas cada uno. Los factores fueron ocho aceites de semillas: *M. indica*, *P. edulis*, *C. papaya*, *S. betaceum*, *R. glaucus*, *S. quitoense*, *A. muricata* y *P. guajava*. Cinco cepas bacterianas: *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Tres cantidades: 20, 30 y 40 μ L. Las medidas de los halos de inhibición de los extractos analizados se muestran como la media \pm SEM. Las diferencias fueron evaluadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Dunnett. Para todos los análisis el criterio de significancia establecido $p < 0.05$.

6.4.2 Determinación de citotoxicidad, inhibición de hemólisis y alteración morfológica

Los ensayos de actividad antihemolítica y alteración morfológica y citotoxicidad se realizaron con 4 diluciones (90%, 75%, 50% y 25%) de cada uno de los ocho AV, por triplicado, la inhibición de hemólisis y citotoxicidad se determinaron en comparación con el control positivo (H_2O_2 al 5%) y las anormalidades eritrocitarias como el porcentaje de deformaciones observadas en los hematíes frente al control negativo. Los resultados se muestran en gráficos de barras (media \pm SEM) de tres experimentos independientes analizados mediante ANOVA de dos vías, el criterio de significancia fue $\alpha < 0,05$.

6.4.3 Identificación de variables

6.4.3.1. Variables dependientes.

- ✚ Efectividad de la capacidad inhibitoria de los AV sobre el crecimiento bacteriano, en términos de diámetro del halo de inhibición.
- ✚ Diámetro del halo de inhibición medido en mm.
- ✚ La inhibición de hemólisis, determinada como la diferencia de la concentración de hemoglobina liberada (nm), frente al control positivo.
- ✚ La alteración de la morfología celular eritrocítica, determinada en porcentaje (%), mediante observación microscópica.
- ✚ La viabilidad de los linfocitos determinada en porcentaje (%), mediante recuento microscópico.

6.4.3.2. Variables independientes.

- ✚ Tipo de aceite vegetal de semillas de *M. indica*, *P. edulis*, *C. papaya*, *S. betaceum*, *R. glaucus*, *S. quitoense*, *A. muricata* y *P. guajava*.
- ✚ Tipo de cepa bacteriana (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*) de origen infeccioso y las cepas ATCC.
- ✚ Tipo de célula sanguínea (eritrocitos, linfocitos).

6.5. Consideraciones éticas

Esta investigación cuenta con el aval del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño según acta de aprobación No. 055, quien conceptuó que la propuesta de investigación cumplía con los aspectos éticos y se catalogó “de riesgo mínimo”, según lo establecido en la Resolución 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud, la Resolución No. 0068 de enero 22 de 2002 del Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible, el Manual de Bioseguridad en el laboratorio de la OMS, la guía para el transporte de sustancias infecciosas 2017-2018 de la OMS, el Manual de Normas y Procedimientos de Bioseguridad para Laboratorios de la Universidad de Nariño, el Reglamento del Comité de ética en Investigación y demás disposiciones exigidas en la declaración de Helsinki. Se explicó a los donantes el objeto de la investigación y firmaron el consentimiento informado, la donación de muestra de sangre fue voluntaria.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Adecuación y caracterización de las semillas

Los valores de peso, humedad y tamaño de las partículas molidas de las ocho clases de semillas de frutas adecuadas para la extracción de aceite se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7

Condiciones de las semillas de frutas secas

Semilla	Peso (g)	Humedad (%) ± DE*	Tamaño partículas molidas (µm)
<i>R. glaucus</i>	488	7,59± 0,08	930,92
<i>P. edulis</i>	611,5	4,13 ± 0,53	966,18
<i>C. papaya</i>	718	8,77 ± 0,39	763,99
<i>S. betaceum</i>	1.889,50	2,26 ± 0,08	939,66
<i>P. guajava</i>	1.503	4,15 ± 0,15	973,72
<i>S. quitoense</i>	1.016	4,22 ± 0,13	946,39
<i>A. muricata</i>	2.736,50	2,43 ± 0,48	1129,53
<i>M. indica</i>	604,5	5,64 ± 0,33	932,07

Fuente: este estudio.

La cantidad de cada tipo de semillas varió siendo la menor la de *R. glaucus*: 488 g y la de mayor cantidad la de *A. muricata*: 2.736,50 g, estas diferencias se debieron básicamente al tamaño de las semillas y a la posibilidad de adquisición de materia prima, este factor no afecta el rendimiento del aceite obtenido, la cantidad puede oscilar como mínimo entre 180 y 200 g. La humedad de la semilla por el contrario es un factor que influye en el rendimiento en el proceso de extracción, en este estudio los porcentajes de humedad fueron relativamente bajos, comprendidos entre el 2,26 ± 0,08 (*S. betaceum*) y 8,77 ± 0,39 (*C. papaya*), la humedad en la semilla seca contribuye al buen rendimiento del extracto (Leeke 2002), porcentajes alrededor del 8% en semillas oleaginosas garantizan la conservación de las semillas y facilitan la obtención del extracto oleoso (Bernardini

1981). Estudios previos muestran resultados de humedad más altos en comparación a los obtenidos en este estudio, estas variaciones dependen de factores intrínsecos y extrínsecos de cada semilla (variedad, tiempo de cosecha, región de procedencia, estado de la semilla, entre otros) (Hurtado et al. 2016). El porcentaje de humedad está relacionado directamente con el rendimiento, el contenido de agua en las semillas influye en las reacciones metabólicas y de deterioro microbiológico de las mismas, así, la baja concentración de humedad en las semillas secas de frutas permitió que se mantengan en estado óptimo hasta el momento de la obtención de los aceites (Londoño, Mieres-Pitre, y Hernández 2012).

El análisis granulométrico de las semillas molidas se realizó con la utilización de mallas con una apertura de tamiz de 2000, 850, 600, 425 y 212 (μ). El tamaño de las partículas recomendado para obtener mayor cantidad de aceite durante la extracción debe oscilar entre los 250 y 2000 μ m (Reverchon 2006), el tamaño en nuestras partículas osciló entre 763,99 μ m (*C. papaya*) y 1129,53 μ m (*A. muricata*), la trituration de las semillas secas se realiza con la finalidad de permitir mayor superficie de contacto entre la materia prima y el CO₂, no se recomienda utilizar partículas muy trituradas ya que pueden generar resistencia de transferencia de masa (Pereira, CG et al. 2003).

7.2 Rendimiento del aceite extraído por FSC

Una vez realizadas las extracciones, se determinó el rendimiento promedio de los aceites de cada semilla, en la Tabla 8 se indican las condiciones óptimas de las extracciones y el rendimiento. El rendimiento osciló entre $7,65 \pm 1,07$ (*M. indica*) y $20,7 \pm 1,54$ (*S. betaceum*), estos resultados en comparación a informes previos, varían dependiendo de las técnicas de extracción ya sean destilación, percolación, Soxhlet o incluso por FSC con utilización de co-solventes (Cerón et al. 2012; Cerón et al. 2016; Pantoja-Chamorro et al. 2017). La utilización de solventes orgánicos y-o

cosolventes afectan la calidad del producto, por ejemplo, los solventes orgánicos dejan residuos inherentes en los productos, disminuyendo la calidad de los mismos, esta situación no se presenta en la extracción por FSC en la cual la mayor ventaja es obtener aceites puros, libres de residuos de disolventes (B. A. Hurtado 2002; Cerón, A. F., Osorio, O., Hurtado 2012).

Tabla 8.
Rendimiento de aceite de semillas de frutas

Tipo de semilla	Condiciones de extracción		Rendimiento (% p/p) ± DE*
	P (bar)	T (°C)	
<i>S. betaceum</i>	381	64	20,7 ± 1,54
<i>P. guajava</i>	357	52	10,04 ± 0,59
<i>S. quitoense</i>	350	60	10,43 ± 0,35
<i>A. muricata</i>	381	50	14,08 ± 1,33
<i>M. indica</i>	349	65	7,65 ± 1,07
<i>P. edulis</i>	350	60	15,2 ± 1,23
<i>R. glaucus</i>	350	60	12,64 ± 0,74
<i>C. papaya</i>	381	36	12,57 ± 1,07

Fuente: este estudio.

7.3 Caracterización de los aceites de semillas

Los aceites vegetales son compuestos orgánicos fuente de energía, que se obtienen a partir de semillas u otras partes de las plantas, pertenecen a la familia de los lípidos, están formados principalmente por triglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y otros constituyentes minoritarios como tocoferoles y esteroides (Bueno Ferrer 2012). Las propiedades físicas y el aprovechamiento industrial de los aceites dependen de los constituyentes de los extractos (B. A. Hurtado 2002).

7.3.1 Esteroides y Tocoferoles

Los resultados del análisis de esteroides y tocoferoles de los AV se muestran en la Tabla 9.

El escualeno se extraía de aceite de hígado de tiburón, pero por protección a dicha especie se obtiene del aceite de oliva de la cual es un constituyente de hasta el 50% , es una fracción de gran importancia en la cosmetología gracias a su acción emoliente e hidratante (Huang, Lin, y Fang 2009). Los resultados que obtuvimos muestran que los AV de *P. edulis* (5, 61mg/mL) y *C. papaya* (5,38 mg/mL) contienen los más altos porcentajes de escualeno en comparación con *R. glaucus*, *S. quitoense*, *P. guajava*, *S. betaceum* y *M. indica* que presentaron muy bajas cantidades y *A. muricata* que no lo presenta. El escualeno naturalmente se encuentra en el cabello y secreciones sebáceas, es de gran interés cosmetológico siendo de gran utilidad en la industria dermatológica y también en la farmacéutica por ser una barrera protectora contra microorganismos (Vázquez de Frutos 2008).

Tabla 9

Esteroles y Tocoferoles de aceites de semillas de frutas

Compuesto	<i>R. glaucus</i>	<i>S. quitoense</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. guajava</i>	<i>A. muricata</i>	<i>S. betaceum</i>	<i>C. papaya</i>	<i>M. indica</i>
Concentración (mg/mL)								
Escualeno	0,92	0,9	5,61	0,52		2,87	5,38	0,13
δ - Tocoferol	0,55							
γ - Tocoferol	4,65	0,94		0,12		1,55		
α - Tocoferol	0,64	0,35					0,24	
Estigmasterol	0,68	0,56	1,24		0,72			0,01
β Sitosterol	3,08	1,74	0,95	3,59	0,66	1,33	3,18	0,02
24-Metilenciloartanol	0,96							
β Sitosterol acetato		0,68						
Dihidrolanosterol		0,63						
Cicloartenol		0,35				0,83		
Campesterol			0,3					
Lanosterol			0,5					
Sitostenona							5,03	
Esterol No identificado ⁽¹⁾		1,29						
Esterol No identificado ⁽²⁾		2,15						

Nota. Análisis de muestras por Cromatografía de Gases/ Espectrómetro de Masas (GM-MS). Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño.

Con relación a los tocoferoles conocidos como vitamina E se conocen varios isómeros como α , β , γ y δ -tocoferoles, el más abundante y con mayor actividad antioxidante es el α -tocoferol, sin embargo, en los resultados de este estudio podemos apreciar que este compuesto únicamente se identificó en las semillas de *R. glaucus*, *S. quitoense* y *C. papaya*, en bajas concentraciones (0,64; 0,35 y 0,24 mg/mL respectivamente), por su parte el γ -tocoferol se encontró en cantidad significativa en la semilla de *R. glaucus* (4,65 mg/mL), el δ -tocoferol se encontró únicamente en la semilla de *R. glaucus*, por lo tanto la semilla de esta fruta contiene en total 5,84 mg/mL de vitamina E. La importancia de esta vitamina radica en su protección frente al daño oxidativo de las membranas, por lo tanto, es de uso farmacéutico, cosmetológico y otras aplicaciones en conservación de alimentos y aditivo de piensos para ganado (Vázquez de Frutos 2008). Los Fitosteroles como β -sitosterol, campesterol y el estigmasterol, se encuentran en aceites vegetales, y no son sintetizados por el hombre, por lo que deben ser ingeridos en la dieta. El β -sitosterol uno de los compuestos más estudiados y al cual se atribuyen beneficios como reductor del colesterol sérico y por consiguiente del padecimiento de enfermedades cardiovasculares, se ha reportado también actividad osmorreguladora y actividad antiinflamatoria, en pacientes con hiperplasia prostática benigna (Rodríguez, Delgado, y Llamas 2005). Las semillas que contienen este compuesto en concentraciones considerables son *P. guajava* (3,59 mg/mL), *C. papaya* (3,18 mg/mL) y *R. glaucus* (3,08 mg/mL), las otras semillas presentan concentraciones inferiores a 2 mg/mL. Este compuesto presenta un alto poder antibacteriano pero también ha demostrado ser un estabilizador de las membranas celulares (Rashed 2020). En cuanto a la actividad antibacteriana se ha reportado inhibición contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae* con extractos de hojas de *Momordica charantia* (melón amargo), extraídos mediante el método Soxhlet (Sen et al. 2012), resultados similares fueron reportados con extractos de hexano de corteza del tallo de *Punica*

granatum (granada) frente a *Salmonella typhi* y *E. coli* con CMI muy bajas (Nweze, Ibrahim y Ndukwe 2019).

Otros compuestos caracterizados fueron: el estigmasterol obtenido en bajas concentraciones las cuales oscilan entre 0,01 mg/mL en *M. indica* y 1,24 mg/mL en *P. edulis*; el campesterol identificado únicamente en *P. edulis* (0,3 mg/mL) y la sitostenona (6 β -hydroxy-4-stigmasten-3-one) un esteroide (triterpenoide) al cual se ha atribuido la capacidad de disminuir el colesterol sérico (Wang 2017), aunque no se evidencian reportes sobre actividad antibacteriana, este compuesto se caracterizó únicamente en el aceite de semilla de *C. papaya* (5,03 mg/mL). De acuerdo al reporte de Tittikpina et al., (2018) una mezcla de β -sitosterol, estigmasterol y campesterol obtenida a partir de extractos de hojas, corteza de tronco y raíces de *Pterocarpus erinaceus*, presentó buena actividad contra bacterias Gram positivas incluyendo el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) y contra *P. aeruginosa*, con valores de CMI bajas.

7.3.2 Ácidos grasos

El principal ácido graso monoinsaturado encontrado en los extractos de semillas de frutas es el ácido oleico con porcentajes relativos que varían desde 10,68% (*R. glaucus*) hasta 63,84% (*C. papaya*) (Tabla 10), este ácido pertenece a la serie de ácidos grasos conocidos como omega-9, principal componente del aceite de oliva posee gran variedad de propiedades benéficas para la salud entre ellas: reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, antiinflamatorio, antibacteriano e inmunomodulador (Medeiros-de-Moraes et al. 2018). Otro ácido identificado fue el omega 7 o ácido palmitoleico (monoinsaturado), muy beneficioso para la piel y las mucosas (Sánchez y Segundo 2007) y se encontró presente en los aceites de *S. quitoense* (1,48%), *P. edulis* (0,21%), *A. muricata* (2,17%), *S. betaceum* (0,34%) y *C. papaya* (0,32%). El ácido graso linoleico conocido como omega 6, es un ácido graso esencial de la serie omega 6 (ω -6), es decir, el organismo

no puede crearlo y tiene que ser adquirido a través de la dieta, se encontró en alto porcentaje con valores que varían desde el 6,88% para la *C. papaya*, hasta 68,6% en el extracto de *P. guajava*, a este ácido graso se lo considera como antiobesogénico, anticancerígeno, antiaterosclerótico (den Hartigh 2019) y actividad antibacteriana (Njateng et al. 2017).

Tabla 10

Ácidos grasos de aceites de semillas de frutas

Ácidos Grasos	<i>R. glaucus</i>	<i>S. quitoense</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. guajava</i>	<i>A. muricata</i>	<i>S. betaceum</i>	<i>C. papaya</i>	<i>M. indica</i>
% Relativo								
Palmítico	5,68	12,35	16,85	12,54	26,8	11,3	23,1	13,37
Esteárico	3,1	3,82	3,81	5,17	4,23	3,94	4,72	32,94
Oleico	10,68	17,54	19,75	12,97	34,36	22,62	63,84	42,43
Linoleico	50,02	62,95	58,91	68,6	30,7	58,72	6,88	8,31
Linolénico	29,84	1,84	0,47	0,35	1,3	2,73	0,26	1,36
Eicosenoico	0,69			0,36	0,45	0,36	0,39	1,59
Palmitoleico		1,48	0,21		2,17	0,34	0,32	
11 – Eicosenoico							0,48	

Nota. Análisis de muestras por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC-MS). Laboratorio de Cromatografía de la Universidad de Nariño.

Al ácido linoleico se ha atribuido la acción bactericida de bacterias Gram positivas, basados en el reporte de la investigación realizada en jabones con alto contenido de este compuesto y en la que se demostró la capacidad de inhibir el desarrollo de *Staphylococcus* spp (Jang et al. 2016). El ácido Linolénico un ácido graso de la serie omega 3 (poliinsaturado), se encontró en bajo porcentaje en *S. quitoense*, *P. edulis*, *P. guajava*, *A. muricata*, *S. betaceum*, *C. papaya* y *M. indica* variando desde 0,35 hasta 2,73%, en *R. glaucus* se obtuvo una alta concentración de 29,84%, este ácido presenta propiedades biológicas como actividad antibacteriana y antifúngica (Jalalvand et al. 2019). Entre los ácidos saturados el palmítico presentó valores que variaron desde 5,68% (*R. glaucus*) hasta 26,8% en *A. muricata*, por su parte el ácido esteárico presentó un porcentaje alto en el aceite de *M. indica*

con 32,94% y porcentajes bajos en *R. glaucus*, *S. quitoense*, *P. edulis*, *P. guajava*, *A. muricata*, *S. betaceum* y *C. papaya* (3,1; 3,82; 3,81; 5,17; 4,23; 3,94; 4,72% respectivamente) y, el ácido eicosenoico se identificó en 6 de los aceites de semillas excepto en *S. quitoense* y *P. edulis*, con porcentajes bajos que variaron desde 0,36 (*P. guajava*, *S. betaceum*) hasta 1,59% (*M. indica*).

7.4 Determinación de la actividad antibacteriana de los AV de semillas de frutas

7.4.1 Prueba difusión con sensidiscos en placa de Petri

Los ensayos cualitativos de difusión en agar con sensidiscos se utilizaron como base para seleccionar los AV de semillas a los cuales se realizó la prueba cuantitativa y confirmatoria para determinar la CMI.

No se evidenciaron diferencias significativas entre los halos obtenidos con respecto a los diferentes volúmenes (20, 30 y 40 μ L) de los AV evaluados para los ensayos con *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

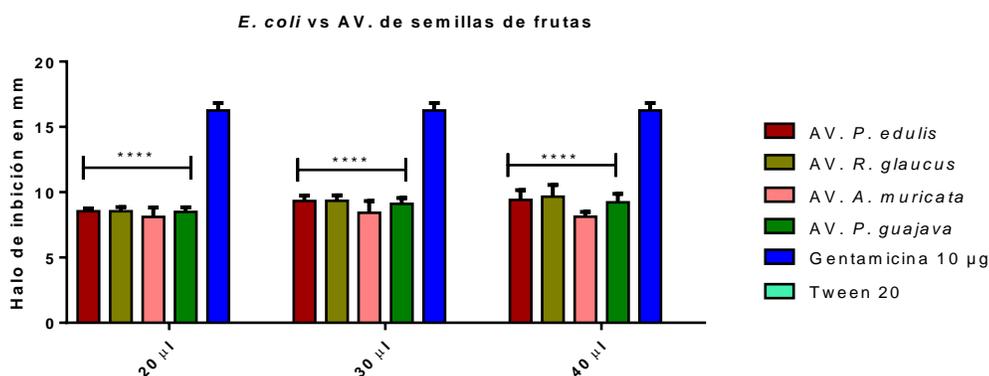
Los AV de frutas evaluadas demostraron resultados promisorios como inhibidores de bacterias Gram negativas, por ejemplo, para *E. coli* (ATCC 25922) cuatro de los ocho AV presentaron una débil inhibición contra esta cepa bacteriana: *P. edulis*, *R. glaucus*, *A. muricata* y *P. guajava* como se aprecia en la Figura 11.

