



UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LA RUMPA,
FRUTO DEL COPAO (*Eulychnia acida Phil.*)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA

ALUMNA: SILVANA EDITH RAMOS SAZO
PROFESORA GUÍA: DRA. MARIA DEL PILAR
CARAMANTÍN SORIANO
PROFESORA CO-GUÍA: DRA. TM. VERÓNICA
CARRASCO SÁNCHEZ

TALCA - CHILE
2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mis padres María Soledad y José Enrique por apoyarme y estar conmigo en cada decisión que he tomado durante este largo camino universitario. A mis hermanos Maritza Belén y Gerardo Enrique por ser los incondicionales en mi vida y estar en los momentos difíciles al pie del cañón. Todos ustedes son el pilar fundamental de mi vida.

Agradezco a todos los profesores de esta casa de estudio, sobre todo de la Escuela de Tecnología Médica que contribuyeron en mi formación profesional, en especial a las profesoras del área de Microbiología y a la profesora Paulina Abaca por apoyarme tan de cerca en la partida de mi abuela cuando cursaba su ramo. Mención especial a la profesora Patricia Poblete Tapia que fue mi DT en el Laboratorio de Investigación de Microbiología Clínica, agradecida por la paciencia, las horas de trabajo y toda la ayuda prestada para la realización de este trabajo de tesis. Al Laboratorio de Plantas Aromáticas del Instituto de Química de Recursos Naturales por toda la infraestructura prestada, a su recurso humano el profesor John, profesora Radha y sobre todo Ram y Reddy por enseñarme su cultura, alimentarme en las largas horas de trabajo y alegrarme las tardes.

A mis compañeros Héctor Valdés, Leclee Guerrero y Jesús Saavedra; por estar conmigo siempre, por ayudarme y soportarme durante todo el estrés que conllevó este semestre. A mis profesoras guías, Verónica y Patricia quienes a parte de su excelente labor académica confiaron en mi trabajo y tuvieron la disposición de ayudarme en todo momento y a mi profesora tutora María del Pilar por darme la oportunidad de sin conocerme desarrollar esta memoria, por guiarme en lo académico como en lo personal, darme las herramientas y creer en mis capacidades.

Silvana Edith Ramos Sazo

ÍNDICE

	Páginas
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	10
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 Antibióticos.....	12
3.2 Resistencia bacteriana.....	13
3.3 Mecanismos de resistencia bacteriana.....	14
3.4 Microorganismos de interés clínico humano.....	15
3.5 Sustancias naturales utilizadas como antimicrobianos.....	18
3.6 Características de <i>Eulychnia acida Phil</i>	21
3.7 Características y composición química del fruto del Copao.....	23
3.8 Principales características de los solventes a ocupar.....	25
3.9 Cromatografía en capa fina.....	27
3.10 Cromatografía en columna.....	28
3.11 Bioautografía.....	29
3.11.1 Bioautografía por inmersión o suspensión en agar.....	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo General.....	31
4.2 Objetivos Específicos.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
6. RESULTADOS	41
7. DISCUSIÓN	55
8. CONCLUSIÓN	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE FIGURAS

		Páginas
FIG 1.	Copao un cactáceo nativo.....	22
FIG 2.	Fruto del Copao característico encontrado en la Región de Coquimbo.....	24
FIG 3.	Cromatografía en Capa Fina.....	28
FIG 4.	Frutos del Copao trabajados en el laboratorio.....	33
FIG 5.	Extractos del fruto del Copao obtenidos.....	35
FIG 6.	Actividad antibacteriana de los extractos A, B, C, D y E.....	44
FIG 7.	Actividad antibacteriana de los extractos F, G, H, I y J.....	45
FIG 8.	Actividad antibacteriana de los extractos K, L, M, N, O y P.....	46
FIG 9.	Cromatografía en capa fina de los extractos.....	47
FIG 10.	Zonas de inhibición de los extractos B (EAEPR0319), D (EAECR0319), M (EAEPV0419) y N (EAECV0419) en distintas cepas bacterianas.....	47
FIG 11.	Zonas de inhibición de los extractos B (EAEPR0319), D (EAECR0319), M (EAEPV0419) y N (EAECV0419) en distintas cepas bacterianas con revelador MTT.....	48
FIG 12.	Cromatografía en capa fina de las fracciones EAEPR.....	51
FIG 13.	Cromatografía en capa fina de las fracciones EAECR.....	52
FIG 14.	Actividad antimicrobiana de las fracciones sobre <i>B. cereus</i>	52
FIG 15.	Actividad antimicrobiana de las fracciones sobre <i>S. sonnei</i>	53
FIG 16.	Revelado de las fracciones con luz UV y DPPH.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
TABLA 1: GRUPOS QUÍMICOS MÁS IMPORTANTES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA OBTENIDOS DE PLANTAS.....	19
TABLA 2: COMPUESTOS QUÍMICOS MENOS FRECUENTES AISLADOS A PARTIR DE PLANTAS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA.....	21
TABLA 3: CARACTERÍSTICAS DE LOS SOLVENTES OCUPADOS.....	27
TABLA 4: DENOMINACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON SU RESPECTIVA LETRA Y ABREVIACIÓN.....	34
TABLA 5: SOLVENTES UTILIZADOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO B.....	39
TABLA 6: SOLVENTES UTILIZADOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO D.....	39
TABLA 7: RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO NATIVO COPAO ROJO-MORADO.....	41
TABLA 8: RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO NATIVO COPAO VERDE EN PUNTA.....	41
TABLA 9: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE <i>EULYCHNIA ACIDA PHIL</i>	43
TABLA 10: ENSAYO DE BIOAUTOGRAFÍA DE LOS EXTRACTOS DE ACETATO DE ETILO CON PLACAS CCF.....	49