Estos resultados coinciden con investigaciones previas con Rosáceas, donde reportaron que una fracción fina de semilla de *Rubus chamaemorus* mostró una inhibición significativa frente a *E. coli* (Puupponen-Pimiä et al. 2016), sin embargo, existen investigaciones en las cuales no se evidenció actividad inhibitoria frente a esta bacteria, por ejemplo con anonáceas, extractos acuosos y etanólicos de cáscara de *Annona muricata* no presentaron inhibición contra *E. coli* (Gopalakrishnan,

Doriya, y Kumar 2016), de igual manera estudios realizados con aceites esenciales y extractos de metanol, hexano y acetato de etilo de las hojas de *P. guajava*, probados contra bacterias causantes de diarrea: *S. aureus*, *Salmonella* spp. y *E. coli*, reportaron actividad inhibitoria únicamente frente a *S. aureus* y *Salmonella* spp, pero no contra *E. coli* (Gonçalves et al. 2008). En pasifloras, ensayos realizados con cuatro especies de maracuyá (*Passiflora alata*, *P. foetida*, *P. pohlii* y *P. suberosa*) frente a cinco cepas diferentes de *E. coli*, utilizando extractos de raíces y de hojas, igualmente no presentaron actividad antibacteriana (Ponzilacqua et al. 2018).

Figura 6

Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre *E. coli*



Nota. Acción inhibitoria de AV de semillas de *P. edulis*, *R. glaucus*, *P. guajava* y *A. muricata* sobre *E. coli* (ATCC 25922). Cuatro de ocho aceites evaluados presentaron halos de inhibición entre 7 y 11 mm y diferencias estadísticas significativas en comparación con el control negativo (Tween 20) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, **** $p \leq 0,0001$ por test de Dunnett.

Si bien en los resultados de este estudio se presentó una inhibición de los cuatro AV puros frente a *E. coli* (ATCC 25922), el porcentaje del diámetro del halo de inhibición de los aceites con relación al control positivo (CN10: 16,69 mm, 15,61 mm, 16,47 mm) apenas superó el 50% (*P.*

edulis: 55,9%, *R. glaucus* 56,4%, *A. muricata* 50,6% y *P. guajava* 55%), esto nos da a comprender que dichos aceites presentan una baja actividad antibacteriana y que como presentaremos en las pruebas de CMI serán requeridas concentraciones altas de estos aceites para lograr la inhibición del 100% de la bacteria.

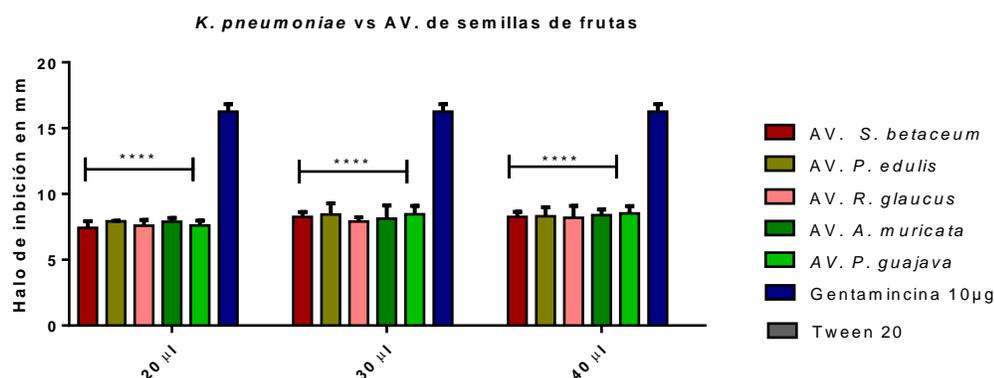
Cinco AV presentaron inhibición sobre *K. pneumoniae* (ATCC 13883): *S. betaceum*, *P. edulis*, *R. glaucus*, *A. muricata* y *P. guajava* como se muestra en la Figura 12. Algunos trabajos de investigación previos coinciden con estos resultados frente a *K. pneumoniae*; sin embargo, aunque se trate de la misma familia de las plantas frutales ellos difieren en cuanto a la especie, tecnología de extracción y partes de la planta utilizadas, por ejemplo: los reportes de Pinto et al. (2017) y Dolab et al. (2018), quienes obtuvieron extractos metanólicos y con hexano, respectivamente, a partir de hojas de anonáceas (*A. squamosa* y *A. emarginata*), demostraron una significativa actividad antibacteriana contra esta bacteria en particular. Con rosáceas, tres tipos de extractos de etanol de fresa (*Rubus corchorifolius*, *Rubus parvifolius* L. var. *Parvifolius* y *Duchesnea chrysantha* Miq.), se probaron frente a *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, presentaron un alto contenido fenólico y demostraron una buena actividad inhibitoria frente a las tres bacterias (Seleshe et al. 2017). A partir de semillas de guayaba (*P. guajava*) de la familia de las Myrtaceae se aisló el péptido recombinante Pg-AMP1, el cual demostró poseer una alta capacidad de inhibir varias bacterias Gram negativas, entre ellas *K. pneumoniae* (Tavares et al. 2012). Con Solanaceas la actividad antibacteriana se investigó a partir de extractos crudos del tallo de *S. mauritianum*, presentando una actividad inhibitoria muy significativa contra varias bacterias Gram positivas y Gram negativas incluida *K. pneumoniae* (Uche-Okerefor et al. 2019).

Estos reportes entre otros validan los resultados sobre la actividad antibacteriana de los AV de frutas reportados en este estudio, sin embargo al igual que con *E. coli*, los porcentajes de inhibición

con relación al control positivo (CN10: 16,1 mm, 16,16 mm, 16,48 mm), se encuentran al rededor del 50%, *S. betaceum* 49,1%, *P. edulis* 50,6%, *R. glaucus* 48,6%, *A. muricata* 50%, *P. guajava* 50,4%, se concluye que se requieren diluciones muy bajas para la determinación de la CMI.

Figura 7

Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre *K. pneumoniae*



Nota. Acción inhibitoria de AV de semillas de *S. betaceum*, *P. guajava*, *A. muricata*, *P. edulis* y *R. glaucus* sobre *K. pneumoniae* (ATCC 13883). Los aceites evaluados presentaron halos de inhibición entre 6,85 y 9,29 mm y diferencias estadísticas significativas en comparación con el control negativo (Tween 20) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, **** $p \leq 0,0001$ por test de Dunnett.

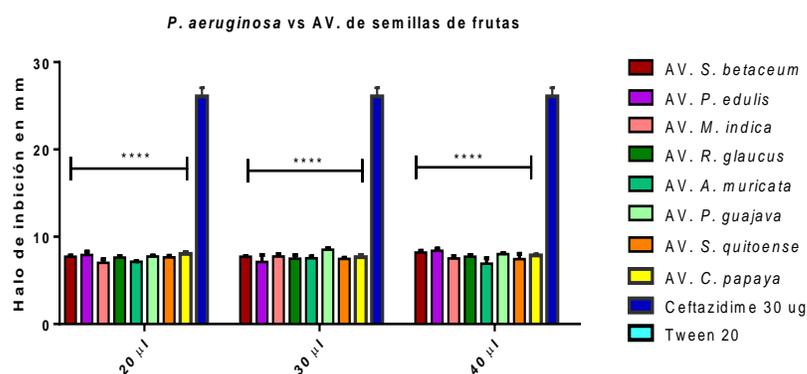
En los ensayos contra *P. aeruginosa* (ATCC 13883), los ocho AV causaron inhibición sobre la *P. aeruginosa*, estos resultados coinciden con los reportes de Cai et al., (2012), quienes reportaron que en una rosácea el aceite volátil de las hojas de *Rubus parvifolius* presenta actividad antibacteriana no solamente frente a *P. aeruginosa* sino también contra *E. coli* y *K. pneumoniae*. El trabajo con pasifloráceas de Perry, et al. (1991) concluyó que el 4-Hydroxy-2-cyclopentano identificado en el extracto de hoja de *Passiflora tetrandra* es el responsable de la actividad antibacterial frente a *P. aeruginosa* y *E. coli*. Con respecto a la Anacardiácea, *Mangifera indica* se reportó una débil actividad antibacteriana de los extractos metanólicos extraídos de las partes aéreas

de la planta contra *P. aeruginosa* (Cheruiyot, Olila, y Kateregga 2009). Contrario a estos reportes de investigación, encontramos que, en las Caricáceas, a partir del látex del fruto de *Carica papaya* se obtuvo una endopeptidasa conocida como Papaína, de la cual se extrajo un derivado de arginina (Bz-Arg-NHC12), este compuesto fue utilizado para valorar la actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa*, entre otras bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos, sin obtener resultados antibacterianos (Fait et al. 2012).

En ensayos realizados para *P. aeruginosa* (ATCC 27853), los porcentajes de inhibición obtenidos, con relación al control positivo (CAZ30), aun cuando los ocho AV de semillas presentaron actividad antibacteriana, los halos presentaron muy bajo diámetro en comparación con el diámetro del halo de inhibición del Ceftazidime el cual fue muy amplio en las tres replicas (25,31 mm, 25,75 mm. 27,19 mm) en comparación con los halos de inhibición de los AV, por lo tanto el porcentaje de inhibición con relación al control positivo es de alrededor del 30%, como se puede observar en la Figura 13; sin embargo, aunque no sobrepasaron el 50% con relación al control positivo, se decidió realizar la prueba cuantitativa de la CMI para determinar la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la *P. aeruginosa*.

Figura 8

Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre P. aeruginosa



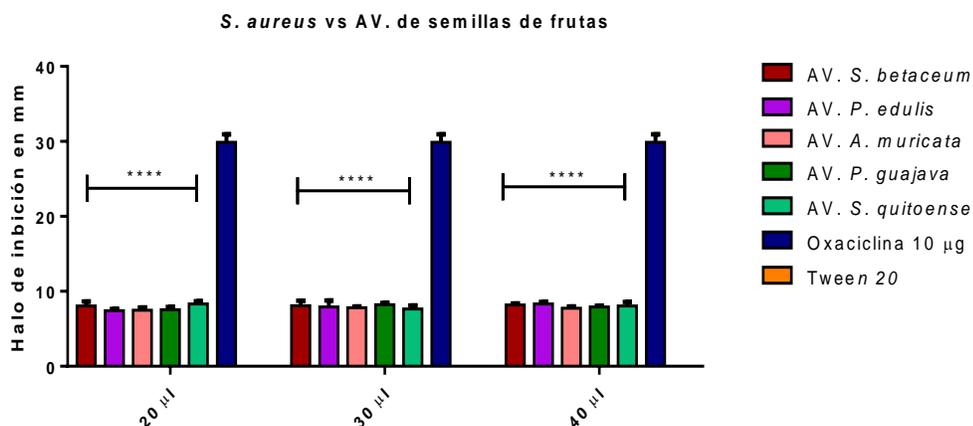
Nota. Acción inhibitoria de ocho AV de semillas de las frutas sobre *P. aeruginosa* (ATCC 27853). Se observaron halos de inhibición entre 6.23 y 8.67 mm y diferencias estadísticas significativas en comparación con el control negativo (Tween 20) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, n = 3, **** p \leq 0,0001 por test de Dunnett.

Los resultados obtenidos en esta investigación con bacterias Gram positivas, no presentaron diferencias significativas entre los halos obtenidos con respecto a los diferentes volúmenes de AV evaluados tanto para *S. aureus* (ATCC 25923) como para *E. faecalis* (ATCC 29212).

Los AV de semillas *C. papaya* y *M. indica* no evidenciaron inhibición in vitro de *S. aureus*, observar resultados en la Figura 14.

Figura 9

Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre S. aureus

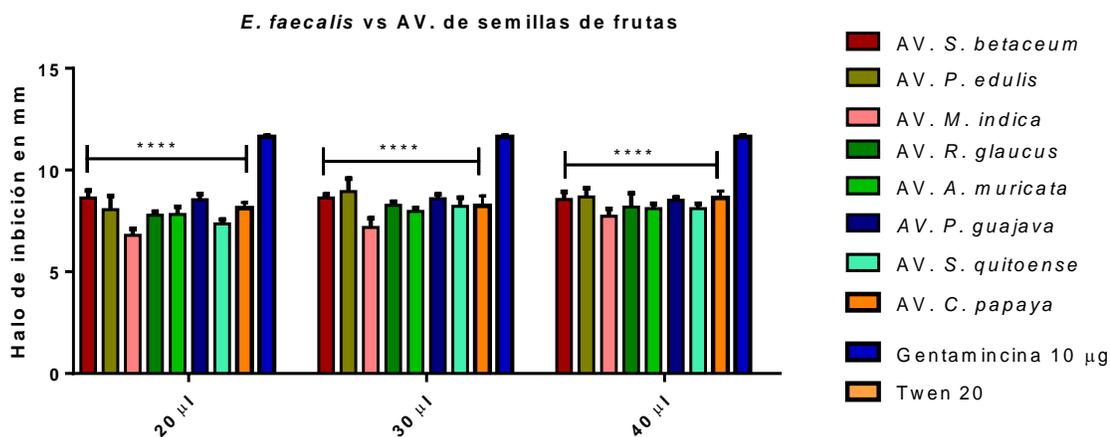


Nota. Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre *S. aureus* (ATCC 225923). Se observaron halos de inhibición entre 7.06 y 8.87 mm y diferencias estadísticas significativas en comparación con el control negativo (Tween 20) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, n = 3, **** p \leq 0,0001 por test de Dunnett.

Los ocho AV de las semillas de frutas presentaron actividad inhibitoria sobre *E. faecalis* (ATCC 29212), como se aprecia en la Figura 15.

Figura 10

Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre E. faecalis



Nota. Acción inhibitoria de AV de semillas de las frutas sobre *E. faecalis* (ATCC 29212). Se observaron halos de inhibición entre 6.59 y 9.42 mm y diferencias estadísticas significativas en comparación con el control negativo (Tween 20) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, $n = 3$, **** $p \leq 0,0001$ por test de Dunnett.

Jang et al. (2016), atribuyeron la actividad bactericida al ácido Linoleico frente a *Staphylococcus* spp., en el presente estudio de acuerdo a la caracterización de los aceites de semillas, este ácido graso en particular fue identificado en mayor porcentaje, entre el 30,7% y el 68,7% en los extractos de semillas de *A. muricata*, *R. glaucus*, *S. betaceum*, *P. edulis*, *S. quitoense* y *P. guajava*. De similar manera, Ivanova et al., (2017) en estudios realizados en la epicutícula de las alas de los insectos descubrieron que ácidos grasos como el palmítico y esteárico son los componentes principales y, fueron los responsables de la actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en dicho trabajo se propone que podrían ser utilizados como revestimientos bactericidas naturales; estos ácidos fueron encontrados presentes en todos los AV de las semillas de frutas analizados en el presente trabajo ver tabla 11. Choi (2016), demostró que el ácido Linolénico es un potente inhibidor del crecimiento

de *Mycobacterium tuberculosis*, con un tratamiento y con una CMI de 200 µg/mL este aporte es muy importante teniendo en cuenta que en especial esta bacteria es de difícil control terapéutico, siendo considerada como multidroresistente y continúan reportándose casos nuevos en casi todo el mundo (Abbate et al. 2007). Adicionalmente el ácido Linoleico también se identificó en todos los AV de semillas de las ocho frutas, presentando un mayor porcentaje en el aceite de semilla de *R. glaucus* (29,84%). De esta manera, podemos inferir que los AV de semillas de las ocho frutas analizadas en esta investigación presentan una mezcla importante de varias sustancias lipídicas que en conjunto potencializan su actividad antibacteriana.

Cabe resaltar que este trabajo con aceites de semillas de frutas extraídos por FSC, no tiene precedente en la literatura revisada. La variabilidad de los resultados depende de la parte de la planta empleada en la obtención de los extractos, la clase de extracto que se obtenga, la tecnología de extracción que en la mayoría de casos incluye la utilización de cosolventes, los procedimientos experimentales, los componentes del extracto (alcaloides, flavonoides, saponinas, compuestos cianogénicos, carotenoides, otros) y la diversidad en las propiedades de cada uno, entre otros (Li et al. 2011).

Adicional a la metodología cualitativa de difusión en agar con sensidiscos se realizaron ensayos con la técnica de agar perforado, sin embargo, no obtuvimos resultados satisfactorios, en todas las pruebas realizadas no se evidenciaron zonas de inhibición con ninguno de los ocho AV de semillas de frutas en comparación con el control positivo (CN 160 mg/2mL) el cual presento halos mayores a 17 mm. En dichos ensayos se realizaron pruebas cambiando algunas variables del procedimiento como la sustitución del Tween 20 por Tween 80, con el objetivo de favorecer la difusión de los AV los cuales permanecieron en el pozo sin evidenciarse difusión, también se ensayó con el incremento del tiempo de incubación de 20 a 24 horas a una temperatura de 37 °C, los ensayos se realizaron con

las mismas cantidades de AV utilizadas en el ensayo de difusión en agar (20, 30 y 40 µL), sin embargo, no se obtuvieron resultados inhibitorios. Resultados similares reporta Ferreira et al., (2011), tras dispensar 0,1 mL de extractos de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart.), buriti (*Mauritia flexuosa*) y maracuyá (*P.edulis*), en pozos de 5 mm de diametro, no observaron zonas de inhibición frente a cepas de *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. La actividad antibacteriana puede ser determinada por varios métodos, la selección de estos depende de las características de las sustancias a ser evaluadas, la cantidad, la finalidad, los costos, entre otros. El método de difusión en agar perforado está recomendado para valorar sustancias o extractos acuosos los cuales pueden difundir fácilmente en el agar (Valgas et al. 2007), para valorar sustancias oleosas estas se deben diluir en DMSO o adicionar al medio algún tenso activo (Tween 20 - 80) para permitir la difusión (Argote- Vega et al. 2017). Por su parte, la técnica de difusión en agar con sensidiscos a pesar de presentar varias desventajas entre ellas la constitución del papel filtro Whatman, compuesto por celulosa y grupos hidroxilo libres, confieren la característica hidrofílica al papel, esta característica le permite absorber compuestos catiónicos de los extractos vegetales impidiendo la difusión libre en el agar, sin embargo con los compuestos apolares (aceites) los grupos hidroxilos no reaccionan permitiendo una libre difusión en la superficie del agar (Ramirez y Castaño 2009).

7.4.2 Efecto de los AV sobre bacterias de origen clínico

Las pruebas realizadas con cepas resistentes, donadas por la Clínica Profesionales de la Salud - Proinsalud S.A. (Pasto, Nariño): *S. aureus* resistente a Amoxicilina/ácido Clavulanato, Ampicilina/Sulbactam, Ampicilina, Cefazolina, Oxacilina, Penicilina, ; *P. aeruginosa* resistente a Aztreonam, Cefepime, Imipenem, Meropenem, Piperaciclina/Tazobactam; *E. coli* resistente a Acido Nalidixico, Ampicilina, Aztreonam y a las Cefalosporinas (productora de Betalactamasa de Amplio

Espectro), utilizando las tres cantidades (20, 30 y 40 μL) de AV no presentaron zonas de inhibición, las tres cepas fueron resistentes a los ocho AV, por este motivo, no se procedió a determinar la CMI. Resultados similares fueron reportados con extractos etanólicos de *C. papaya* los cuales no mostraron ninguna zona de inhibición contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae* procedentes de un centro de investigación de Enfermedades Diarreicas, Bangladesh (Liya y Siddique 2018). La incidencia de bacterias Gram negativas multidrogoresistentes (MDR) se ha incrementado especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI), generando un aumento en la mortalidad de los pacientes por la resistencia a los antibióticos tradicionales, varios de estos casos asociados a un inapropiado tratamiento antimicrobiano (Paramythiotou y Routsis 2016). Este tipo de bacterias requieren para ser controladas la acción de fármacos cada vez más fuertes, en mayor concentración o la combinación entre ellos, en este sentido, la multiresistencia genera que las infecciones sean cada vez más complicadas y las opciones de tratamiento más limitadas (Al-Gethamy et al. 2017).

7.4.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los resultados de la Tabla 11, presentan la concentración mínima de cada AV de semillas capaz de inhibir el crecimiento visible de las cepas bacterianas, la mayoría de los AV lograron controlar el crecimiento bacteriano de las cinco bacterias analizadas (CMI 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$), únicamente el AV de semilla de *C. papaya* y *P. guajava* frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* respectivamente presentan una CMI de 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y, una CMI de 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de los AV de semillas de *M. indica* y *S. quitoense* sobre *P. aeruginosa*, de los AV de *S. quitoense* y *P. guajava* sobre *S. aureus* y finalmente, AV de *S. quitoense* y *C. papaya* sobre *E. faecalis*.

Tabla 11

Concentración Mínima Inhibitoria de los AV de semillas de frutas.

Cepas Bacterianas	<i>P.</i> <i>edulis</i>	<i>R. glaucus</i>	<i>A.</i> <i>muricata</i>	<i>P. guajava</i>	<i>S.</i> <i>betaceum</i>	<i>C. papaya</i>	<i>M. indica</i>	<i>S.</i> <i>quitoense</i>
	CMI (µl/mL)							
<i>E. coli</i> ATCC 25922	900	900	900	900	*	*	*	*
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	900	900	900	750	900	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	900	900	900	900	900	750	500	500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	900	*	900	500	900	*	*	500
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	900	900	900	900	900	500	*	500

Nota. CMI: Concentración mínima inhibitoria, *Prueba de difusión en placa no presentó halos de inhibición descartando la realización de este análisis.

En la Figura 16, se muestran los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) realizada con los ocho AV sobre las bacterias: *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.

Tabla 12

Concentración Mínima Bactericida de AV de semillas de frutas.

Cepas Bacterianas	<i>P. edulis</i>	<i>R. glaucus</i>	<i>A. muricata</i>	<i>P. guajava</i>	<i>S. betaceum</i>	<i>C. papaya</i>	<i>M. indica</i>	<i>S. quitoense</i>
CMB ($\mu\text{L/mL}$)								
<i>E. coli</i> ATCC 25922	900	900	900	900	*	*	*	*
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	900	900	900	750	900	*	*	*
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	**	900	900	900	900	900	750	750
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	900	*	900	900	900	*	*	900
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	900	900	**	900	900	900	*	900

Nota. CMB: Concentración mínima bactericida, *No se realizó la prueba. **Se presentó crecimiento en la dilución más alta. Con rojo se indica la diferencia en valores obtenidos para la CMB con relación a la CMI de la tabla 11.

Tras la obtención de estas dos determinaciones (CMI y CMB) se puede inferir lo siguiente:

- En términos generales la CMI y CMB demuestran un bajo potencial bactericida de los AV de semillas; esto coincide con los resultados de la prueba de difusión en agar en la cual se registraron halos de inhibición de diámetro pequeño, resultados similares a los obtenidos con aceites de semillas de *Opuntia stricta*, frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Koubaa et al. 2017).
- Resultados similares se obtuvo tanto para la CMI y CMB (900 $\mu\text{L/mL}$) de los AV de semillas de *P. edulis*, *R. glaucus*, *A. muricata* y *P. guajava* sobre *E. coli* (Anexo 12.1). Estos resultados coinciden con los reportes de inhibición de extractos alcohólicos de

hojas de *P. guajava* frente a bacterias Gram positivas y negativas utilizando el método de difusión en agar obteniendo halos de inhibición con un diámetro menor al 50% con relación al control positivo (Martínez, Molina, y Boucourt 1997). Reportes diferentes se obtuvieron con extracto hidrometanólico de semillas, cascara y pulpa de *R. glaucus* los cuales presentaron un alto poder inhibitorio sobre *S. aureus* y *E. coli*, requiriéndose una baja CMI (Grande-Tovar et al. 2021).

- En los ensayos de inhibición de AV de semillas frente a *K. pneumoniae* se determinó que la CMI y CMB es del 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ tanto para *P. edulis*, *R. glaucus*, *A. muricata* y *S. betaceum*. Por su parte el aceite de semilla de *P. guajava* demostró una CMI y CMB del 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Anexo 12.2). Reportes de extractos etanólicos de semillas de *P. edulis* con alta actividad bacteriostática frente a *K. pneumoniae* se asoció con la abundancia de metabolitos secundarios y otros compuestos bioactivos (Sabogal-Palma et al. 2016). Pinto, et al. (2017) reportaron que el extracto metanólico de hojas de Anonaceas (*A. squamosa*) mostró una actividad antibacteriana significativa contra *K. pneumoniae* por desestabilización de la membrana bacteriana.
- En la prueba con aceites de semillas de *R. glaucus*, *A. muricata*, *P. guajava*, y *S. betaceum* sobre *P. aeruginosa* tanto la CMI como la CMB fue de 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para cada aceite. *P. edulis* presentó CMI 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la prueba confirmatoria en placa en esta dilución se observó crecimiento bacteriano. Por su parte los aceites de semillas de *C. papaya*, *M. indica* y *S. quitoense* sobre esta bacteria Gram negativa la CMI fue 750,

500 y 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente, en diferencia con la CMB de 900, 750 y 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$, en su orden (Anexo 12.3).

Niño, et al, (2009) presentaron resultados de actividad antibacteriana de alcaloides (solasodina) obtenidos *S. leucocarpum* frente a *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*, siendo más efectiva contra esta última. Cai, et al.,(2012), en *Rubus parvifolius L.* reportaron que el aceite volátil de las hojas presenta actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa*, *E. coli* y *K. pneumoniae*. Perry, et al. (1991) reportaron que el 4-Hydroxy-2-cyclopentano de extractos de hoja de *Passiflora tetrandra* es el responsable de la actividad antibacterial frente a *P. aeruginosa* y *E. coli*.

- Los aceites de semilla de *P. edulis*, *A. muricata* y *S. betaceum* frente a *S. aureus* presentaron una CMI y CMB al 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cada aceite. *P. guajava*, presento CMI de 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aceite y una CMB de 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$. El aceite de semilla de *S. quitoense* presentó una CMI 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y CMB de 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de este aceite (Anexo 12.4). Reportes similares de actividad antibacteriana se registran con extractos obtenidos a partir de corteza de tallo de *A. purpurea* sobre *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Jiménez Contreras, A.P., Támara Román 2018), cabe resaltar que no se ha encontrado literatura sobre actividad inhibitoria con extractos similares a los utilizados en este trabajo.
- Los aceites de semillas de *P. edulis*, *R. glaucus*, *P. guajava* y *S. betaceum* presentaron CMI y CMB 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de estos aceites sobre *E. faecalis* con aceite de *A. muricata* la CMI 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aceite, y no se logró determinar la CMB ya que aun en esta dilución se observó crecimiento bacteriano en caja Petri. Los aceites de *C. papaya* y *S. quitoense* presentaron de manera similar una CMI 500 y CMB 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Anexo 12.5). Trabajos realizados con extractos hidro-fenólicos obtenidos de pulpa de *A.*

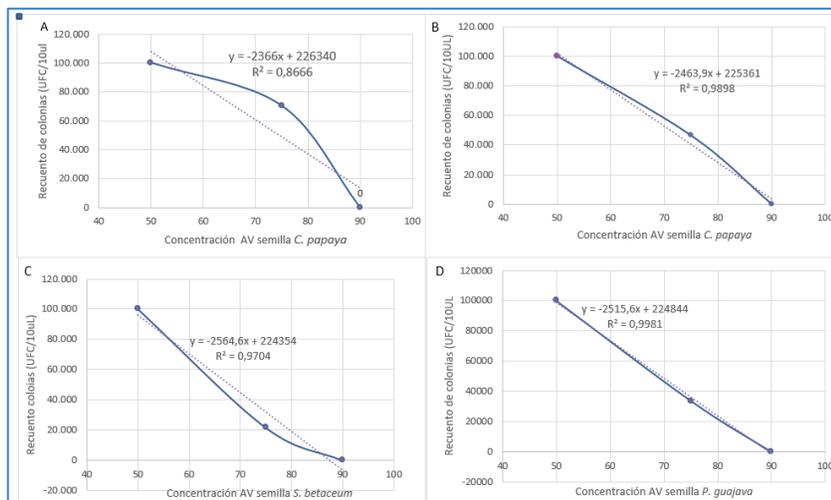
muricata reportaron actividad bacteriostática baja sobre *E. faecalis*, con relación al control positivo de la prueba (León-Fernández et al. 2009), similar a lo obtenido en la presente investigación.

7.4.5 Determinación de la concentración efectiva 50 (CE50)

De igual manera se determinó la Concentración Efectiva 50 (CE50), definida como la concentración necesaria de AV de semillas que se estima afecta al 50% de la población bacteriana inoculada. La CE50 se obtuvo por regresión lineal (Figura 17), se escogió este método teniendo en cuenta los reportes de comparaciones realizadas entre los métodos de regresión lineal, regresión no lineal y prueba Probit, determinando que este último estuvo muy lejano a lo observado experimentalmente (Molina-Vargas y Melo-Martínez 2010). De todos los ensayos realizados con los ocho AV de semillas y las cinco cepas bacterianas, únicamente se determinó en los ensayos cuya prueba confirmatoria se obtuviera un recuento intermedio entre cero y 100.000 UFC/10 μ L, con estos tres valores se aplicó la regresión lineal. Bajo este criterio, los ensayos que aplicaron fueron: AV semilla de *C. papaya* sobre *P. aeruginosa*, obteniendo una CE50 de 745,0 μ L/mL, aceite de *S. betaceum* y *P. guajava* sobre *S. aureus* resultando una CE50 de 680,0 y 695,0 μ L/mL respectivamente y finalmente, aceite de *C. papaya* sobre *E. faecalis* CE50 712,0 μ L/mL.

Figura 12

Concentración efectiva 50 (CE50) por regresión lineal



Nota. Recuento de colonias tras incubación en placa de Petri, de tres replicas realizadas.

(A) AV *C. papaya*/ *P. aeruginosa*, (B) AV *C. papaya*/ *E. faecalis*, (C) AV *S.*

betaceum/*S. aureus*, (D) AV *P. guajava*/ *S. aureus*.

Teniendo en cuenta los argumentos de Molina-Vargas (2010) los resultados sobre la CE50 obtenidos por regresión lineal aplican toda vez que la variable concentración del AV sobre un microorganismo, corresponden a una variable continua.

El aceite de semilla de *P. guajava* presentó la mejor respuesta antibacteriana con relación a los otros aceites evaluados, inhibió las tres bacterias Gram negativas y las dos Gram positivas como se indica en la tabla 13, este aceite presenta alto porcentaje de ácido Linoleico (68,6%), ácido palmítico y ácido esteárico, en menores concentraciones (ver tabla 10). Los aceites de *A. muricata*, *R. glaucus*, *P. edulis* y *S. betaceum* presentaron actividad antibacteriana frente a cuatro de las cinco cepas

evaluadas, como característica común en la composición de estos AV de semillas se encuentra la alta concentración del ácido linoleico (30,7; 50,02; 58,91; 58,72% respectivamente (ver tabla 10).

Tabla 133

Respuesta bacteriana frente a los AV de semillas de frutas

A. Semillas	Cepas bacterianas				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
<i>P. guajava</i>	S	S	S	S	S
<i>A. muricata</i>	S	S	S	S	R
<i>R. glaucus</i>	S	S	S	R	S
<i>P. edulis</i>	S	S	R	S	S
<i>S.</i> <i>betaceum</i>	R	S	S	S	S
<i>S.</i> <i>quitoense</i>	R	R	S	S	S
<i>C. papaya</i>	R	R	S	R	S
<i>M. indica</i>	R	R	S	R	R

Fuente: este estudio. S: sensible; R: resistente.

Esta característica no define que el ácido linoleico sea en si el agente inhibidor, los ensayos realizados no permiten dar por hecho esta propiedad, además, estudios realizados con extractos de semillas de *Cuminum cyminum* revelan que en su estudio la actividad bactericida se relacionó con la alta concentración de ácido petroselinico, un isómero del ácido oleico (Merah et al. 2020). El aceite de *S. quitoense* presentó inhibición de crecimiento sobre tres cepas bacterianas, la concentración de ácido Linoleico fue de 62,95%.

El aceite de semilla de *C. papaya* inhibió únicamente dos cepas y el aceite de semilla de *M. indica* solo una, las concentraciones de ácido linoleico fueron de 6,88% y 8,31% respectivamente, las más bajas de los ocho aceites (Tabla 10). El ácido linoleico (9-cis, 12cis) forma parte de los ácidos grasos polinsaturados posee dos dobles enlaces en su cadena hidrocarbonada (León-Sánchez et al. 2014), es conocido como omega 6, y considerado un aceite esencial que debe ser suministrado en la

dieta alimentaria, se encuentra en la mayoría de aceites de origen vegetal como el de oliva, de palma y de coco, en menores concentraciones en carnes y lácteos (Sanhueza, J., Nieto y Valenzuela 2002). Esto se puede explicar teniendo en cuenta que los aceites esenciales pueden actuar como desacopladores e interferir en la translocación de protones sobre la membrana e interrumpir la fosforilación del ADP (Cano, C., Bonilla, Roque, y Ruiz 2008). También se ha planteado que la acción bactericida está relacionada con los compuestos oxigenados presentes en los aceites esenciales (Maguna et al. 2006), sin embargo, estos no se encuentran en los AV de semilla evaluados.

En la presente investigación se utilizaron los aceites vegetales totales de cada semilla, cada uno de los cuales se representa como una mezcla compleja de diferentes compuestos (Tablas 9 y 10), los ensayos realizados no permiten confirmar que la presencia de ácido linoleico o cualquier otro compuesto de manera individual sea el causante de la actividad antibacteriana, la acción observada es producto de la acción sinérgica de todos los compuestos del AV. Si en un futuro se desea establecer el aporte de cada compuesto a la actividad evaluada, se deben realizar pruebas complementarias como la técnica de bioautografía por cromatografía de capa, para identificar el compuesto implicado en dicho proceso inhibitorio (Sánchez García, Castillo Hernández, y García Palencia 2016).

Por su parte, los aceites de *C. papaya* y *M. indica* que no presentaron buena actividad bactericida, son aceites que a temperatura ambiente tienen apariencia de cera, motivo por el cual, para realizar las diluciones se trabajaron a 37°C. Esta característica física de los dos aceites puede no ser la causa de la ausencia de actividad antibacteriana frente a la mayoría de bacterias evaluadas ya que existen reportes de actividad inhibitoria del extracto alcohólico de semilla de mango tailandés reportado por Jiamboonsri et al., (2011) frente a cepas de *S. aureus* meticilino resistente (MRSA).

Sin embargo, a efecto de sustentar nuestros resultados debemos resaltar que, el extracto obtenido por Jiamboonsri y colaboradores se obtuvo tras la homogenización con etanol, desengrasado con hexano y diluido con DMSO. Por otra parte, se debe tener en cuenta la estructura de los microorganismos como tal, las bacterias Gram negativas presentan varios factores de resistencia: uno de ellos la membrana externa, compuesta por un alto contenido de lipopolisacáridos de característica lipofílica que actúa como una barrera que inhibe o retarda la entrada de macromoléculas permitiendo mayor tolerancia a los compuestos hidrófobos (Okoh et al. 2016). Otra forma de resistencia, podría ser la presencia de bombas de reflujos, las cuales expulsan toxinas anfipáticas a través de la membrana externa incrementando la impermeabilidad ante el agente antimicrobiano evitando que este llegue a su blanco, generando un incremento en la resistencia antibiótica (Garedew, Schmolz, y Lamprecht 2004). Finalmente, las bacterias *K. pneumoniae* y *S. aureus* presentan externamente una capsula protectora (López Vargas y Echeverri Toro 2010), formada por polisacáridos excretados por la célula, la cual impide la fagocitosis, adherencia a superficies e impide el paso libre de sustancias hacia el interior de la bacteria (M. P. Hurtado, De la Parte, y Brito 2002). En lo referente a la composición de los aceites de semillas de estas dos frutas (Tabla 9 y 10) teniendo en cuenta el método de extracción de estos aceites, se debe enfatizar que, la variabilidad en la composición de estas mezclas complejas, determinarán la variación en los efectos biológicos (Bettaieb et al. 2011), el poder de inhibición está ligado a la capacidad de formar complejos con la estructura externa bacteriana y la capacidad de inactivar adhesinas microbianas, enzimas y proteínas de transporte (Cruz et al. 2001).