TABLA 11:	MASA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO B..	50
TABLA 12:	MASA DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO D..	51
TABLA 13:	ENSAYO DE BIOAUTOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	54

ABREVIATURAS

AE: Acetato de Etilo

BHI: Brain Heart Infusion

DPBA: 2-Aminoetildifenilo borato

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

CC: Cromatografía en Columna

CCF: Cromatografía en Capa Fina

MH: Agar Müller Hinton

MTT: 2:3:5 cloruro de trifenil tetrazolium

UV: Espectro Ultravioleta

1. RESUMEN

A nivel mundial la principal amenaza en la terapia antimicrobiana es el desarrollo de microorganismos resistentes generados principalmente por el uso excesivo e inadecuado de antibióticos en pacientes y ganado faenados. En la actualidad, se están desarrollando diversas acciones al respecto que abarcan tanto la salud humana como animal, vegetal y medioambiental.

Eulychnia acida Phil. es un árbol cactáceo y endémico de las zonas áridas del norte de Chile, poseen frutos denominados “Rumpa” que tienen un sabor ácido y refrescante.

En este trabajo de investigación se obtuvieron extractos orgánicos de la Rumpa, colectados en el norte de Chile, específicamente en la Región de Coquimbo. Estos frutos fueron clasificados en el laboratorio como variedad rojo-morado y variedad verde en punta. Los rendimientos de los extractos orgánicos abarcó un rango desde $6 \times 10^{-4}\%$ hasta 1,5%, dónde el extracto etanólico resultó ser el de mayor rendimiento con respecto a los extractos hexánicos, acetato de etilo y metanólicos. Luego, la actividad antimicrobiana de los 16 extractos orgánicos obtenidos fue estudiada. De acuerdo al *screening* antimicrobiano de estos extractos sobre bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas y la levadura *Candida albicans*, el extracto crudo obtenido con acetato de etilo de la cáscara y de la pulpa de los frutos, mostraron ser los más activos con respecto a los extractos hexánicos, etanólicos y metanólicos. Los ensayos de Bioautografía de los extractos evidenciaron las zonas de inhibición específicas para cada extracto sobre los mismos microorganismos ocupados en el *screening*. Como resultado de este último experimento se decidió analizar los extractos de acetato

del etilo de la variedad rojo-morado por cromatografía en columna de sílica-gel a fin de localizar las fracciones más activas de los extractos. Fueron seleccionadas 5 grupos de fracciones, siendo 3 de la cáscara y 2 de la pulpa. Una de las fracciones de la cáscara que estaba compuesta mayoritariamente por compuestos del tipo flavonoide, según el revelador DPBA, presentó la mayor inhibición del crecimiento bacteriano sobre *Bacillus cereus* y *Shigella sonnei*. Los resultados obtenidos en esta tesis son inéditos demostrando que el fruto del Copao puede ser una fuente alimenticia promisorio de propiedades benéficas para la salud. Es necesario continuar con los estudios para obtener una imagen más completa de los componentes presentes y del potencial antibacteriano del fruto del Copao.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la principal amenaza en la terapia antimicrobiana es el desarrollo de microorganismos resistentes, los cuáles pueden adaptarse a las presiones ambientales de variadas maneras siendo la respuesta a la presión de los antibióticos un ejemplo de dicha adaptación y por cierto, el ejemplo más obvio de la evolución en acción. El uso excesivo e inadecuado de antibióticos en pacientes ha impulsado un aumento importante de patógenos resistentes a múltiples fármacos. Su mal uso comprende una variedad de formas, incluido el uso en pacientes que es poco probable que tengan infecciones bacterianas, el uso durante períodos innecesariamente prolongados, el uso de múltiples agentes y diversidad de espectros cuando no es necesario. Por otra parte, se han utilizado cantidades mayores de antibióticos en la agricultura para estimular el crecimiento y prevenir infecciones en granjas o animales y esto se ha sumado a la presión de selección que resulta en organismos resistentes. Si bien las dianas moleculares más vulnerables a los fármacos antimicrobianos han sido identificadas y caracterizadas aún se está a la espera de la identificación de nuevos “targets” y compuestos, siendo probable que en las próximas décadas aún se deba depender de las familias de fármacos actualmente disponibles.

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades incluidas las de etiología infecciosa, constituyen en la actualidad un desafío en la medicina y se ofrece como una alternativa, especialmente para aquellas dolencias en las que no existe una terapia adecuada. Mención especial merece el uso de sustancias producidas por microorganismos con carácter biocida, como el papel de los probióticos. Otro aspecto importante a señalar son aquellas sustancias con capacidad antimicrobiana sintetizadas por individuos del reino animal, como los compuestos de origen peptídicos. Pero es sin duda el reino

vegetal el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en concreto, aquellas producidas por microorganismos.

En el norte de Chile se da un fruto endémico denominado Rumpa (*Eulychnia acida Phil.*, Cactaceae) el cuál ha sido estudiado por científicos de la Universidad de Talca, siendo éstos los únicos estudios en el mundo sobre esta especie; determinando sus características físicas, su composición química y su capacidad antiinflamatoria, agregando evidencia empírica sobre los efectos beneficiosos para la salud humana que posee esta fruta nativa.

La hipótesis de la presente tesis fue que los extractos orgánicos del fruto del Copao poseen actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*), *Shigella sonnei* (*S. sonnei*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*), *Citrobacter freundii* (*C. freundii*) y *Bacillus cereus* (*B. cereus*).

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Antibióticos

Los antibióticos suelen definirse cómo la sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos por su acción bactericida (1). Éstos son un elemento clave para combatir las enfermedades infecciosas y desde su aparición han permitido disminuir la morbimortalidad asociada a estas patologías de forma muy significativa. Es importante realizar un diagnóstico específico entre enfermedades inflamatorias no infecciosas, enfermedades infecciosas de origen viral, fúngico, parasitario y bacteriano para aportar un tratamiento adecuado, con el fin de mejorar al paciente y lograr un uso racional de antibióticos (2).

Existen variados criterios para clasificar a los antibióticos y antimicrobianos. Uno de los más utilizados es agruparlos en familias según su estructura química, también suele hacerse en virtud de su acción antiinfecciosa, espectro de actividad o mecanismos de acción y la compleja interacción que ocurre entre el antimicrobiano, el paciente y la bacteria: su farmacocinética y farmacodinámica. Este último aspecto es vital para comprender el “modus operandi” de su labor, su posibilidad de interacción con otros antibióticos o fármacos, la generación de mecanismos de resistencia y por supuesto, comprender su uso en el laboratorio dentro de los protocolos de diagnóstico en el área de microbiología (3).

3.2 Resistencia bacteriana

La resistencia a los antimicrobianos, se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos), como resultado los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, incrementando así, el riesgo de su transmisión, situación muy alarmante actualmente, principalmente por el hecho de que se vean afectadas las enfermedades sin tratamiento. El surgimiento de bacterias resistentes a los antimicrobianos y su diseminación mundial ha sido reconocido como una de las principales amenazas a la salud pública humana y animal del siglo XXI. Durante mucho tiempo se ha reconocido que las infecciones producidas por bacterias resistentes a los antimicrobianos se asocian con una mayor mortalidad, morbilidad aumentada y un mayor número de complicaciones que conducen a hospitalizaciones prolongadas y a mayores costos de tratamiento (4).