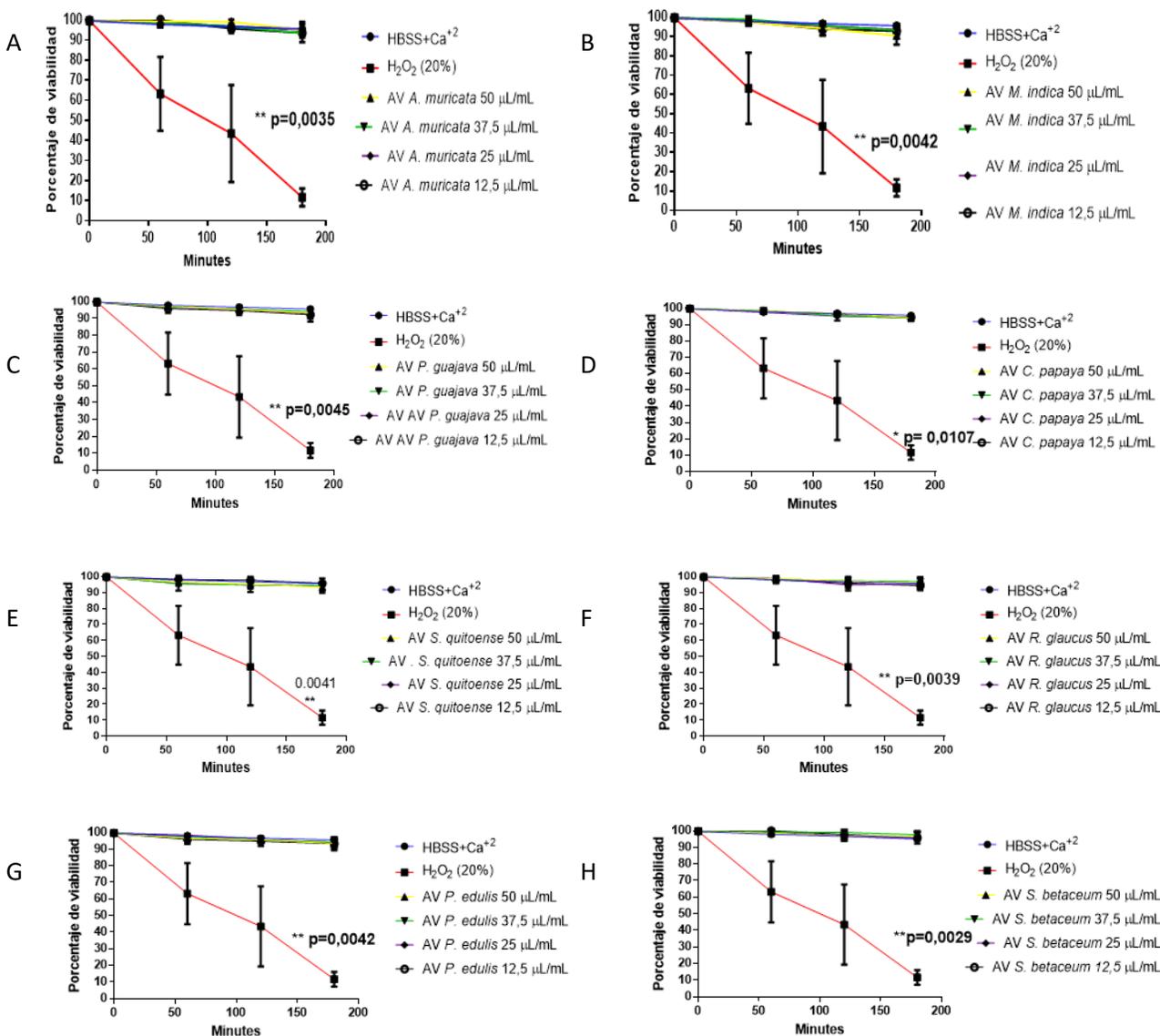
7.5. Evaluación de la actividad citotóxica de los AV de semillas de frutas

7.5.1 Viabilidad de linfocitos humanos

En la Figura 18 se muestran los resultados de los linfocitos frente a los AV, en los cuales el porcentaje de viabilidad fue superior al 90% en las diluciones empleadas: 12,5; 25; 37,5 y 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

Figura 18

Porcentaje de viabilidad de linfocitos vs AV de semillas de frutas



Nota. Análisis microscópico de viabilidad de linfocitos humanos en diluciones desde 12,5 hasta 50

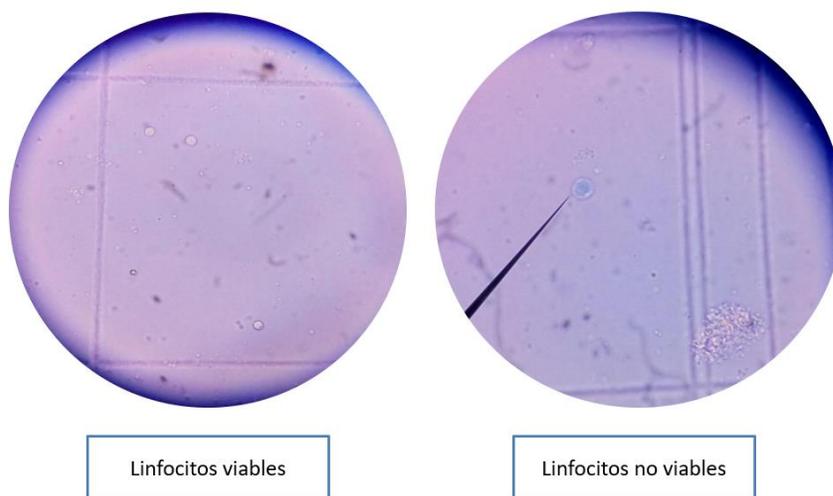
$\mu\text{L}/\text{mL}$ de AV de semillas de frutas. La viabilidad se midió cada hora durante tres horas. (A) AV A.

muricata, (B) AV. *M. indica*, (C)AV. *P. guajava*, (D)AV. *C. papaya*, (E)AV. *S. quitoense*, (F)AV. *R. glaucus*, (G)AV. *P. edulis*, (H) AV. *S. betaceum*. Se presentan gráficas de regresión lineal de tres experimentos evaluados mediante ANOVA unidireccional, con análisis de Brown Frosythe, $p < 0.05$.

Con el fin de investigar la citotoxicidad de los AV de semillas de frutas, se evaluó el recuento de linfocitos humanos viables con azul de tripano (Figura 19). Se estableció la viabilidad inicial y se realizó el recuento cada hora durante tres horas.

Figura 19

Citotoxicidad de AV sobre linfocitos humanos



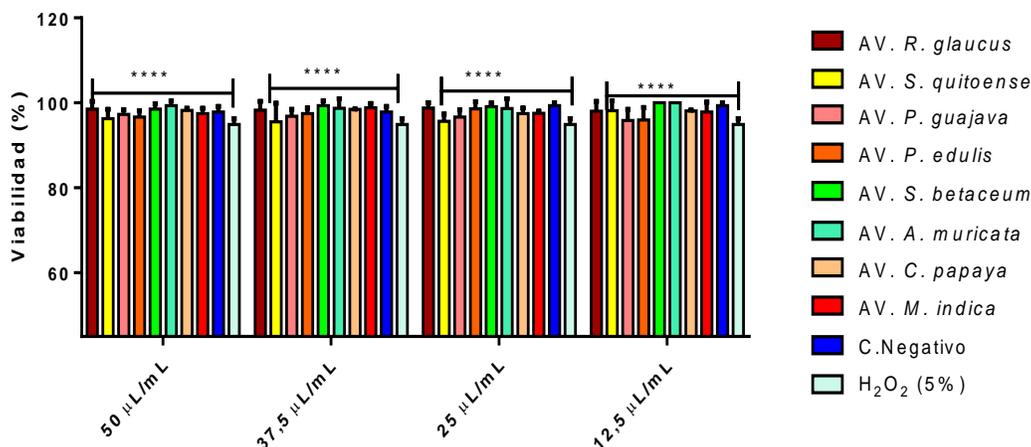
Fuente: este estudio

En la Figura 20, se puede apreciar como todos los AV de semillas presentaron un porcentaje de viabilidad superior al 90% en las cuatro concentraciones evaluadas. En la primera hora, la viabilidad celular más baja se registró con el aceite de semilla de *S. quitoense*: 95,5 y 95,6% en las concentraciones de 37,5 y 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente, de manera similar con el aceite de *P. edulis* en la concentración 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de 95,99% (Figura 20). Las viabilidades más altas se presentaron

en las concentraciones de 12,5 μ L/mL con el aceite de semilla de *A. muricata* correspondiente al 100% seguida de *A. muricata* al 50 μ L/mL con un 99,33%.

Figura 13

Viabilidad de linfocitos humanos incubados 1h con AV de semillas de frutas



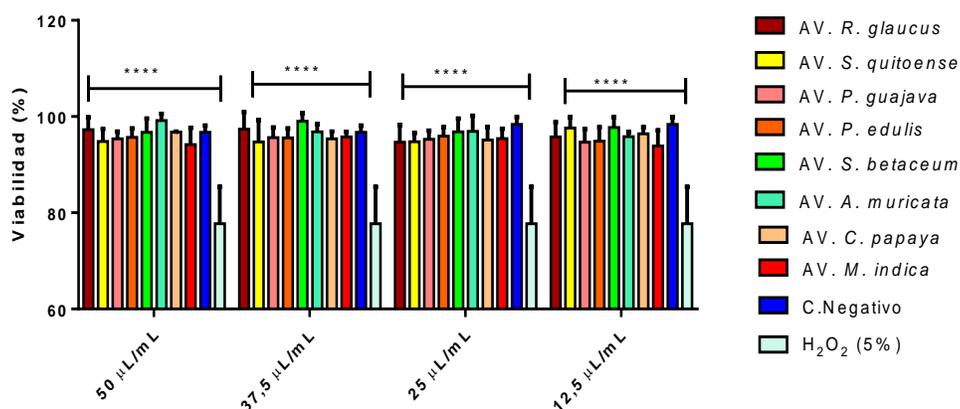
Nota. Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos incubados durante una hora bajo la acción de AV. de semillas de frutas. La viabilidad más baja fue de 95,5 % (*S. quitoense*: 37,5 μ L/mL), la más alta fue del 100% (*A. muricata* 12,5 μ L/mL), diferencias estadísticas significativas en comparación con el control positivo (H₂O₂ al 5%) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, n = 3, **** p < 0,0001.

El trabajo de Giongo, et al., (2017) evaluó la citotoxicidad del metileugenol y el 1-nitro-2-feniletano principales componentes del aceite de *Aniba canelilla* contra linfocitos, concluyó que *in vitro* dichos compuestos no presentan toxicidad para esa línea celular aun cuando presentan actividad anti *Trypanosoma evansi*, hecho que los hace blancos farmacéuticos potenciales para el tratamiento de algunas patologías para lo cual recomienda continuar con estudios *in vivo* en miras del uso humano.

Los hallazgos de citotoxicidad a las dos horas indicaron una disminución en la viabilidad de los linfocitos con el aceite de semilla de *M. indica* en las concentraciones de 50 y 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con valores de 94,19 y 93,85% respectivamente, igualmente *P. guajava* con 94,7% a una concentración de 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *R. glaucus* con 94,7% en una concentración de 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, *S. quitoense* con 94,8 % en 50 y 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 94,7% en 3,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y *P. edulis* con 94,85% en una concentración de 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los porcentajes de viabilidad superiores al 95% se observaron con los aceites de *S. betaceum*, *A. muricata* y *C. papaya*, siendo los más altos los observados en *A. muricata* 99,2% a 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y *S. betaceum* 99,03% a 37,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figura 21).

Figura 14

Viabilidad de linfocitos humanos incubados 2h con AV de semillas de frutas



Nota. Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos incubados durante dos horas bajo la acción de AV de semillas de frutas. Los porcentajes de viabilidad oscilan entre 93,85% (*M. indica* 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y 99,18% (*A. muricata* 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$), diferencias estadísticas significativas en comparación con el control positivo (H₂O₂ al 5%) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, n = 3, **** p < 0,0001.

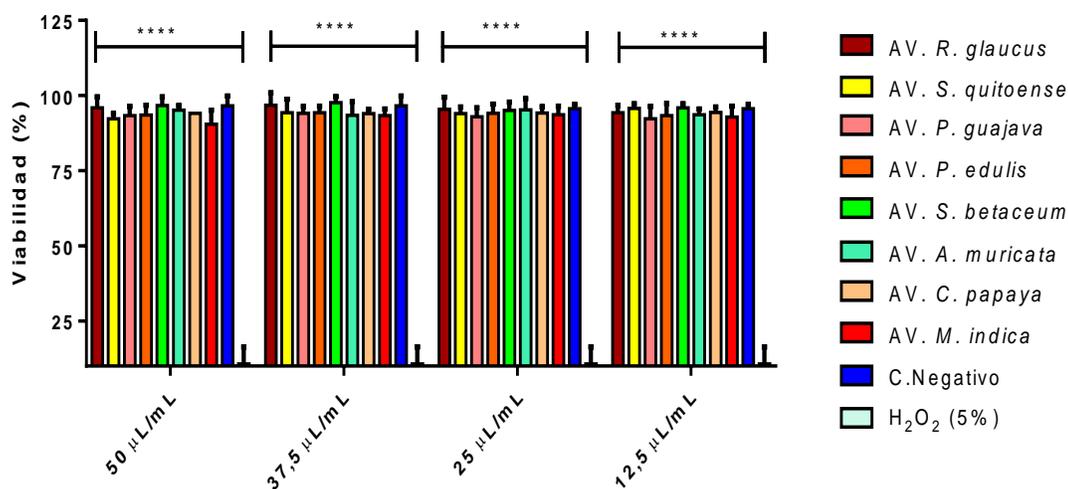
Finalmente, en el recuento realizado a las tres horas se observó que el porcentaje de viabilidad celular más alto se observó con los aceites de *R. glaucus* (95,9 y 96,8%) y *S. betaceum*

(96,73 y 97,63%) en las concentraciones de 50 y 37,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente. El porcentaje de viabilidad más bajo se presentó con el aceite de *M. indica* 90,43% en 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ seguido del aceite de *S. quitoense* 92,3% en 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, con *P. guajava* 92,2 y 92,27% en concentraciones de 25 y 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente (Figura 22).

Estos resultados permiten señalar que los aceites de semillas de frutas no son citotóxicos ya que el porcentaje de viabilidad de las células, en todos los ensayos fue superior al 80%.

Figura 15

Viabilidad de linfocitos humanos incubados 3h con AV de semillas de frutas



Nota. Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos incubados durante tres horas bajo la acción de AV de semillas de frutas. Los porcentajes de viabilidad oscilan entre 90,43% (*M. indica* 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y 97,63% (*S. betaceum* 37,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), diferencias estadísticas significativas en comparación con el control positivo (H₂O₂ al 5%) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética \pm SEM, n = 3, **** p < 0,0001.

Los aceites de semilla de *R. glaucus*, *S. quitoense* y *S. betaceum* presentaron porcentajes de Tocoferoles de 5,84; 1,29 y 1,55% respectivamente, estos compuestos de Vitamina E inhiben la

lisis celular puesto que están relacionados con la actividad antioxidante que interactúa con los radicales libres de oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno, ozono, oxígeno singlete, entre otras) y del nitrógeno (óxido nítrico, dióxido de nitrógeno, radical peroxinitrito), debilitándolos y regenerándose, de esta manera neutraliza los peróxidos lipídicos evitando la oxidación a nivel de las membranas celulares (García Bacallao et al. 2001). La peroxidación en los fosfolípidos de la membrana son los causantes de la alteración en la estructura, acumulación de compuestos citotóxicos e inactivación de las enzimas alterando su función (Chávez, R., Plaza y de Ugaz 1996). Al brindar protección a las membranas, los Tocoferoles impedirán la lisis celular y por el contrario le brindarán resistencia. El ácido linoleico presente en una concentración significativa en los aceites de semillas, igualmente provee protección a las células debido a su naturaleza lipídica y las diversas actividades biológicas como se ha mencionado anteriormente en este documento. Estudios histológicos de intestino de ratas alimentadas con leche suplementada con ácido Linoleico conjugado (CLA) demostraron que no se presentó esteatosis a nivel del tejido intestinal y por el contrario indujeron a un bajo riesgo de enfermedad cardiovascular, recomendando la inclusión de este aceite en la dieta diaria (Rodríguez Cabello et al. 2014).

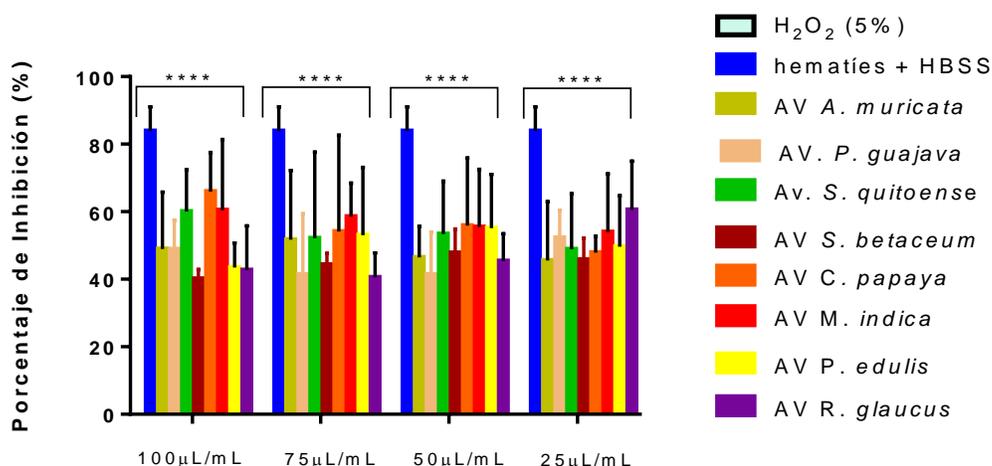
7.5.2 Inhibición hemolítica

Los resultados obtenidos muestran un porcentaje de inhibición de la hemólisis entre el 40,09% y un 65,94% frente al control positivo que presentó una hemólisis del 100% el cual contenía eritrocitos tratados con H₂O₂. Los aceites de semillas que mejor acción protectora presentaron fueron los de *C. papaya* con 65,94; 54,1; 55,89; 47,84% en concentraciones de 90, 75, 50 y 25 µL/mL (respectivamente), igualmente los aceites de *M. indica* con 60,48; 58,51;

55,4; 53,9% en las mismas concentraciones y los aceites de *S. quitoense* con porcentajes de 60,0; 52,08; 53,3; 48,86% mismas concentraciones. Los resultados se muestran en la Figura 23. En presencia de los aceites de semillas, se produce una disminución marcada en la hemólisis de glóbulos rojos, en las concentraciones utilizadas.

Figura 16

Porcentaje de inhibición de hemólisis por AV de semillas de frutas



Nota. Porcentaje de inhibición hemolítica se obtuvo midiendo la hemólisis causada por el H₂O₂ y restando este valor al % de hemólisis del tratamiento. Los porcentajes de disminución de hemólisis oscilan entre 65,94% (*C. papaya* 100 µL/mL) y 40,09% (*S. betaceum* 100 µL/mL), Diferencias estadísticas significativas en comparación con el control positivo (H₂O₂ al 5%) en todas las diluciones evaluadas. Cada barra representa la media aritmética ± SEM, n = 3, **** p < 0,0001.

Se puede inferir, que la presencia de los aceites de semillas en las concentraciones utilizadas confirió algún tipo de resistencia a los hematíes, posiblemente al recubrirlos, esto gracias a la afinidad de los compuestos de los aceites de semillas con la membrana celular haciéndolos menos sensibles a la acción lítica en soluciones de H₂O₂ (Durán, Montero, y

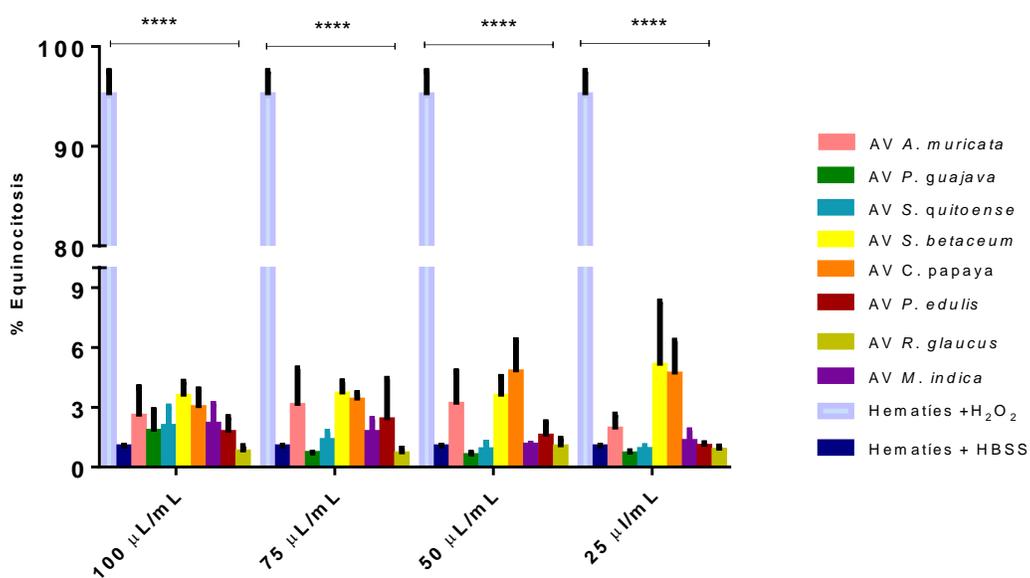
Marrugo 2013). La evidencia de esta importante actividad protectora de los AV de semillas, unido al potencial antioxidante reportado por Dorado-Achicanoy, et al. (2016) en aceites de semillas de *S. betaceum*, *C. papaya* y *A. muricata* y reportes de Pantoja-Chamorro, et al. (2017) sobre actividad antioxidante de los aceites de semillas de *S. quitoense*, *P. edulis* y *R. glaucus* frente al radical DPPH, permiten proponer que los AV de semillas de frutas son extractos candidatos para uso en cosmetología, industria alimentaria y farmacología.