Las bacterias han tenido 3,5 billones de años para adaptarse a los diferentes ambientes de la tierra, y su adaptabilidad microbiana es su gran plasticidad genética y su rápida replicación. Una bacteria demora 20 a 30 minutos en replicarse. Considerando todo el tiempo que estos microorganismos han estado en el mundo es presumible que entraron en contacto con antimicrobianos naturales mucho antes que el hombre los descubriera, favoreciendo la aparición de resistencia como un mecanismo adaptativo natural adquirido durante su evolución. El uso de los antibacterianos por el hombre podría limitarse entonces a ponerla en evidencia, acelerar su aparición o promoverla. Los antimicrobianos deberían ser considerados un recurso precioso pero limitado, como el petróleo, el agua y los bosques, por lo que debería estimularse el uso adecuado de éstos para proteger y mantener su

efectividad. Paradojalmente, en estos momentos, cuando el aumento en la resistencia a antimicrobianos ha creado una necesidad crítica de reacción en la sociedad, a través del desarrollo de nuevos antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción, no ha habido una respuesta consistente de parte de las compañías farmacéuticas en la búsqueda de nuevos fármacos antiinfecciosos (5).

En los últimos años, la Infectious Diseases Society of America (IDSA), mediante un grupo de trabajo definió seis microorganismos como patógenos de alta prioridad por representar problemas clínicos o de salud pública relevante y no contar con nuevas moléculas en desarrollo para su tratamiento. Los incluidos fueron: *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (ERV), *S. aureus* resistente a meticilina (SAMR), *Klebsiella pneumoniae* y otras enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro expandido (BLEE), *E. cloacae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (6).

3.3 Mecanismos de resistencia bacteriana

Entre los mecanismos de resistencia más relevantes se encuentran (7):

Las bacterias sintetizan **enzimas que hidrolizan** al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana. Las betalactamasas hidrolizan la unión peptídica endocíclica del anillo betalactámico. Existen continuas mutaciones que producen expresión de BLEE, manifestándose la resistencia a cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona). La **modificación de un aminoácido** genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano. Un ejemplo es la modificación de PBP son un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano. Cambios en el diámetro y/o número de **porinas** pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. Existe disminución de la expresión de porinas (downregulation) lo que disminuye la susceptibilidad a betalactámicos y fluorquinolonas en *Pseudomonas*. Las **bombas de eflujo**

transportan al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Existen bombas de eflujos multidrogas en la pared bacteriana que permiten la expulsión de los antimicrobianos. La resistencia antimicrobiana es un problema continuo y en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo, no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie (7).

3.4 Microorganismos de interés clínico humano

3.4.1 *Escherichia coli*: la mayoría de las cepas son inocuas pero algunas pueden causar graves intoxicaciones alimentarias; siendo la causa más frecuente de infecciones bacterianas de las vías urinarias, bacteriemias, y diarrea del viajero asociada a bacterias (8, 9).

3.4.2 *Staphylococcus aureus*: Las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, puede producir con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. Importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada (10).

3.4.3 *Listeria monocytogenes*: La transmisión se produce a través de la ingesta de alimentos contaminados como vegetales crudos, leche y derivados lácteos sin pasteurizar, carnes no cocinadas y algunos alimentos procesados. La listeriosis normalmente es presentada en los adultos de edad avanzada, los adultos inmunocomprometidos, las mujeres embarazadas, los fetos y los recién nacidos (11).

- 3.4.4 *Salmonella sp.*:** La salmonelosis es una de las cuatro causas de enfermedades diarreicas, si bien la mayoría de los casos son leves, algunas veces la enfermedad puede ser mortal. La gravedad de la enfermedad depende de los factores propios del huésped y del serotipo de *Salmonella*. Las personas contraen la salmonelosis a través del consumo de alimentos contaminados de origen animal (principalmente huevos, carne, aves de corral y leche). También puede transmitirse vía fecal oral (12).
- 3.4.5 *Shigella sp.*:** La shigelosis es una enfermedad invasiva que afecta al colon y recto, y su presentación clínica puede ser muy variada. Los cuadros más graves se dan en niños menores de 5 años de edad, particularmente en situación de pobreza y desnutrición (13).
- 3.4.6 *Pseudomonas aeruginosa*:** La resistencia intrínseca a los antimicrobianos, se debe principalmente a la presencia de una membrana externa poco permeable, a una enzima β -lactamasa tipo Amp C inducible y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos. Las enfermedades asociadas a esta bacteria son neumonía en pacientes con fibrosis quística, meningitis, abscesos cerebrales, bacteriemia, otitis, queratitis, osteomielitis, gastroenteritis, infecciones de heridas quirúrgicas y quemaduras. (14)
- 3.4.7 *Acinetobacter baumannii*:** Es una bacteria de gran importancia clínica, que ha sido relacionada con altos porcentajes de mortalidad y posee una alta capacidad para diseminarse en el ambiente hospitalario. Ha adquirido diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos y presenta resistencia a carbapenémicos, aminoglicósidos, quinolonas y polimixinas, lo que ha complicado el manejo de las infecciones. Esta bacteria coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico o debilitados por sus comorbilidades, siendo una bacteria común en UCI y unidades de quemados (15).

- 3.4.8 *Candida albicans*:** Agente patógeno oportunista pudiendo producir infecciones localizadas como diseminadas. Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves (16).
- 3.4.9 *Enterobacter cloacae*:** Agente común de bacteriemias, neumonías asociadas a ventilación mecánica, infecciones urinarias e intra-abdominales. Es resistente a fluoroquinolonas, cotrimoxazol, cloranfenicol y aminoglucósidos. Entre los β -lactámicos, se considera intrínsecamente resistente a las aminopenicilinas, cefalosporinas de 1G y cefoxitina debido a la presencia de β -lactamasas del tipo AmpC con distintos grados de expresión, lo que implica susceptibilidad variable a cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Se han descrito cepas productoras de BLEE, KPC y OXA-48 (17).
- 3.4.10 *Citrobacter freundii*:** El tracto urinario es el lugar de origen más frecuente de los cultivos de *Citrobacter*, asociado a un catéter insertado. Además, está implicada en infecciones intraabdominales, infecciones de tejidos blandos y osteomielitis. Las cepas de *C. freundii* tienen genes AmpC inducibles que codifican la resistencia a ampicilina y cefalosporinas de primera generación (18).
- 3.4.11 *Bacillus cereus*:** Produce endosporas que sobreviven a la pasteurización y son resistentes a varios desinfectantes. Esta bacteria es la responsable del síndrome emético y del diarréico, dado por intoxicación alimentaria y además se ha identificado vinculada a endocarditis, endoftalmitis, por lo que se le reconoce su carácter de patógeno oportunista (19).

3.5 Sustancias naturales utilizadas como antimicrobianos (20)

Debido a lo expuesto en los párrafos anteriores es que los científicos han mirado hacia la naturaleza para abordar el complejo tema de la resistencia a los antimicrobianos usados actualmente.

Globalmente las plantas producen más de 100 000 productos naturales de baja masa molecular, también conocidos como metabolitos secundarios, que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales. Estas sustancias se pueden dividir, básicamente, en dos grandes grupos: fitoanticipinas, que están presentes de forma constitutiva en las plantas y fitoalexinas cuya presencia aumenta de forma considerable en respuesta a la invasión microbiana. La definición de fitoanticipina y fitoalexina se refiere a la actividad antimicrobiana de este tipo de compuestos, pero a veces es difícil dirimir entre la acción *in vivo* e *in vitro* debido a que en muchas ocasiones las concentraciones de fitoalexinas no han sido medidas específicamente en las células que están en contacto con los microorganismos infectantes, pudiéndose producir entonces resultados dispares.

Se han aislado alrededor de 12000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estiman que constituyen tan solo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos. La razón de ser de estos compuestos se desconoce por el momento. Existen distintas teorías: podrían ser compuestos con diferentes funciones y que de forma accidental aportan un poder antimicrobiano o realmente tienen acción antimicrobiana como primer fin. Las plantas tienen una

capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados. Los principales grupos de compuestos generados por las plantas se presentan a continuación en la siguiente tabla.

TABLA 1: GRUPOS QUÍMICOS MÁS IMPORTANTES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA OBTENIDOS DE PLANTAS. (Fuente: Domingo, 2003)

Grupo químico	Compuesto	Planta	Actividad
Fenoles simples	Timol	<i>Thymus officinalis</i> (tomillo)	General
	Ácido antémico	<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i>
	Terpenoide	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Salmonella</i>
Quinonas	Hipericina	<i>Hypericum perforatum</i> (hipérico)	VIH
Taninos		<i>Quercus rubra</i> (roble)	Bacterias y virus
		<i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Virus
		<i>Melissa officinalis</i> (melisa)	
Cumarinas		<i>Matricaria chamomilla</i> (manzanilla)	Virus
Flavonas	Catequina	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella</i> , <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>
	Isoflavona	<i>Millettia thonningii</i>	<i>Schistosoma</i>
	Quercitina	<i>Quercus rubra</i> (roble)	
Alcaloides	Coca	<i>Erythroxylum coca</i> (coca)	Cocos grampositivos
	Piperina	<i>Piper nigrum</i>	Hongos, <i>Lactobacillus</i>
	Mescalina	<i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	General

3.5.1 Compuestos fenólicos simples: Son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámicos y cafeico. Los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo, parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos (20).