7.5.3 Alteración morfológica eritrocitaria

La mayor alteración morfológica observada en eritrocitos fue la de equinocitos, aunque los porcentajes con relación al control positivo fueron inferiores al 6%, como puede apreciarse en la Figura 24.

Figura 24

Equinocitosis en presencia de aceites de semillas de frutas

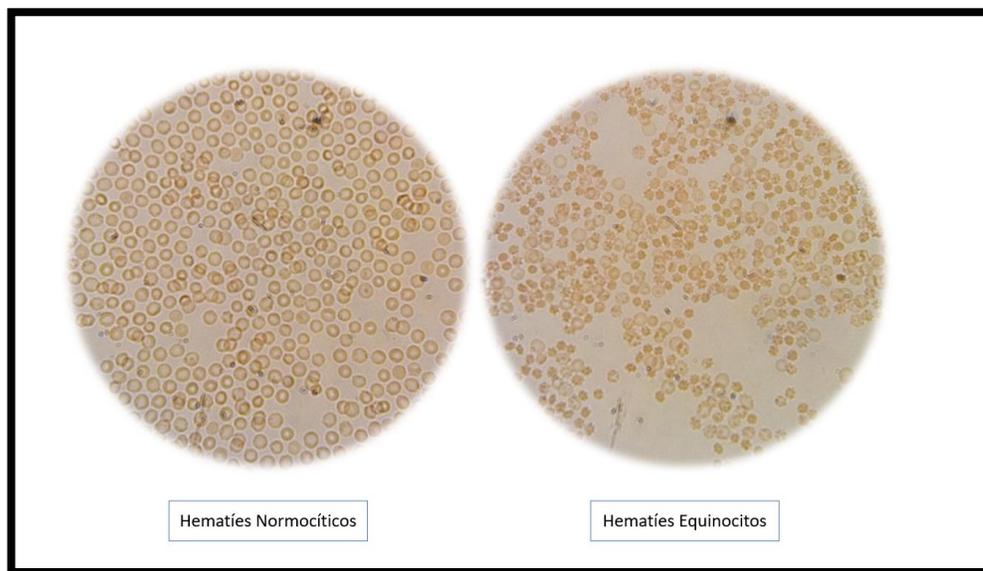


Nota. Los resultados de tres experimentos independientes se muestran en gráficos de barras (media \pm SEM). Se presentaron diferencias estadísticas entre el control positivo con respecto a los eritrocitos tratados con los AV de semillas de frutas ****p <0,0001; si hubo significancia estadística entre los extractos de semillas de frutas, ****p <0,0001.

Los porcentajes de equinocitosis fueron muy bajos, el máximo fue del 5,09% para el aceite de *S. betaceum* (25 μ L/mL) y con AV de *C. papaya* con 4,65% (25 μ L/mL), en comparación al control negativo, cabe resaltar que estos aceites independiente de la concentración, fueron los que causaron mayor alteración morfológica en los eritrocitos (Figura 24). Los porcentajes más bajos fueron observados con los aceites de *P. guajava*, *S. quitoense*, *M. indica*, *P. edulis* y *R. glaucus* especialmente en las concentraciones de 75, 50 y 25 μ L/mL.

Figura 25

Anormalidades morfológicas eritrocitarias



Nota. Observación microscópica (40X) permitió identificar alteraciones morfológicas eritrocitarias inducidas por H₂O₂: equinocitos; recuentos en ensayos por triplicado permitieron determinar (%) de

equinocitos frente al control positivo (100%), no se observaron en el control negativo (H. normocíticos). Se realizaron recuentos en 500 células.

Los cambios observados en la morfología de los glóbulos rojos pueden deberse a la integración de los compuestos de los aceites: ácidos grasos principalmente, en la membrana celular, conllevando a alteraciones en la permeabilidad o incrementando la relación superficie/volumen (de Isla et al. 2013). La equinocitosis observada al final de la incubación con los aceites en las cuatro concentraciones utilizadas pudo deberse a la ubicación de los ácidos grasos en la región hidrofílica de la membrana generando la alteración morfológica observada (Cyboran, Oszmiański, y Kleszczyńska 2012). Otra explicación ante este fenómeno puede ser la expuesta por Gedde, et al. (1997) y Fischer, (2004) quienes refieren que dicha alteración morfológica se debe a efectos de contracción y expansión de la espectrina sobre las proteínas de membrana dependiente del cambio de pH, explicando que pH alcalinos (> 8.0) inducen al cambio hacia equinocitos y pH ácidos (< 6.0) llevan a la forma de estomatocitos. Adicionalmente se debe tener en cuenta que los eritrocitos en condiciones de temperatura ambiente pueden cambiar su forma debido a alteraciones en sus propiedades biológicas (Gedde, Davis, y Huestis 1997).

Los porcentajes de alteraciones morfológicas evidenciadas en el presente trabajo son muy bajos en comparación a porcentajes de equinocitosis reportadas en estudios previos en los cuales los resultados superaron el 10% (Durán, Montero, y Marrugo 2013), sin embargo, se debe tener en cuenta el tipo de extracto y la tecnología de extracción, entre otros factores.

Con el fin de correlacionar los compuestos tras las alteraciones morfológicas de los glóbulos rojos y aunque se ha reportado que los tocoferoles y ácidos grasos identificados como constituyentes de los aceites de semillas de frutas además de presentar actividad antioxidante,

inducen a la equinocitosis (Suwalsky et al. 2008), los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que dicha inducción es baja, en ese sentido, los AV de semillas de *C. papaya*, *S. betaceum* y *A. muricata* aunque presentaron altos porcentajes de ácido linoleico, oleico y esteárico, los porcentajes de alteración morfológica fue muy baja, además se debe tener en cuenta que la actividad antioxidante busca proteger las membranas de la acción de los radicales libres (Cyboran, Oszmiański, y Kleszczyńska 2012).

8. Conclusiones

El AV de *P. guajava* presentó actividad antibacteriana sobre las cinco cepas bacterianas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* (CMB 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y *K. pneumoniae* (CMB 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Cuatro AV presentaron actividad inhibitoria (CMB 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$) sobre cuatro cepas bacterianas: *R. glaucus* sobre *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*; *A. muricata* sobre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*; *P. edulis* sobre *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae* y finalmente: *S. betaceum* sobre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae*.

El AV de *S. quitoense* presentó actividad antibacteriana sobre tres cepas bacterianas: *P. aeruginosa* (CMB 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$), *S. aureus* y *E. faecalis* (CMB 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

El AV de *C. papaya* presentó actividad antibacteriana sobre dos cepas: *P. aeruginosa* y *E. faecalis* (CMB 900 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

El AV de *M. indica* presentó actividad antibacteriana sobre una cepa: *P. aeruginosa* (CMB 750 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

La concentración Efectiva 50 (CE50) de los AV únicamente se logró determinar para los AV de *C. papaya* sobre *P. aeruginosa* (745 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y sobre *E. faecalis* (712 $\mu\text{L}/\text{mL}$), el AV de *S. betaceum* sobre *S. aureus* (680 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y el AV de *P. guajava* sobre *S. aureus* (695 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Los AV de semillas de frutas analizados no generan citotoxicidad sobre linfocitos, inhiben la hemólisis y no inducen la deformación morfológica en eritrocitos humanos.

Los AV son candidatos para ser utilizados en la elaboración de productos de cosmetología o como protector en la industria alimenticia.

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de las propiedades biológicas de estos AV, otorgando adicionalmente un valor agregado a las semillas obtenidas como residuo agroindustrial del procesamiento de frutas, motivando así su potencial uso en la industria alimenticia, de la cosmetología o farmacéutica, disminuyendo el impacto ambiental que estos desechos causan.

9. Recomendaciones

Es importante continuar realizando más estudios con estos aceites vegetales de frutas para determinar actividades biológicas adicionales que respalden su potencial uso en la industria alimenticia, cosmetológica o farmacéutica.

10. Presentación de Resultados en Congresos y Artículo sometido para publicación.

El Presente trabajo de manera parcial participó en dos eventos de carácter científico a nivel Nacional e Internacional, estos fueron:

- ✚ “Efecto *in vitro* de aceites vegetales de semillas residuales de frutas tropicales y andinas sobre bacterias Gram negativas”, presentado en el Pacific Microbial Meeting 2019 - Universidad Santiago de Cali, realizado los días 22 y 23 de agosto de 2019, en calidad de PONENCIA ORAL por Orfa Alexandra España Jojoa.
- ✚ “Actividad antibacteriana de aceites de semillas de Solanáceas”, presentado en el LV Congreso Nacional y VI Internacional Virtual de Ciencias Biológicas – Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, realizado en Santiago de Cali los días 5 al 7 de noviembre de 2020, en calidad de PONENCIA ORAL por Orfa Alexandra España Jojoa.
- ✚ El artículo titulado: “**Actividad biológica de los aceites de semillas de *Annona muricata* y *A. cherimola***”, de los autores Orfa A. España, Andrés F. Ortiz, Soany Eraso, Andrés M. Hurtado y Jaqueline Mena, fue sometido a revisión en la revista Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas el 21 de septiembre de 2021.

11. Bibliografía

- Abadía, Helbert Salinas. 2014. “Guía Técnica Para El Cultivo De ‘Maracuyá Amarillo’”.
Instituto De Educación Técnica Profesional De Roldanillo Valle, 1–44.
http://portal2.edomex.gob.mx/icamex/investigacion_publicaciones/horticola/fresa/groups/public/documents/edomex_archivo/icamex_arch_cultfresa.pdf.
- Abbate, E., M. Vescovo, M. Natiello, M. Cufre, A. García, M. Ambroggi, y V. ... Ritacco. 2007.
 “Tuberculosis extensamente resistente (XDR-TB) en Argentina: aspectos destacables epidemiológicos, bacteriológicos, terapéuticos y evolutivo.”
- Aburjai, Talal, y Feda M. Natsheh. 2003. “Plants Used in Cosmetics”. *Phytotherapy Research* 17 (9): 987–1000. <https://doi.org/10.1002/ptr.1363>.
- Al-Gethamy, M. M., H. S. Faidah, H. A. Adetunji, A. Haseeb, S. S. Ashgar, T. K. Mohanned, y M. A. ... Hassali. 2017. “Risk factors associated with multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* nosocomial infections at a tertiary care hospital in Makkah, Saudi Arabia—a matched case–control study.” *Journal of International Medical Research* 45 (3): 1181–1189.
- Alós, JI. 2014. “Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33 (10): 692–99.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X14003413>.
- Andrade C, Miguel G. 2011. “Estado del conocimiento de la biodiversidad en Colombia y sus amenazas. Consideraciones para fortalecer la interacción ciencia-política”. *Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales* 35 (137): 491–508.
<http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v35n137/v35n137a08.pdf>.

- Arencibia, D. F., L. A. Rosario, y D. L. (2003). Curveco. 2003. “Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad.” *Revista de Toxicología*, 40–52.
- Argote- Vega, Francisco Emilio, Zully Jimena Suarez-Montenegro, Magaly Elizabeth Tobar-Delgado, Jose Angel Perez-Alvarez, Andres Mauricio Hurtado-Benavides, y Johannes Delgado-Ospina. 2017. “Capacidade de Avaliaçãõ Inibitorio de Óleos Essemciais em Staphylococcus aureus E Escherichia coli”. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 15 (SPE2): 52–60. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)ediciónespecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)ediciónespecialn2.578).
- Asohofrucol. 2009. “Guia Ambiental Hortofruticola De Colombia”, 1–141.
- Ávalos-Soto, Joaquín, Jaime Fco Treviño-Neávez, Ma Julia Verde-Star, Catalina Rivas-Morales, Azucena Oranday-Cárdenas, Javier Moran-Martínez, Luis Benjamín Serrano-Gallardo, y Ma Eufemia Morales-Rubio. 2014. “Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de Azadirachta indica (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares”. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 45 (3): 39–44.
- Ávila, D. N. M., R. Y. Ramírez-Rueda, y M. I. E. Mayorga. 2015. “Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra Enterococcus faecalis resistente a vancomicina.” *Salud & Sociedad* 2 (1).
- Awad El-Gied, AmgadA, AbdelkareemM Abdelkareem, y ElnazeerI HamedelnieI. 2015. “Investigation of cream and ointment on antimicrobial activity of Mangifera indica extract”. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology amp; Research* 6 (2): 53. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.154530>.
- Bennett, J., R. Dolin, y M Blaser. 2014. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and*

Practice of Infectious Diseases. Editado por Saunders. 8th ed. Vo.

Bermúdez, Alexis., María A. Oliveira-Miranda, y Dilia. Velázquez. 2005. “La Investigación Etnobotánica Sobre Plantas Medicinales : Una Revisión De Sus Objetivos Y Enfoques Actuales Alexis Bermúdez , María a . Oliveira-Miranda”. *Interciencia* 30 (8): 453–59.

Bernardini, E. 1981. *Tecnología de aceites y grasas*. Vol. 665 B4y 19.

Bettaieb, I., S. Bourgou, J. Sriti, K. Msaada, F. Limam, y B. Marzouk. 2011. “Essential oils and fatty acids composition of Tunisian and Indian cumin (*Cuminum cyminum* L.) seeds: a comparative study.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91 (11): 2100-2107.

Boyum, A. 1968. “Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.” *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* Supplement: 77–89.

Bueno Ferrer, C. 2012. “Bio-compuestos termoplásticos basados en aceites vegetales. Estudio de su aplicabilidad al envasado de alimentos””. Universidad de Alicante.

Cai, Y., X. Hu, M. Huang, F. Sun, B. Yang, J. He, ..., y J. Chen. 2012. “Characterization of the Antibacterial Activity and the Chemical Components of the Volatile Oil of the Leaves of *Rubus parvifolius* L.” *Molecules* 17 (7): 7758-7768.

Camaró-Sala, M. L., R. Martínez-García, P. Olmos-Martínez, V. Catalá-Cuenca, M. D. Ocete-Mochón, y C. Gimeno-Cardona. 2015. “Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33 (7): e31–36.

Cancino-Escalante, G. O., E. Q. García, C. E. Villamizar, y C. D. Carvajal. 2015. “Propagación

- in vitro de materiales seleccionados de *Rubus glaucus* Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia.” *Revista Colombiana de Biotecnología* 17 (2): 7–15.
- Cano, C., Bonilla, P., M. Roque, y J. Ruiz. 2008. “Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña).” *Revista peruana de medicina experimental y salud pública* 25 (3): 298-301.
- Cantón, R., J. E. García, L. Gómez, L. Martínez, C. Rodríguez, J. Vila, y J. A. García. 2000. *Procedimientos en microbiología clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editado por Editor Picazo J J.
- Canton, R., y P Ruiz-Garbajosa. 2013. “Infections caused by multi-resistant Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.).” *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica* 31 (8): 543–51.
- Castro, L., M. Alzate, y G. E. Guerrero. 2010. “Estudio preliminar de la bioactividad de extractos de semillas de *Annona cherimolia* de la familia Annonaceae.” *Scientia et technica* 1 (44): 326–30.
- Castro, Lina, Monica Alzate, y Gloria Edith Guerrero. 2010. “Estudio Preliminar de la Bioactividad de Extractos de Semillas de *Annona Cherimolia* de la familia de Annonaceae”. *Scientia et Technica año XVI*, n° 44: 326–30.
- CC Pinto, N. de, L.M. Campos, A.C.S. Evangelista, A.S. Lemos, T.P. Silva, ... Melo, R.C., y R.L. Fabri. 2017. “El extracto antimicrobiano de *Annona muricata* L. (guanábana) se dirige a las membranas celulares de bacterias Gram positivas y Gram negativas.” *Cultivos y*

productos industriales 107: 332-340.

Cercenado, Emilia. 2011. "Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España". *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 29 (SUPPL. 5): 59–65.
[https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70045-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70045-3).

Cerón, A. F., Osorio, O., Hurtado, A. 2012. "Identificación de ácidos grasos presentes en el aceite extraído a partir de semillas de guanábana (*Annona muricata*).” *RevistaFacia* 29 (1): 81–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.22267/rcia>.

Cerón, A. F., O. Osorio M., y A.M. Hurtado B. 2012. "Identificación de ácidos grasos contenidos en los aceites extraídos a partir de semillas de tres diferentes especies de frutas”. *Acta Agronomica* 61 (2): 126–32.

Cerón, Andrés, Oswaldo Osorio, y Andrés Hurtado. 2012. "Identificación de ácidos grasos presentes en el aceite extraído a partir de semillas de guanábana (*Annona muricata*)”. *Revista de Ciencias Agrícolas* 29 (1): 81–87.
<http://revistas.udenar.edu.co/index.php/rfacia/article/view/370>.

Cerón, Leidy J., Andrés M. Hurtado, y Alfredo A. Ayala. 2016a. "Efecto de la presión y la temperatura de extracción con CO₂ supercrítico sobre el rendimiento y composición de guayaba (*Psidium guajava*)”. *Informacion Tecnologica* 27 (6): 249–58.
<https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600025>.

Cerón, Leidy J, Andrés M Hurtado, y Alfredo A Ayala. 2016b. "Efecto de la Presión y la Temperatura de Extracción con CO₂ Supercrítico Sobre el Rendimiento y Composición de Aceite de Semillas de Guayaba (*Psidium guajava*)”. *Información tecnológica* 27 (6): 249–58. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600025>.

Cervantes-García, Estrella, Rafael García-González, y Paz María Salazar-Schettino. 2014.

“Características generales del *Staphylococcus aureus*”. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 61 (1): 28–40. www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx.

Chávez, R., Plaza, A., y O. L. de Ugaz. 1996. “Antioxidantes de origen vegetal.” *Revista de Química* 10 (1): 71-101.

Cheruiyot, K. R., D. Olila, y J. Katerega. 2009. “In-vitro antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya.” *African Health Sciences* 9 (2).

Choi, W. H. 2016. “Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*.” *Asian Pacific journal of tropical medicine* 9 (2): 125-129.

CLSI. 2010. “Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100 S20”, 1–78.

http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf.

CLSI. 2012. “Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. M07-A9” 32 (2).

CLSI. 2015. “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S22.” 35 (3).

Cogo, L. L., C. L. B. Monteiro, M. D. Miguel, O. G. Miguel, M. M. Cunico, M. L. Ribeiro, E. Ramalho de Camargo, Botão K. G., K. da Silva Nogueira, y Libera Dalla Costa. 2010.

“Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of

gastrointestinal disorders.” *Brazilian Journal of Microbiology* 41 (2): 304–9.

Cornaglia, Giuseppe. 2009. “Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens”. *Clinical Microbiology and Infection* 15 (3): 209–11.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02737.x>.

Corrêa, J. A. 2019. *Garantía de calidad en el laboratorio clínico*. Ed. Tercer. Rio de Janeiro. Brasil.

Cruz-Carrillo, Anastasia, Natalia Rodríguez N, y Carlos Eduardo Rodríguez. 2010.

“Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*”. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 13: 117–24.

Cruz, J. M., J. M. Domínguez, H. Domínguez, y J. C. Parajó. 2001. “Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials.” *Journal of agricultural and food chemistry* 49 (5): 2459-2464.

Cyboran, S., J. Oszmiański, y H. Kleszczyńska. 2012. “Interaction between plant polyphenols and the erythrocyte membrane.” *Cellular and Molecular Biology Letters* 17 (1): 77-88.

DANE. 2015. “Cultivo del Mango, *Mangifera indica*, y su comportamiento frente a las condiciones Ambientales y de Manejo.” Bogotá, Colombia.