3.5.2 Quinonas: Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas dañadas. Poseen una alta reactividad formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas. La mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (20).

3.5.3 Taninos: Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrosolubles y condensados en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Un ejemplo es el tanino presente en el eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (20).

3.5.4 Cumarinas: Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Están presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. La warfarina, un anticoagulante clásico, pertenece a este grupo. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (20).

3.5.5 Flavonas y compuestos relacionados: Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forma complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Mención especial merecen las catequinas presentes en el té verde (*Camellia sinensis*) las cuáles ejercen actividad sobre *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* y otros (20).

3.5.6 Alcaloides: Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides

parece ser mediante la intercalación entre la pared celular y entre el DNA del microorganismo (20).

TABLA 2: COMPUESTOS QUÍMICOS MENOS FRECUENTES AISLADOS A PARTIR DE PLANTAS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA.

(Fuente: Domingo, 2003)

Clase	Compuesto	Planta/sustancia	Actividad
Aldehído	Hexanal	<i>Olea europea</i> (olivo)	General
Saponinas		<i>Panax ginseng</i>	<i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> , hongos
Sulfóxidos	Alicina, otros sulfóxidos	<i>Allium sativum</i> (ajo)	<i>H. pylori</i>
Azúcares	Fructosa	<i>Vaccinium</i> sp. (arándanos)	General
Azúcares	Glucosa + fructosa	Miel	<i>S. aureus</i>
Mezcla compleja	Látex	<i>Aloe vera</i> (aloe)	<i>Corynebacterium</i> , <i>Salmonella</i>
Alcanos	Poliacetileno	<i>Bupleurum salicifolium</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i>

3.6 Características de *Eulychnia acida* Phil.

Eulychnia acida es un cactus de crecimiento arborescente de 1,5 a 4 m de altura muy ramificado generalmente con un tronco único. Posee espinas aciculares de color marrón cuando nuevas y luego grises. Con flores cerca del ápice de 5 a 7 cm de longitud, sus tépalos son blancos con nervio central rosado. Tiene frutos comestibles esféricos de 5 a 6 cm de diámetro, amarillo-verdoso y recubierto con escamas verdes y pelos, de carne blanca jugosa y acida. Esta especie pertenece al género *Eulychnia*, que es casi endémico por la excepción de *Eulychnia ritteri* (del sur de Perú). Los frutos comestibles de *E. acida* están siendo evaluados para determinar su potencial productivo y económico-comercial (20).

E. acida se distribuye desde Copiapó (Región de Atacama) hasta la localidad de Tilama al este de Pichidangui (Región de Coquimbo), entre las

latitudes 27° 30' S y los 32° 06' latitud Sur. Especie endémica de Chile. Se estima que la extensión de presencia es de 43 228 km². Calculado en función del polígono mínimo, excluyendo la superficie marina y en el caso de las islas se consideró la superficie isleña. *E. acida* crece formando sub-poblaciones con miles de individuos. Dentro de las subpoblaciones se distinguen individuos de distintos tamaños y edades que florecen y producen frutos con cientos de semillas al que popularmente se le conoce como Rumpa (21).