DANE. 2016. “El cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.) y sus principales enfermedades en época de lluvias.” Bogotá, Colombia.

Díaz Pérez, M., C. Martínez, Rodríguez, y R. Zhurbenko. 2013. “Enterococcus, medios de cultivo convencionales y cromogénicos”. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 51

(1): 97–110.

- Dolab, Juan G., Beatriz Lima, Ewelina Spaczynska, Jiri Kos, Natividad H. Cano, Gabriela Feresin, Alejandro Tapia, et al. 2018. “The antimicrobial activity of annona emarginata (Schltdl.) H. Rainer and most active isolated compounds against clinically important bacteria”. *Molecules* 23 (5): 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23051187>.
- Dorado, D. J., Hurtado-Benavides, A. M., Martínez-Correa, H. A. 2016. “Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles”. *Informacion Tecnologica* 27 (5): 37–48. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>.
- Dorado, D., A. Hurtado-Benavides, y H. A. Martínez-Correa. 2016. “Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles”. *Información Tecnológica* 27 (5): 37–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>.
- Dorado, D. J., y H. A. Hurtado-Benavides, A. M. Martínez-Correa. 2016. “Extracción con CO₂ Supercrítico de Aceite de Semillas de Guanábana (*Annona muricata*): Cinética, Perfil de Ácidos Grasos y Esteroles”. *Información Tecnológica* 27 (5): 37–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>.
- Dorado, Daniela. 2016. “Aceites Obtenidos De Semillas De”, 171.
- Dorado, Daniela J., Andrés M. Hurtado-Benavides, y Hugo A. Martínez-Correa. 2016. “Extracción con CO₂ Supercrítico de aceite de semillas de guanábana (*Annona muricata*): Cinética, perfil de ácidos grasos y esteroles”. *Informacion Tecnologica* 27 (5): 37–48. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000500005>.

- Durán, Marlene, Piedad Montero, y Yesid Marrugo. 2013. “Extractos metanólicos de corteza de guayaba (*Psidium guajava* l.)”. *Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgacion Científica* 16 (2): 327–34.
- EARS-Net. 2016. “European Centre for Disease Prevention and Control”.
- Engels, C., M. A. T. T. H. I. A. S. Knodler, Y. Y. Zhao, R. Carle, M. G. Ganzle, y A. Schieber. 2009. “Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels.” *Journal of agricultural and food chemistry* 57 (17): 7712-7718.
- Fait, M. E., G. L. Garrote, P. Clapés, y S. R. Morcelle del Valle. 2012. “Producción de un agente antimicrobiano con potencial actividad tensioactiva mediante el empleo de tecnologías amigables con el medio ambiente.”
- Ferreira, Bianca Silva, Camila Guimarães De Almeida, Lara Pereira Faza, Angelina De Almeida, Cláudio Galuppo Diniz, Vânia Lúcia Da Silva, Richard Michael Grazul, y Mireille Le Hyaric. 2011. “Comparative properties of amazonian oils obtained by different extraction methods”. *Molecules* 16 (7): 5874–85. <https://doi.org/10.3390/molecules16075875>.
- Figuroa Martínez, Paola Milena, Andrés Mauricio Hurtado Benavides, y Miguel Angel Ceballos Ortiz. 2016. “Microencapsulación mediante secado por aspersión de aceite de mora (*Rubus glaucus*) extraído con CO₂ supercrítico”. *Revista Colombiana de Química* 45 (2): 39. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v45n2.57481>.
- Fischer, T. M. 2004. “Shape memory of human red blood cells.” *Biophysical journal* 86 (5): 3304-3313.
- García Bacallao, L., L. Vicente García Gómez, D. M. Rojo Domínguez, y E. Sánchez García. 2001. “Plantas con propiedades antioxidantes.” *Revista cubana de investigaciones*

biomédicas 20 (3): 231-235.

- Garedew, A., E. Schmolz, y I. Lamprecht. 2004. “Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach.” *Thermochimica Acta* 422 (1,2): 115-124.
- Gedde, M. M., D. K. Davis, y W. H. Huestis. 1997. “Cytoplasmic pH and human erythrocyte shape.” *Biophysical journal* 72 (3): 1234-1246.
- Gibb, Alan Patrick, Chanwit Tribuddharat, Richard a Moore, Thomas J Louie, Wally Krulicki, David M Livermore, Marie-france I Palepou, y Neil Woodford. 2002. “Nosocomial Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a New bla IMP Allele , bla IMP-7”. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46 (1): 255–58.
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.255>.
- Giongo, J. L., R. A. Vaucher, A. S. Da Silva, C. B. Oliveira, M. D. de Mattos, C. B., Baldissera, y V. F. (2017). ... da Veiga Junior. 2017. “Trypanocidal activity of the compounds present in Aniba canelilla oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes.” *Microbial pathogenesis* 103: 13-18.
- Gómez, QF. Katherine. 2015. “Bacterias multirresistentes: Tratamientos disponibles”. *Biomedicina* 10 (2): 6–16. <http://www.um.edu.uy/docs/bacterias-dic15.pdf>.
- Gonçalves, FA, M. Andrade Neto, JN Bezerra, A. Macrae, OVD Sousa, AA Fonteles-Filho, y RH Vieira. 2008. “Actividad antibacteriana de GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, extractos de hojas sobre bacterias entéricas causantes de diarrea aisladas de camarón Seabob, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). Tropical de São Paulo”. *Revista del Instituto de Medicina* 5: 11-15.

- Gondim, Antonio Nei Santana, Vanda Rodrigues De Oliveira, Sellyanna Domeny Dos Santos, Bagnólia Araújo Da Silva, Carla Maria Lins De Vasconcelos, y Eduardo Antonio Conde-Garcia. 2009. "Extract from leaf of *Psidium guajava* L depresses the guinea pig atrial contractility by interfering with potassium and calcium channels". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (3): 483–89. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000300014>.
- Gopalakrishnan, L., K. Doriya, y D. S. Kumar. 2016. "Moringa oleifera: A review on nutritive importance and its medicinal application." *Food science and human wellness* 5 (2): 49-56.
- Grande-Tovar, C., L. Araujo-Pabón, E. Flórez-López, y C. Aranaga-Arias. 2021. "Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth)." *Informador Técnico* 85 (1): 64-82.
- Hartigh, LJ den. 2019. "Efectos del ácido linoleico conjugado sobre el cáncer, la obesidad y la aterosclerosis: una revisión de ensayos preclínicos y humanos con perspectivas actuales." *Nutrientes* 11 (2): 370.
- He, X., Y. Ma, G. Yi, J. Wu, L. Zhou, y H. Guo. 2017. "Chemical Composition and antifungal activity of *Carica Papaya* Linn. seeds essential oil against *Candida* spp." *Letters in applied microbiology* 64 (5): 350–54.
- Huang, Z.R., Y.K. Lin, y J.Y. Fang. 2009. "Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology." *Molecules* 14 (1): 540-54. <https://doi.org/doi:10.3390/molecules14010540>.
- Huertas, J. M., y M. C. Y. Chamorro. 2007. "Actividad antibacteriana In vitro de extractos de plantas medicinales regionales promisorias sobre aislamientos de *Helicobacter pylori*.

Universidad y Salud”,. *Universidad y salud* 1 (8).

Hurtado-Benavides, Andrés M. Dorado, Daniela J., Ana Lucia. Pantoja-Chamorro, Andres Felipe. Ceron, Soany. Eraso, y Omar. Benavides. 2016. “Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales de Frutas”.

Hurtado-Benavides, A.M; s. f. ““Use of tropical fruit waste for obtaining exotic oils with supercritical fluid””. En *Congreso IV Iberoamerican conference on supercritical fluids – PROSCIBA 2016*. Viña del Mar- Chile;

Hurtado, B. A. 2002. “Estudio del proceso de extracción de componentes minoritarios de aceite de oliva con CO₂ supercrítico en contracorriente”. Universidad Autónoma de Madrid.

Hurtado, M. P., M. A. De la Parte, y A. Brito. 2002. “Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica.” *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 22 (2): 112–18.

ICA. 2011. “Manejo fitosanitario del cultivo del lulo (*Solanum quitoense* Lam) - Medidas para la temporada inverna.” Bogotá, Colombia.

Intorasoot, Amornrat, Piyaorn Chornchoem, Siriwoot Sookkhee, y Sorasak Intorasoot. 2017. “Bactericidal activity of herbal volatile oil extracts against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*”. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* 6 (2): 1.
<https://doi.org/10.5455/jice.20170411091159>.

Isla, N. G. de, J. R. Valverde, R. J. Rasia, J. F. Stoltz, y B. D. Riquelme. 2013. “Análisis de la resistencia osmótica de glóbulos rojos humanos incubados con anticuerpos monoclonales anti-GPA.” *In Anales AFA* 14 (1).

- Ivanova, E. P., S. H. Nguyen, Y. Guo, V. A. Baulin, H. K. Webb, V. K. Truong, y R. J. (2017). ... Crawford. 2017. "Bactericidal activity of self-assembled palmitic and stearic fatty acid crystals on highly ordered pyrolytic graphite." *Acta biomaterialia* 59: 148-157.
- Jalalvand, A. R., M. Zhaleh, S. Goorani, M. M. Zangeneh, N. Seydi, A. Zangeneh, y R. Moradi. 2019. "Chemical characterization and antioxidant, cytotoxic, antibacterial, and antifungal properties of ethanolic extract of *Allium Saralicum* RM Fritsch leaves rich in linolenic acid, methyl ester." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 192: 103–12.
- Jang, H., Y. Makita, K. Jung, S. Ishizaka, K. Karasawa, ... Oida, K., y A. Tanaka. 2016. "Sal de ácido linoleico con agua blanda ultrapura como combinación antibacteriana contra *Staphylococcus* spp." *Revista de microbiología aplicada* 120 (2): 280-288.
- Jamboonsri, Pimsumon, Pimolpan Pithayanukul, Rapepol Bavovada, y Mullika T. Chomnawang. 2011. "The inhibitory potential of thai mango seed kernel extract against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*". *Molecules* 16 (8): 6255–70.
<https://doi.org/10.3390/molecules16086255>.
- Jiménez Contreras, A.P., Támara Román, Y. D. C. 2018. "Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de extractos de corteza de tallo de *Annona purpurea* Moc. & sesse ex dunal (Annonaceae) frente a dos patógenos nosocomiales de importancia clínica."
- Jurado, Javier Arturo, y Lilia Vanessa Muñoz. 2009. "Caracterización del aceite de las semillas de *solanum quitoense* variedad la selva y evaluación de su actividad antioxidante.", 1–70.
- Koubaa, M., H. Mhemdi, F. J. Barba, A. Angelotti, F. Bouaziz, S. E. Chaabouni, y E. Vorobiev. 2017. "Seed oil extraction from red prickly pear using hexane and supercritical CO₂: Assessment of phenolic compound composition, antioxidant and antibacterial activities."

Journal of the Science of Food and Agriculture 97 (2): 613-620.

Lam, S. K., y T. B. Ng. 2009. "Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit". *Phytomedicine* 16 (2-3): 172-80.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.025>.

Leeke, G. G. 2002. "Influence of water on the extraction of essential oils from a model herb using supercritical carbon dioxide." *Industrial and engineering chemistry research*, 41 (8): 2033-39.

León-Fernández, A. E., L. Martínez-Cárdenas, L. G. Zepeda-Vallejo, R. I. Arteaga-Garibay, P. Gutiérrez-Martínez, y E. Montalvo-González. 2009. "Antibacterial, antifungal, antioxidant and toxic effect of fractioned extracts from Soursop pulp." *Revista bio ciencias* 6.

León-Sánchez, J. R., M. D. L. P. Salgado-Cruz, M. D. L. L. Sánchez-Mundo, y A. D. J. Cortés-Sánchez. 2014. "Ácido linoleico conjugado: de la naturaleza al uso de la biotecnología." *Revista Cubana de Química* 26 (3): 235-258.

Li, H., P. Zhou, Q. Yang, Y. Shen, J. Deng, L. Li, y D. Zhao. 2011. "Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'." *Journal of ethnopharmacology* 133 (3): x1085-1090.

Liu, Rui Hai. 2003. "Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals". *The American Journal of Clinical Nutrition* 78: 3-6.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.517S>.

Liya, S. J., y R. Siddique. 2018. "Determination of antimicrobial activity of some commercial fruit (apple, papaya, lemon and strawberry) against bacteria causing urinary tract infection." *European Journal of Microbiology and Immunology* 8 (3): 95-99.

- Londoño, P., A. Mieres-Pitre, y C. E. Hernández. 2012. "Extracción y caracterización del aceite crudo de la almendra de duazno *Prunus pérsica*." *Avances en Ciencias e Ingeniería*. 3 (4): 37–46.
- Lopardo, H., y S. Predari. 2016. *Manual de Microbiología Clínica de la Asociación Argentina de Microbiología*.
- López Vargas, J. A., y L. M. Echeverri Toro. 2010. "K. pneumoniae: ¿ la nueva "superbacteria"?" Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia." *Iatreia* 23 (2): 157.
- Lozoya, X., H. Reyes-Morales, M. A. Chávez-Soto, M. Martínez-García, Y. Soto-González, y S. V. Doubova. 2002. "Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease." *Journal of Ethnopharmacology* 83 (1–2): 19-24.
- Luján Roca, Daniel Ángel. 2014. "Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso". *Acta bioquímica-clínica latinoamericana* 48 (4): 465–74. <https://doi.org/ISSN 1851-6114>.
- Luna Guevara, María L., Juan J. Luna Guevara, Héctor Ruiz Espinosa, Lucero Leyva Abascal, y Carolina B. Díaz González. 2015. "Eficiencia de la desinfección con aceites esenciales y ultrasonido sobre *Escherichia coli* inoculada en frutos de tomate y el impacto sobre la actividad antioxidante". *Revista Argentina de Microbiología* 47 (3): 251–55. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.04.004>.
- Macé, Fernando. 2010. "Ficha del árbol del tomate o tamarillo (*Solanum betaceum* = *Cyphomandra betacea*)." 2010. <http://archivo.infojardin.com/tema/ficha-del-arbol-del-tomate-o-tamarillo-solanum-betaceum-cyphomandra-betacea.373777/>.
- Maguna, F. P., A. M. Romero, O. A. Garro, y N. B. Okulik. 2006. "Actividad Antimicrobiana de

- un grupo de Terpenoides”. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: Facultad de Agroindustrias* 57: 4–5.
- Malbrán, G carlos. 2012. “Metodo De Determinacion De Sensibilidad Antimicrobiana Por Difusion”. *Servicio antimicroano* 32 (2): 9–12.
- Martínez, M. J., N. Molina, y E. Boucourt. 1997. “Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L.(Guayaba).” *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2 (1): 12-14.
- Martini, Silvia, Claudia D’Addario, Andrea Colacevich, Silvia Focardi, Francesca Borghini, Annalisa Santucci, Natale Figura, y Claudio Rossi. 2009. “Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds”. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34 (1): 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.01.010>.
- Medeiros-de-Moraes, I. M., C. F. Gonçalves-de-Albuquerque, A. R. Kurz, F. M. D. J. Oliveira, V. H. P. D. Abreu, ... Torres, R. C., y A. R. Silva. 2018. “Omega-9 oleic acid, the main compound of olive oil, mitigates inflammation during experimental sepsis.” *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Mena-Huertas, J., C. Embus-Córdoba, V. L. Rosero-Ruiz, J. Navarro-Yépez, I. C. Ortiz-Trujillo, y M. C. Yépez-Chamorro. 2011. “Ausencia de efecto citotóxico, mutagénico y genotóxico de extracto acuoso y aceite esencial de *Carica candamarcensis*. hook.(Plantae: Caricaceae).” *Actualidades Biológicas* 33 (95): 153–64.
- Mena-Huertas, Jaqueline, Carmen Embus-Córdoba, Vivian L. Rosero-Ruiz, Juliana Navarro-Yépez, Isabel C. Ortiz-Trujillo, y María C. Yépez-Chamorro. 2011. “Ausencia de efecto citotóxico, mutagénico y genotoxicode extracto acuoso y aceite esencial de *Carica*

candamarcensis hook (Plantae:Caricaceae)”. *Actual Biol* 33 (95): 153–64.

Mena-Huertas, S. J., J. P. García-López, y M. C. Nicola-Benavides, S. N., Yépez-Chamorro.

2016. “Cytotoxic and mutagenic innocuousness of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Ruta graveolens* L. as a promising complimentary treatment of *Helicobacter pylori* infection.” *Actualidades Biológicas* 38 (104): 37.

Mena-Huertas, S. J., J. P. García-López, S. N. Nicola-Benavides, y M. C. Yépez-Chamorro.

2016. “Inocuidad citotóxica y mutagénica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*. L y *Ruta graveolens* L. promisorios para el tratamiento complementario de la infección por *Helicobacter pylori*.” *Actualidades Biológicas* 38 (104): 37–44.

Merah, O., B. Sayed-Ahmad, T. Talou, Z. Saad, M. Cerny, S. Grivot, y A. ... Hijazi. 2020.

“Biochemical composition of cumin seeds, and biorefining study.” *Biomolecules* 10 (7): 1054.

Mojica, D. N., R. Y. Ramírez-Rueda, y M. I. Espitia. 2015. “Evaluación de la actividad

antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina.” *Salud Soc. Uptc.* 2 (1): 27–32.

Molina-Vargas, L. F., y S. E. Melo-Martínez. 2010. “Importancia del método estadístico para el

cálculo de la CE50 y CE95 de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kühn.” *Agronomía Colombiana* 38 (2): 235-244.

Mollinedo P., Marcela, y Cynthia Gonzáles V. 2014. “Bacterias Gram Negativas”. *Revista*

Actualización Clínica 49: 2609–13.

Montero, María Milagro. 2012. “*Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos

epidemiológicos, clínicos y terapéuticos”, 109. <http://hdl.handle.net/10803/107902>.

- Moruš, Martyna, Monika Baran, Magdalena Rost-Roszkowska, y Urszula Skotnicka-Graca. 2014. "Plant stem cells as innovation in cosmetics". *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 71 (5): 701–7.
- Nivia, Alejandro, Henry Castro, Fabián Parada, Ignacio Rodríguez, y Patricia Restrepo. 2007. "Aprovechamiento integral de la guayaba (*Psidium guajava* L.): I. obtención de extractos a partir de semillas utilizando como solvente CO₂ supercrítico". *Scientia et Technica* 33 (33): 79–82.
- Njateng, GSS, Z. Du, D. Gatsing, RS Mouokeu, Y. Liu, ... Zang, HX, y JR Kuate. 2017. "Propiedades antibacterianas y antioxidantes del extracto crudo, fracciones y compuestos de la corteza del tallo de *Polyscias fulva* Hiern (Araliaceae)." *Medicina complementaria y alternativa BMC* 17 (1): 1–8.
- Nodarse Hernández, Rafael, y Roberto del Campo Abad. 2013. "Staphylococcus aureus resistente a meticilina como causa de infección de piel y partes blandas". *Revista Cubana de Medicina Militar* 42 (1): 116–23.
- Nweze, C., H. Ibrahim, y G. I. Ndukwe. 2019. "Beta-sitosterol with antimicrobial property from the stem bark of pomegranate (*Punica granatum* Linn)". *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 23 (6): 1045–49.
- Ojewole, J. A. O. 2005. "Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn.(Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract." *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 27 (8): 547-554.
- Okoh, S. O., B. C. Iweriegbor, O. O. Okoh, U. U. Nwodo, y A. I. Okoh. 2016. "Bactericidal and antioxidant properties of essential oils from the fruits *Dennettia tripetala* G. Baker." *BMC*

complementary and alternative medicine 16 (1): 1-12.

OMS. 2005. *Manual de bioseguridad en el laboratorio*. Tercera ed. Ginebra.

<https://doi.org/10.1590/S0124-00642005000300007>.

OMS. 2017a. “Resistencia a los antimicrobianos”.

OMS, OPS -. 2017b. *Prevención Control de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud*.

Oteo, Jesús, y María Belén Aracil. 2015. “Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: Staphylococcus aureus resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas”. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33 (S2): 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(15\)30012-4](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(15)30012-4).

Oteo, Jesús, Elisenda Miró, María Pérez-Vázquez, y Ferran Navarro. 2014. “Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future?” *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 32 (4): 17–23.

Ovalle, María Victoria, y Sandra Saavedra. 2016. “Instituto Nacional de Salud (INS). Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2016”.

Pantoja-Chamorro, Ana L., Andrés M. Hurtado-Benavides, y Hugo A. Martínez-Correa. 2017. “Evaluación del Rendimiento, Composición y Actividad Antioxidante de Aceite de Semillas de Mora (*Rubus glaucus*) Extraído con CO₂Supercrítico”. *Informacion Tecnologica* 28 (1): 35–46. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100005>.

Pantoja-Chamorro, Ana Lucia;, Andres M.; Hurtado- Benavides, y Hugo A. Martinez-Correa. 2017. “Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims .)

procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO2 supercrítico”. *Agroindustria y Ciencia de los alimentos* 66 (2): 178–85.

Pantoja-Chamorro, Ana Lucia, Andrés Mauricio Hurtado-Benavides, y Hugo Alexander Martinez-Correa. 2017. “Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims.) procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO2 supercrítico”. *Acta Agronomica* 66 (2): 178–85. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.57786>.

Pantoja Chamorro, Ana Lucia. 2016. “Extracción de aceites con fluidos supercríticos a partir de semillas con potencialidad en la industria cosmética”, 130.
<http://www.bdigital.unal.edu.co/54767/>.

Pantoja Chamorro, Ana Lucía;, Andrés Mauricio; Hurtado Benavides, y Hugo Alexander Martinez Correa. 2017. “Caracterización de aceite de semillas de maracuyá (*Passiflora edulis* Sims.) procedentes de residuos agroindustriales obtenido con CO2 supercrítico”. *Acta Agronómica* 66 (2): 178–85. <https://doi.org/10.15446/acag.v66n2.57786>.

Paramythiotou, E., y C. Routsis. 2016. “Association between infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria and mortality in critically ill patients.” *World journal of critical care medicine* 5 (2): 111.

Pelegri, Patricia B., André M. Murad, Luciano P. Silva, Rachel C.P. dos Santos, Fabio T. Costa, Paula D. Tagliari, Carlos Bloch, Eliane F. Noronha, Robert N.G. Miller, y Octavio L. Franco. 2008. “Identification of a novel storage glycine-rich peptide from guava (*Psidium guajava*) seeds with activity against Gram-negative bacteria”. *Peptides* 29 (8): 1271–79.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.03.013>.

Pereira, CG, MO Marques, AC Siani, y MAA Meireles. 2003. : “: In Proceedings of the 6th

- International Symposium o”. En *Extracción supercrítica de alcaloides indólicos de Tabernaemontana catharinensis: una evaluación del codisolvente en las composiciones del extracto. En Actas del 6º Simposio Internacional sobre Fluidos Supercríticos, ISASF: Nancy, França, 47–52. Nancy, França.*
- Pérez, Marilyn Díaz, Claudio Rodríguez Martínez, y Raisa Zhurbenko. 2010. “Aspectos fundamentales sobre el género enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad”. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 48 (2): 147–61.
[https://doi.org/48\(2\)147-161](https://doi.org/48(2)147-161).
- Perry, N. B., G. D. Albertson, J. W. Blunt, A. L. J. Cole, M. H. G. Munro, y J. R. L. Walker. 1991. “4-Hydroxy-2-cyclopentenone: An anti-pseudomonas and cytotoxic component from passiflora tetrandra1.” *Planta médica* 57 (02): 129-131.
- Ponzilacqua, B., S. H. I. Lee, J. L. Zani, R. E. Rosim, C. H. Corassin, y C. A. F. Oliveira. 2018. “In Vitro Antimicrobial effects of Extracts from Leaves of Medicinal Herbs and Native Brazilian Plants.” *Current Agriculture Research Journal* 3. 6 (3): 243.
- Porres-Osante, Nerea, Vanesa Estepa, Cristina Seral, Beatriz Rojo-Bezares, Soledad Salvo, Sonia Algarate, Carmen Torres, Francisco Javier Castillo, y Yolanda Sáenz. 2014. “First description of a blaVIM-2-carrying *Citrobacter freundii* isolate in Spain”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (10): 6331–32. <https://doi.org/10.1128/AAC.03168-14>.
- Prabuseenivasan, Seenivasan, Manickkam Jayakumar, y Savarimuthu. Ignacimuthu. 2006. “In vitro antibacterial activity of some plant essential oils”. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>.
- Puerta-García, A, y F Mateos-Rodríguez. 2010. “Enterobacterias”. *Medicine* 10 (51): 3426–31.

[https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1).

- Puupponen-Pimiä, R., L. Nohynek, R. Juvonen, T. Kössö, P. Truchado, B. Westerlund-Wikström, y KM ... Oksman-Caldentey. 2016. "La fermentación y el fraccionamiento en seco aumentan la bioactividad de la mora de nube (*Rubus chamaemorus*).” *Química de los alimentos* 197: 950-958.
- Quispe, G. 2014. "Cocos Gram Positivos”. *Revista de Actualización Clínica* 49: 2603–8.
- Ramirez, L. S., y D. M. Castaño. 2009. "Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal”. *Scientia et technica* 15 (42): 263–68.
- Rangel, J. O., P. Lowy, y M. Aguilar. 1997. "Colombia diversidad biótica II: tipos de vegetación en Colombia. La distribución de los tipos de vegetación en Colombia.” Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM. 1997.
- Ranjbar, R., y S. Babaie. 2016. "Evaluation the antibacterial effects of *Echinophora platyloba* extracts against some *Salmonella* species.” *Electronic physician* 8 (2): 1943.
- Rashed, K. 2020. "Beta-Sitosterol Medicinal Properties: A Review Article”. *International Journal of Science Inventions Today* 9 (4): 208–12.
- Reverchon, E. D. 2006. "Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.” *The Journal of Supercritical Fluids* 38 (2): 146–66.
- Rodríguez Cabello, J., Y. Díaz Hernández, A. Pérez González, Z. Natali Cruz, y P. Rodríguez Hernández. 2014. "Evaluación de la calidad y el rendimiento en papaya silvestre (*Carica papaya* L.) de Cuba.” *Cultivos Tropicales* 35 (3): 36-44.

- Rodríguez Cabello, Jesus, Yusnier Díaz Hernández, Aymara Pérez González, Zulma Natali Cruz, y Pedro Rodríguez Hernández. 2014. "Evaluación de la Calidad y el Rendimiento en papaya silvestre (*Carica papaya* L .) de Cuba." *Cultivos Tropicales* 35 (3): 36–44.
- Rodríguez, M. P., B. G. Delgado, y B. R. H. Llamas. 2005. "Fitosteroles y Patentes: Sus Aplicaciones en la Industria Farmacéutica." *Revista Ciencias Biológicas* 36.
- Ronconi, MC, y LA Merino. 2003. "Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium resistentes a ampicilina (AMP) gentamicina (GEN), estreptomycin (EST) y vancomicina (VAN) aislados de materia fecal de pacientes pediátricos hospitalizados". *Universidad Nacional del Nordeste*, nº 12: 1–3. <http://www.iaea.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/3-Medicina/M-022.pdf>.
- Sabogal-Palma, A. C., J. Chávez, D. F. Oliveros-Gómez, E. Murillo-Perea, y J. J. Méndez-Arteaga. 2016. "Funcionalidades biológicas de *Passiflora maliformis* del sur macizo colombiano." *Bioagro* 28 (1): 003-012.
- Salomé-Abarca, Luis F., Ramón M. Soto-Hernández, Nicacio Cruz-Huerta, y Víctor A. González-Hernández. 2015. "Chemical composition of scented extracts obtained from *calendula officinalis* by three extraction methods". *Botanical Sciences* 93 (3): 633–38. <https://doi.org/10.17129/botsci.143>.
- Sánchez García, E., S. Castillo Hernández, y P. García Palencia. 2016. "Actividad antimicrobiana." *OmniaScience Monographs*.
- Sánchez, P., y M. J. Segundo. 2007. "Omega 7: su papel en el cuidado de la piel y las mucosas." *Offarm: farmacia y sociedad* 26 (7): 58–64.
- Sanhueza, J., Nieto, S., y A. Valenzuela. 2002. "Ácido linoleico conjugado: un ácido graso con

- isomería trans potencialmente beneficioso.” *Revista chilena de nutrición* 29 (2): 98-105.
- Sapaat, A., F. Satrija, H. H. Mahsol, y A. H. Ahmad. 2012. “Anthelmintic activity of papaya seeds on *Hymenolepis diminuta* infections in rats”. *Tropical Biomedicine* 29 (4): 508–12.
- Seleshe, S., J.S. Lee, S. Lee, H.J. Lee, G.R. Kim, ... Yeo, J., y S.N. y Kang. 2017. “Evaluación de las actividades antioxidantes y antimicrobianas de extractos etanólicos de tres tipos de fresas.” *Nutrición preventiva y ciencia de los alimentos* 22 (3): 203.
- Sen, A., P. Dhavan, K. K. Shukla, S. Singh, y G. Tejavathi. 2012. “Analysis of IR, NMR and antimicrobial activity of β -sitosterol isolated from *Momordica charantia*.” *Sci Secure J Biotechnol* 1 (1): 9–13.
- Shrestha, Prasanna M., y Shivcharn S. Dhillion. 2003. “Medicinal plant diversity and use in the highlands of Dolakha district, Nepal”. *Journal of Ethnopharmacology* 86 (1): 81–96.
[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00051-5).
- SIB Colombia. 2018. “¿Cuántas especies registradas hay en Colombia?: Biodiversidad en cifras.” 2018.
<http://reporte.humboldt.org.co/biodiversidad/referencias.php?year=2018#203>.
- Solís Fuentes, J.A., C. Amador Hernández, M.R. Hernández Medel, y Carmen Durán de Bazúa. 2010. “Caracterización fisicoquímica y comportamiento térmico del aceite de ‘almendra’ de guanábana (*Annona muricata*, L)”. *Grasas y aceites* 61 (1): 58–66.
<https://doi.org/10.3989/gya.064309>.
- Sora, Angel Dayron, Gerhard Fischer, y Rafael Flórez. 2006. “almacenamiento refrigerado de frutos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) en empaques con atmosfera modificada.” *Fisiología y Tecnología Poscosecha* 24 (2): 306–16.

- Suwalsky, M., P. Vargas, M. Avello, F. Villena, y C. P. Sotomayor. 2008. "Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of *Aristolelia chilensis* (Maqui) leaves." *International Journal of Pharmaceutics* 365 (1–2): 85–90.
- Tavares, L.S., J.V. Rettore, R.M. Freitas, W.F. Porto, AP do Nascimento Duque, J. de Lacorte Singulani, ..., y M. de Oliveira Santos. 2012. "Actividad antimicrobiana de Pg-AMP1 recombinante, un péptido rico en glicina de semillas de guayaba." *Péptidos* 37 (2): 294-300.
- Tittikpina, N. K., F. Nana, S. Fontanay, S. Philippot, K. Batawila, K. Akpagana, ... And, y R. E. Duval. 2018. "Antibacterial activity and cytotoxicity of *Pterocarpus erinaceus* Poir extracts, fractions and isolated compounds". *Journal of ethnopharmacology* 212: 200–207.
- Uche-Okerefor, N., T. Sebola, K. Tapfuma, L. Mekuto, y V. Green, E., Mavumengwana. 2019. "Antibacterial activities of crude secondary metabolite extracts from *Pantoea* species obtained from the stem of *Solanum mauritianum* and their effects on two cancer cell lines." *International journal of environmental research and public health* 16 (4): 602.
- Valgas, C., S. M. D. Souza, E. F. Smânia, y A. Smânia Jr. 2007. "Screening methods to determine antibacterial activity of natural products." *Brazilian journal of microbiology* 38: 369-380.
- Vázquez de Frutos, L. 2008. "Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales." Universidad Autónoma de Madrid.
- Velasco, Reinaldo J, Héctor S Villada, y Jorge E. Carrera. 2007. "Applications of Supercritical Fluids in the Agroindustry". *Información tecnológica* 18 (1): 53–66.
- Viganó, Juliane, Ana Paula da Fonseca, y Julian Martinez. 2014. "Sub- and supercritical fluid technology applied to food waste processing". *Supercritical Fluids*, 149–66.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.09.026>.

Wang, C. M. 2017. “Anti-proliferative activity of triterpenoids and sterols isolated from *Alstonia scholaris* against non-small-cell lung carcinoma cells. X”. *Molecules*. 22 (12): 2119.

Woerther, Paul Louis, Charles Burdet, Elisabeth Chachaty, y Antoine Andremont. 2013. “Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -lactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M”. *Clinical Microbiology Reviews* 26 (4): 744–58.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13>.

Wolfe, Kelly, Xianzhong Wu, y Rui Hai Liu. 2003. “Antioxidant activity of apple peels”.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (3): 609–14.

<https://doi.org/10.1021/jf020782a>.

Xiang, Hongping, Lanyue Zhang, Zhiwen Yang, Feng Chen, Xi Zheng, y Xiaoxuan Liu. 2017.

“Chemical compositions, antioxidative, antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activities of *Curcuma aromatica* Salisb. essential oils”. *Industrial Crops and Products* 108 (May): 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.058>.

Yam Tzec, José Antonio, Carlos Alberto Villaseñor Perea, Eugenio Kriuchkova Romantchik,

Martín Soto Escobar, y Miguel Ángel Peña Peralta. 2010. “Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha”. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 19 (4): 74–82.

<http://scielo.sld.cu/pdf/rcta/v19n4/rcta12410.pdf>.

Yeganegi, Marzie, Farideh Tabatabaei Yazdi, Seyed Ali Mortazavi, Javad Asili, Behrooz

Alizadeh Behbahani, y Adel Beigbabaie. 2018. “*Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some

pathogenic strain causing poisoning and infection”. *Microbial Pathogenesis* 116: 62–67.

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.014>.

Zampini, Catiana, Norma Cudmani, y María Inés Isla. 2007. “Antimicrobial activity of Argentine medicinal plants on antibiotic-resistant bacteria”. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 41 (3): 385–93. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S0325-29572007000300013&script=sci_arttext&tlng=pt.

12. Anexos

12.1 Anexo Prueba confirmatoria: *E. coli* vs AV de semillas

AV. semillas	REPLICA	<i>E. coli</i> (UFC/10 μ L)		
		900 μ L/mL	750 μ L/mL	500 μ L/mL
<i>P. edulis</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>R. glaucus</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>A. muricata</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>P. guajava</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
C. Negativo		0		
C. Positivo		>100.000		

Anexo 12.2 Prueba confirmatoria: *K. pneumoniae* vs AV de semillas

<i>A. semillas</i>	REPLICA	<i>K. pneumoniae</i> (UFC/10 μ L)		
		900 μ L/mL	750 μ L/mL	500 μ L/mL
<i>P. edulis</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>A. muricata</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>P. guajava</i>	1	0	0	>100.000
	2	0	0	>100.000
	3	0	0	>100.000
<i>S. betaceum</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>R. glaucus</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
C. Negativo			0	
C. Positivo			>100.000	

Anexo 12.3 Prueba confirmatoria: *P. aeruginosa* vs AV de semillas

A. semillas	REPLICA	<i>P. aeruginosa</i> (UFC/10 µL)		
		900 µL/mL	750 µL/mL	500 µL/mL
<i>A. muricata</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>C. papaya</i>	1	0	60.000	>100.000
	2	0	65.000	>100.000
	3	0	86.000	>100.000
<i>S. quitoense</i>	1	0	0	>100.000
	2	0	0	>100.000
	3	0	0	>100.000
<i>P. guajava</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>S. betaceum</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>P. edulis</i>	1	>100.000	>100.000	>100.000
	2	>100.000	>100.000	>100.000
	3	>100.000	>100.000	>100.000
<i>M. indica</i>	1	0	0	>100.000
	2	0	0	>100.000
	3	0	0	>100.000
<i>R. glaucus</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
C. Negativo			0 UFC	
C. Positivo			>100.000	

Anexo 12.4 Prueba confirmatoria: *S. aureus* vs AV de semillas

A. semillas	REPLICA	<i>S. aureus</i> (UFC/10 μ L)		
		900 μ L/mL	750 μ L/mL	500 μ L/mL
<i>P. edulis</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>A. Muricata</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>S. betaceum</i>	1	0	5.000	>100.000
	2	0	12.000	>100.000
	3	0	48.000	>100.000
<i>S. quitoense</i>	1	0	0	>100.000
	2	0	0	>100.000
	3	0	0	50.000
<i>P. guajava</i>	1	0	20.000	80.000
	2	0	49.000	30.000
	3	0	32.000	50.000
C. Negativo			0	
C. Positivo			>100.000	

Anexo 12.5 Prueba confirmatoria: *E. faecalis* vs AV de semillas

A. semillas	REPLICA	<i>E. faecalis</i> (UFC/10 µL)		
		900 µL/mL	750 µL/mL	500 µL/mL
<i>S. betaceum</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>P. edulis</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>R. glaucus</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>A. muricata</i>	1	50.000	>100.000	>100.000
	2	20.000	>100.000	>100.000
	3	40.000	>100.000	>100.000
<i>P. guajava</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
<i>C. papaya</i>	1	0	59.000	>100.000
	2	0	50.000	>100.000
	3	0	30.000	>100.000
<i>S. quitoense</i>	1	0	>100.000	>100.000
	2	0	>100.000	>100.000
	3	0	>100.000	>100.000
C. Negativo			0	
C. Positivo			>100.000	

Anexo 12.6 Aval Comité de Ética de la Universidad de Nariño

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Acta de Aprobación No. 055

El Comité de Ética en Investigación creado mediante Resolución Rectoral No.1608 de abril 20 del 2010, mediante la cual se define al Comité como *"un organismo evaluador y avalador de los aspectos éticos y legales de las investigaciones en salud humana, biomédica con animales y aquellas que representen riesgos no controlado con la contaminación del medio ambiente"*. El Comité de Ética en Investigación se rige por la Resolución No. 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia y demás disposiciones éticas y bioéticas exigidas para la investigación científica a nivel internacional, nacional y normas internas de la Universidad de Nariño.

Que en relación al proyecto de investigación denominado **"ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y CITOTÓXICA IN VITRO DE ACEITES VEGETALES DE SEMILLAS DE FRUTAS TROPICALES Y ANDINAS"**, coordinado por la Docente Orfa Alexandra España Jojoa. El Comité de Ética en Investigación certifica que

1. Los integrantes del proyecto de investigación en mención adjuntaron los siguientes documentos:
 - Proyecto de investigación.
 - Aval Institucional.
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación.
3. El periodo de aprobación del proyecto de investigación es por veinticuatro (24) meses correspondiente al cronograma propuesto por los investigadores.
4. El investigador principal deberá informar al Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño a saber:
 - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgo para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso en las primeras 24 horas de ocurrido.
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. Cualquier decisión tomada por otros Comités de Ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto junto con las razones que conllevaron a tomar esta decisión.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Acta de Aprobación No. 055

5. Sistema de Información especificando cambios, observaciones o sugerencias relacionados con los aspectos éticos evidenciados en el desarrollo del proyecto de investigación.
 - a. En caso de no presentar informe de actividades, el Comité de Ética en Investigación tomará medidas acordes para cada caso.
6. El Comité de Ética en Investigación informará de manera inmediata a las directivas institucionales toda novedad revisada y aprobada del presente proyecto.