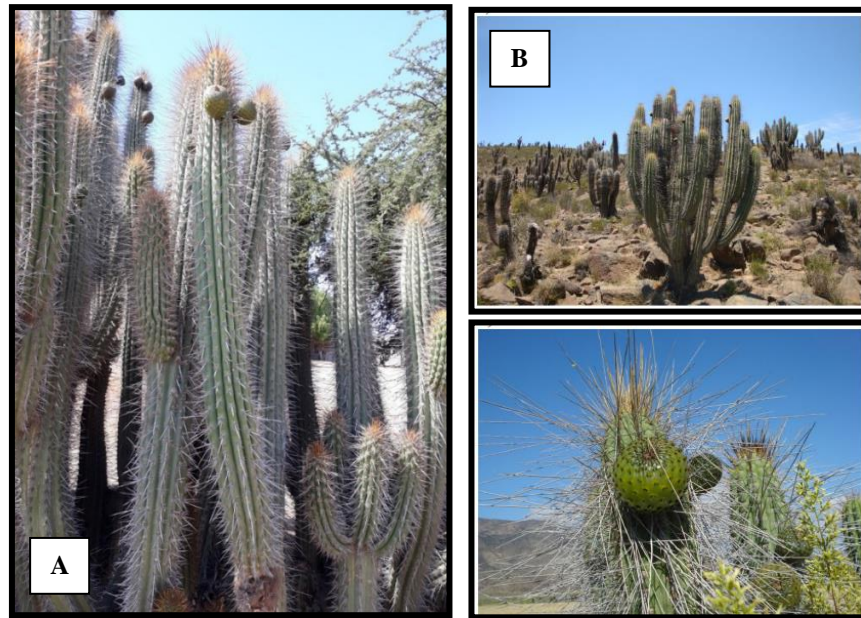


FIG. 1: Copao, un cactáceo nativo. A: Copao (*Eulychnia acida* Phil.). La Serena, Región de Coquimbo, 24/01/19. (Fotografía: Dra. M° del Pilar Caramantín Soriano). B: detalle de la planta y fruto (Fuente: Jiménez-Aspee, 2015)

3.7 Características, composición química y actividad biológica del fruto del Copao

En tiempos de cambio climático son necesarias especies capaces de sobrevivir a condiciones cambiantes. La capacidad de adaptarse cuando el entorno cambia, es el resultado de su diversidad genética. Una diversidad insuficiente llevaría a las especies a restringir su distribución geográfica y serían más vulnerables a la extinción bajo una presión de selección. Los frutos de Copao o Rumpa son comestibles y contienen minerales, vitamina C, antioxidante y antiinflamatorios (22).

Los frutos son comercializados por campesinos en los valles de Elqui y Limarí y son apreciados por su sabor ácido y refrescante. Cuando están maduros, los frutos del Copao son de color verde con diferentes tonos o verde rojizo con pulpa verde o rosa, semillas pequeñas y textura gelatinosa. El jugo de pulpa es verde o rosa claro, ácido, con un aroma fuerte y agradable.

Según Jiménez et al. (2014) los extractos del fruto del Copao, la Rumpa, son ricos en contenido fenólico, flavonoides y ácido ascórbico dependientes de la parte de la fruta (epicarpio/pulpa) y del lugar geográfico de recolección (23).