Por medio de la presente, el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño, avala el proyecto denominado "**ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y CITOTÓXICA IN VITRO DE ACEITES VEGETALES DE SEMILLAS DE FRUTAS TROPICALES Y ANDINAS**", en el marco de la Resolución No. 008430 de octubre 4 de 1993 del Ministerio de Salud, la Resolución No. 0068 de enero 22 de 2002 del Ministerio del Medio Ambiente, el Decreto 1376 de junio 23 de 2013 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, el Manual de Bioseguridad en el laboratorio de 2005 de la OMS, la guía para el transporte de sustancias infecciosas 2017- 2018 de la OMS, el Manual de Normas y Procedimientos de Bioseguridad para Laboratorios de la Universidad de Nariño, el Reglamento del Comité de Ética en Investigación y demás disposiciones éticas exigidas para la investigación científica.

Dado en San Juan de Pasto el día veintiséis (26) del mes de septiembre del dos mil dieciocho (2018).



ELIZABETH OJEDA ROSERO
Presidente

Proyectó: Madelyn Matabranchoy

Anexo 12.7 Carta de aceptación de la Clínica PROINSALUD S.A.S. para la donación de cepas bacterianas resistentes

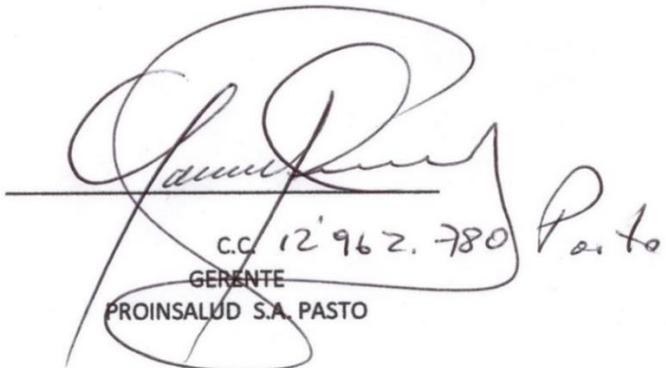
San Juan de Pasto, 12 de febrero de 2018

**Señores
UNIVERSIDAD DE NARIÑO
Pasto.**

La bacterióloga **ALEXANDRA ESPAÑA JOJOA**, docente de la Universidad de Nariño adscrita al departamento de Biología, nos ha dado a conocer su propuesta de investigación "Actividad Antibacterial y Citotóxica *in vitro* de Aceites Vegetales de Semillas de Frutas Tropicales y Andinas." Consideramos que es una propuesta viable e interesante, la cual podemos apoyar con la donación de cepas bacterianas aisladas de pacientes.

Todos los procesos se desarrollaran de acuerdo a los protocolos y manuales de bioseguridad establecidos por la OMS y con el apoyo de la Dra. Liliana Garcia, coordinadora de laboratorio clínico o quien designe la gerencia de Proinsalud.

Cordialmente



c.c. 12'962.780 Pasto.
GERENTE
PROINSALUD S.A. PASTO

Anexo 12.8 Protocolo de manejo de material biológico

PROTOCOLO DE BIOSEGURIDAD

I. PROPÓSITO:

Este protocolo establece los aspectos técnicos y administrativos relacionados al transporte, manejo y eliminación de las cepas bacterianas donadas por la Clínica PROINSALUD S.A con el fin de disminuir el riesgo para el personal que las manipulan y la comunidad.

II. ALCANCE

1.- Este documento imparte indicaciones de bioseguridad tanto para el personal que dona las cepas: laboratorio Clínico PROINSALUD S.A. como para la responsable del Proyecto: Actividad Antibacterial y Citotóxica *in vitro* de Aceites Vegetales de Semillas de Frutas Tropicales y Andinas,

Alexandra España Jojoa.

2.- Este procedimiento incluye la recolección, transporte, activación, almacenamiento y disposición final de las cepas.

III. OBJETIVO

Establecer el procedimiento de transporte, activación, almacenamiento y disposición final de residuos biológicos generados en el proceso de investigación: Actividad Antibacterial y Citotóxica *in vitro* de Aceites Vegetales de Semillas de Frutas Tropicales y Andinas.

IV. RESPONSABILIDADES

1.- Investigador: Alexandra España Jojoa.

2.- Coordinador del laboratorio Clínico PROINSALUD S.A.

1. Transporte de microorganismos:

Una vez aislado, identificado y realizado el antibiograma a las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* en el laboratorio clínico de PROINSALUD S.A., se procederá a comunicar con la bacterióloga Alexandra España Jojoa responsable del proyecto, quien recogerá la muestra del cultivo, el procedimiento de transporte de una institución a otra será el de triple envase que

cumple con las especificaciones 6.2 de NACIONES UNIDAS, este sistema consiste en embalar la muestra de la siguiente manera:

- Recipiente primario (medio de transporte Cary Blair que contiene a la muestra): es un envase resistente al agua, con cierre hermético para evitar cualquier derrame o fuga. Este recipiente perfectamente rotulado va envuelto en material absorbente para contener los líquidos en caso de pérdida o rotura. Se verificará que este envase en su exterior no estará contaminado con materiales biológicos.

- Recipiente secundario: es un envase resistente, impermeable, que contiene y protege al recipiente primario.

- Recipiente terciario (envoltorio externo): el recipiente secundario se coloca en un envoltorio externo que lo protege a él y a su contenido de influencias externas como daño físico y agua mientras está en tránsito. Este recipiente estará etiquetado con la indicación de su contenido, con los datos e identificación de las muestras y marcado con el logotipo UN 2814.

Toda la información que identifica a la muestra se coloca por afuera del recipiente secundario, otra copia se entregará a la bacterióloga responsable del transporte y una tercera queda como soporte para el Laboratorio Clínico de PROINSALUD S.A.

El transporte de PROINSALUD S.A. hasta la Universidad de Nariño área del Cepario, se realizará en vehículo particular, este llevará el equipo de protección personal (guantes, tapabocas, gafas, blusa anti-fluidos, agua) y un recipiente con desinfectante a base de cloro con la cual se realizará la desinfección al finalizar el trayecto.

En caso de accidente en el transporte si los contenedores se dañan se informará al Laboratorio Clínico de PROINSALUD S.A. y a las autoridades sanitarias y al mismo tiempo se procederá a resguardar el contenido biológico de la siguiente manera:

- Colocarse el equipo de protección personal
- Tomar el paquete y colocarlo dentro de una bolsa plástica, descartando los guantes dentro de ella.
- Sellar la bolsa y dejarla en un lugar seguro.
- Desinfectar el área contaminada si ha habido derrame del contenido.
- Lavarse cuidadosamente las manos.

Apertura de los recipientes:

Las muestras se desenvolverán dentro de una bandeja con desinfectantes para evitar posible contaminación del área de trabajo.

2. Activación y Desarrollo de las pruebas:

Una vez lleguen las muestras al Cepario de la Universidad de Nariño, se procederá a repicar los cultivos en medios selectivos para su activación y posteriormente se realizarán los ensayos a lugar.

3. Conservación:

Las cepas donadas se conservarán en refrigeración a 4°C hasta la realización de las pruebas objeto de esta investigación y únicamente de ella, para la obtención de los datos a que dieran lugar.

4. Inactivación y disposición final:

Los cultivos de las cepas bacterianas se eliminarán de la siguiente manera:

- Esterilización en autoclave: 121°C, 15lb/p, 30 min).
- Eliminación de los medios de cultivo en bolsa roja.
- Recolección de las bolsas por parte del personal de servicios generales para su depósito en los sitios dispuestos por la Universidad de Nariño.
- Retiro de las bolsas rojas por la empresa contratada para su disposición final (EMAS).

Anexo 12.9

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Título de la investigación: Actividad Antibacterial y Citotóxica *in vitro* de Aceites Vegetales de Semillas de Frutas Tropicales y Andinas.

CONSENTIMIENTO INFORMADO O AUTORIZACIÓN PARA ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Yo, _____ mayor de edad e identificado(a) con cédula de ciudadanía No. _____ de _____, actuando en nombre propio.

DECLARO:

Que he recibido toda la información clara y concreta por parte de **ORFA ALEXANDRA ESPAÑA JOJOA**, estudiante de la maestría en Ciencias Biológicas, Universidad de Nariño el día ___ del mes de _____ del año _____, sobre el trabajo de investigación relacionado con la: “**Actividad Antibacterial y Citotóxica *in vitro* de Aceites Vegetales de Semillas de Frutas Tropicales y Andinas**”.

” Para el cual es crucial la extracción de sangre por punción venosa en adultos en buen estado de salud (mayores de 18 años de edad) para extracción de Eritrocitos y Leucocitos. Que será realizado bajo su responsabilidad, **de acuerdo a la resolución 8430 de 1993, (Cap.1 Art.11 - Art. 15, en el cual se hace aclaración que es una investigación con riesgo mínimo)** y con asesoría de **JAQUELINE MENA HUERTAS**, docente del programa de Biología e integrante del grupo de investigación de Salud Pública y con apoyo del Centro de Estudios en Salud; **para participar en el trabajo de investigación que tiene como objetivo** “Determinar a nivel *in vitro* la actividad citotóxica sobre eritrocitos y leucocitos humanos y la actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y Negativas, de aceites vegetales obtenidos mediante fluidos supercríticos de semillas de ocho frutas tropicales y andinas cultivadas en el departamento de Nariño”.

Me ha advertido que en la Investigación en que participo, **en ningún momento se hará público mi nombre y/o documento de identificación**, como tampoco saldrán a la luz pública hechos relacionados que puedan identificarme y sobre los cuales se guardarán siempre y en todo momento del estudio, toda las reservas y discrecionalidades correspondientes.

Me ha explicado y he comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito del estudio aludido y de las posibles implicaciones que podría tener al **donar 5 ml de sangre periférica para el estudio. Me han explicado que la toma de muestra la realizará un profesional de salud.** He podido preguntar mis inquietudes al respecto y recibido las respuestas y explicaciones en forma satisfactoria.

También se me ha informado de mi derecho a rechazar esta autorización o revocarla cuando así yo lo requiera.

He sido interrogado (a) sobre la aceptación o no, de esta autorización para este estudio, por lo tanto,

AUTORIZO:

Para que **ORFA ALEXANDRA ESPAÑA JOJOA, JAQUELINE MENA HUERTAS y el grupo de investigación Salud Publica realice la investigación correspondiente** (Actividad Antibacterial y Citotóxica *in vitro* de Aceites Vegetales de Semillas de Frutas Tropicales y Andinas).

Se firma el presente documento a los _____ días del mes _____ del Año_____.

Firma y c.c. del Autorizado o del tutor

Firma y c.c. del Investigador _____

Nombre, firma y c.c. de Testigo

Nombre, firma y c.c. de Testigo

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en IAAS. Grupo de Microbiología

Anexo 12. 10. Financiación del proyecto.



Universidad de Nariño
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES,
POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES

ACUERDO No. 122 (septiembre 25 de 2018)

Por el cual se aprueba un Proyecto de Investigación Docente para su ejecución y financiación.

EL COMITÉ DE INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO
En uso de sus atribuciones estatutarias y reglamentarias y,

CONSIDERANDO:

Que mediante Acuerdo No. 039 del 24 de abril de 2018 emanado de este organismo, se expidió la Reglamentación y el Calendario de la Convocatoria anual para conformar un Banco de Proyectos Docentes de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico, Innovación y Creación Artística, elegibles para ser financiados por la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales.

Que los profesores Orfa Alexandra España Jojoa, Andres Mauricio Hurtado Benavides y Sandra Jaqueline Mena Huertas, adscrito(as) al (los) Departamento(s) de Biología y Procesos Industriales, presentaron el proyecto "Actividad antibacterial y citotóxica in vitro de aceites vegetales de semillas de frutas tropicales y andinas.", con código 1617, el cual, una vez surtido el proceso de la convocatoria, es financiable.

Que es necesario expedir el acto administrativo de aprobación del proyecto y definir las condiciones básicas para su ejecución.

Que el proyecto cumple con los requisitos exigidos en la Convocatoria de Investigación Docente 2018.

ACUERDA

- ARTÍCULO 1°. Aprobar el proyecto de investigación "Actividad antibacterial y citotóxica in vitro de aceites vegetales de semillas de frutas tropicales y andinas." a los profesores Orfa Alexandra España Jojoa Andres Mauricio Hurtado Benavides y Sandra Jaqueline Mena Huertas, adscritos a los Departamentos de Biología y Procesos Industriales, el cual tendrá una duración de 24 meses para su ejecución.
- ARTÍCULO 2°. Aprobar la participación de los estudiantes auxiliares de la investigación: Andres Francisco Ortiz Sotelo, Sebastian Eraso Castillo y Maria Helena Zuñiga.
- ARTÍCULO 3°. El proyecto de investigación estará coordinado por la profesora Orfa Alexandra España Jojoa, identificada con cédula de ciudadanía No. 30.745.236.
- ARTÍCULO 4°. Adjudicar recursos por valor de TREINTA Y UN MILLONES DOSCIENTOS CUARENTA Y NUEVE MIL SEISCIENTOS OCHENTA PESOS MDA. CTE. (\$31.249.680), según certificado de disponibilidad presupuestal No. 3594-1 de 2018, para garantizar el desarrollo del proyecto.
- ARTÍCULO 5°. El desarrollo del proyecto se regirá según lo establecido en el Acuerdo No. 039 del 24 de abril de 2018 emanado de este organismo y la ejecución de los recursos se sujetará al presupuesto presentado en el proyecto, cumpliendo con las normas fiscales nacionales e institucionales establecidas para el manejo de dineros públicos. Los avances y el plazo para la legalización de los mismos serán autorizados mediante resolución emitida por la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales.
- Parágrafo: El primer desembolso debe solicitarse máximo hasta el 30 de octubre de 2018, de lo contrario se asume que el proyecto no se desarrollará.



Universidad de **Nariño**
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES,
POSTGRADOS Y RELACIONES INTERNACIONALES

ACUERDO No. 122
(septiembre 25 de 2018)

- ARTÍCULO 6°. Se iniciará con la ejecución de recursos una vez esté firmada el acta de cumplimiento, por el(la) Coordinador(a) del proyecto y los Coinvestigadores.
- ARTÍCULO 7°. Los investigadores deben cumplir con la presentación de un informe parcial cada 6 meses y uno final, además de los demás compromisos establecidos en el acta de cumplimiento suscrita por el docente responsable.
- ARTÍCULO 8°. Los docentes con vinculación por hora cátedra y tiempo completo ocasional que lideren proyectos, deberán suscribir una póliza de cumplimiento del 20% del valor total del proyecto, la cual debe tener vigencia del tiempo establecido para el desarrollo del proyecto más seis meses.
- ARTÍCULO 9°. La Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales, Departamento de Biología y Procesos Industriales, anotarán lo de su cargo.

COMUNÍQUESE Y CÚMPLASE

Dado en San Juan de Pasto, a los 25 días del mes de septiembre de 2018.

ELIZABETH OJEDA ROSERO
Presidente

MARÍA CONSTANZA CABRERA DULCE
Secretaria

Anexo 12.11 Constancias de participación en congresos.

 <p>P²⁰¹⁹amm Pacific Microbial Meeting</p>	 <p>UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI</p>	 <p>UNIVERSIDAD SANTIAGO DE CALI CIENCIAS BÁSICAS</p>
<h2>La Universidad Santiago de Cali</h2>		
<p>Da constancia que el trabajo titulado: EFEECTO IN VITRO DE ACEITES VEGETALES DE SEMILLAS RESIDUALES DE FRUTAS TROPICALES Y ANDINAS SOBRE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS</p>		
<p>Orfa Alexandra España Jojoa, Soany Karola Eraso Grisalez, Andrés Mauricio Hurtado Benavides, Jaqueline Mena Huertas</p>		
<p>Fue presentado en calidad de PONENCIA ORAL en el Pacific Microbial Meeting 2019, realizado los días 22 y 23 de agosto de 2019.</p>		
<p>Santiago de Cali, 23 de agosto de 2019</p>		
 Dr. Jorge Eliecer Olaya Garcerá Director general de Extensión y Proyección social	 Dr. Edwin Florez López Decano Facultad de Ciencias Básicas	

ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICASPERSONERÍA JURÍDICA 05547 – Diciembre 16 de 1974
NIT. 805.014.676-1"50 años promoviendo el Desarrollo, Investigación, Enseñanza y
Divulgación de las Ciencias Biológicas"**LV CONGRESO NACIONAL Y VI INTERNACIONAL VIRTUAL DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS
Noviembre 5-7 DEL 2020**

Santiago de Cali, 02/02/2021

La Asociación colombiana de Ciencias Biológicas certifica que el trabajo:

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ACEITES DE SEMILLAS DE
SOLANÁCEAS****Autores :** Alexandra España Jojoa, Jaqueline Mena Huertas, Andrés Mauricio
Hurtado BenavidesFue presentado en el LV Congreso Nacional y VI Internacional Virtual de Ciencias
Biológicas, realizado del 5 al 7 de Noviembre del 2020

LINA JOHANNA MORENO GIRALDO

M.D., Esp., MSc., PhD (c)

Presidente LV Congreso Nacional y VI Internacional Virtual de Ciencias Biológicas

Presidente ACCB- Capítulo Valle – Fiscal JDN ACCB

Teléfonos de Contacto: 318 6538236

E-mail: accb55congresovirtual@gmail.com

Calle 23N No. 19-47 Mz C casa 16 – Armenia Quindío. Móvil Tl 3108467710.

www.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.orgE-mail: secretariatecnicaaccb@gmail.comaccb55congresovirtual@gmail.com



CERTIFICA QUÉ

**ORFA ALEXANDRA ESPAÑA
JOJOA**

ASISTIÓ AL LV CONGRESO NACIONAL Y VI INTERNACIONAL DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS VIRTUAL EN CALIDAD DE

PONENTE

Dr. Lina Moreno

Presidente LV Congreso Nacional y VI
Internacional de Ciencias Biológicas Virtual

Dr. Jaime de la Ossa

Presidente Nacional ACCB 2019-2020

Anexo 12.12 Artículo sometido para publicación



September 21, 2021

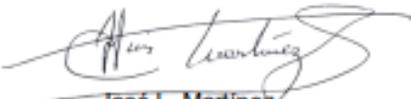
**Dr.
Orfa A. España**
Universidad de Nariño
Pasto
Colombia

Dear Dr. España:

In reference to your article titled: "**Actividad biológica de los aceites de semillas de Annona muricata y A. cherimola**", of the authors **Orfa A. España, Andrés F. Ortiz, Soany Eraso, Andrés M. Hurtado y Jaqueline Mena** been received on September 21th, 2021 and has been assigned the number **BLACPMA No. 2084**.

Remember that as of September 15, 2020, all articles received and accepted must pay US\$ 428.

Sincerely



José L. Martínez
Editor in Chief BLACPMA

MS-EDITIONS

**BLACPMA is an electronic publication ISSN 0717 7917 edited and published by MS-EDITIONS
Indexed in SCOPUS, EMBASE, Science Citation Index Expanded (SCISEARCH),
Journal Citation Reports/Science Edition, Biological Abstracts,
BIOTHOMSON Reuters Master Journal List, NAPRALERT, CAB International
(CAB Abstracts), GlobalHEALTH, Index Copernicus, IMBIOMED, LATINDEX,
QUALIS, REDALYC, CAB DIRECT, SCIRUS, EBSCO, Biblioteca Virtual da Saude (BVS)**