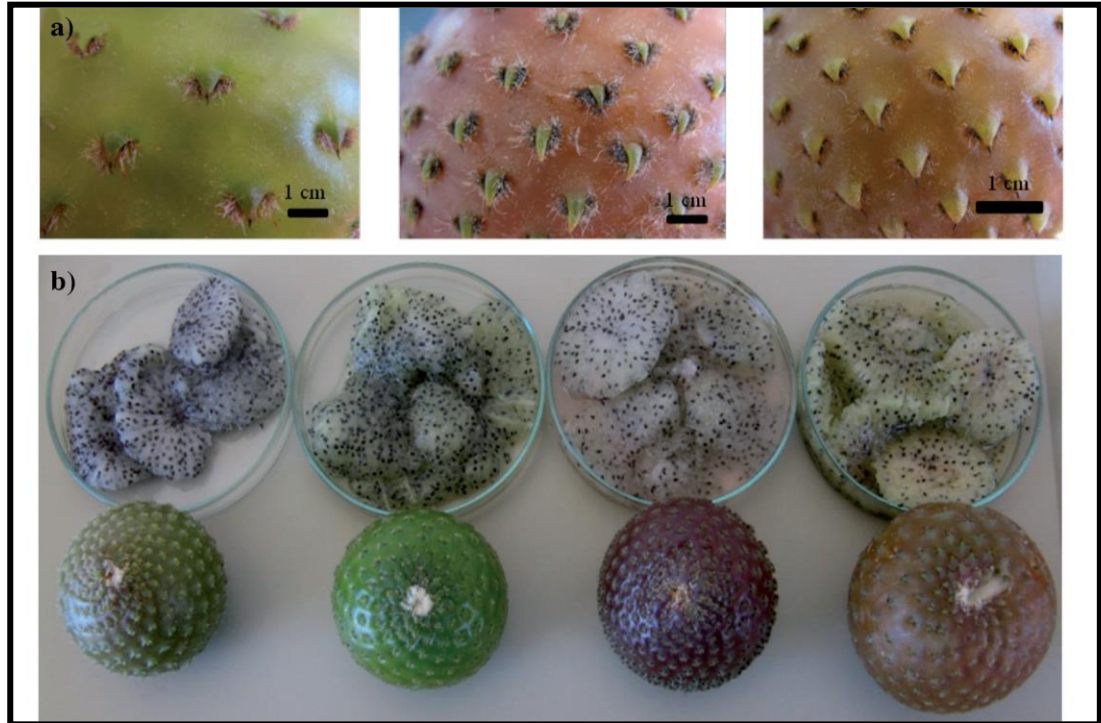


FIG 2: Fruto del Copao característico encontrado en la Región de Coquimbo (Fuente: Jana C. et al., 2017) Detalles de la densidad del fruto y su respectiva escala. B) Diversidad de colores del Copao y su diferencia entre la pulpa y la cáscara.

3.7.1 Estudio de citotoxicidad: Los extractos enriquecidos en fenólicos retenidos en Amberlita de la pulpa del fruto del Copao carecieron de toxicidad para los fibroblastos de pulmón MRC-5 humanos. Todas las muestras no fueron tóxicas contra células AGS gástricas humanas. Los resultados indican que los extractos no interfirieron con las funciones celulares básicas ni afectaron la viabilidad celular. La baja toxicidad de la pulpa de la fruta y los extractos de epicarpio sugieren que el consumo de esta fruta podría considerarse seguro (23).

3.7.2 Identificación de compuestos fenólicos: Se identificaron 8 compuestos en los extractos enriquecidos en fenólicos retenidos en Amberlita del epicarpio y la pulpa del fruto del Copao, siendo principalmente flavonoles glicosilados tanto por Cromatografía de Alta Resolución con arreglo de diodos acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-DAD-MS-MS) como por Resonancia Magnética Nuclear (RMN¹H y RMN¹³C) (23).

3.7.3 Actividad antiinflamatoria: Los extractos enriquecidos en fenólicos retenidos en Amberlita del epicarpio y la pulpa del fruto del Copao fueron sometidos a ensayos de viabilidad *in vitro* para inhibir la enzima proinflamatoria lipooxigenasa (LOX) y la ciclooxygenasa (COX-1 y COX-2). Los resultados mostraron que el extracto de la pulpa presentó mejor inhibición de LOX que con el extracto del epicarpio, mientras que la inhibición de COX-2 se observó en ambos extractos (24).

3.8 Principales características de los solventes a ocupar

Los compuestos bioactivos de vegetales están concentrados en pulpa, cáscara, semillas entre otros, los cuales pueden ser extraídos con agua o con solventes orgánicos. Todos los métodos que emplean disolventes orgánicos en los procedimientos están influenciados por su uso y toxicidad en el laboratorio. A continuación se mencionan algunas características físico-químicas particulares de algunos solventes orgánicos que deben ser tomados en cuenta cuando son ocupados en los laboratorios para un mejor uso y manejo de ellos.

3.8.1 Hexano: Tiene una baja toxicidad aguda, los efectos críticos son la toxicidad testicular y neurotoxicidad (tanto el sistema nervioso central como periférico). Se absorbe lentamente por vía pulmonar y por la piel. El principal metabolito detectado en el plasma sanguíneo y la orina de

trabajadores expuestos a n-hexano fue la 2,5-hexanodiona y se cree que es el metabolito responsable de estos efectos (25).

3.8.2 Acetato de Etilo: La absorción del acetato de etilo es rápida siendo elevada la tasa de retención pulmonar, entre el 50% y el 60% de la dosis inhalada, y se distribuye a todo el organismo. Más del 95% de todo el acetato de etilo absorbido se hidroliza en pocos minutos, bien de forma espontánea o mediante la acción de esterasas inespecíficas, formándose etanol y ácido acético que, posteriormente, se metabolizan y excretan. Es irritante y produce efectos locales y reversibles en ojos, nariz y garganta mediante su interacción con las terminaciones nerviosas del nervio trigémino, produciendo sensación de quemazón en la cavidad nasal, picor, hormigueo, enrojecimiento y lagrimeo en los ojos (27).

3.8.3 Etanol: El efecto crítico es la irritación pulmonar local, existe penetración cutánea, la baja toxicidad sistémica tras aplicaciones cutáneas repetidas no hace necesaria la notación de “vía dérmica” (29).

3.8.4 Metanol: Es un líquido inflamable, tiene efectos irritantes, produce somnolencia, vértigo, narcosis, ansiedad, espasmos, náusea, vómitos, dolor de cabeza, ceguera, trastornos de la visión, acción desengrasante con formación de piel resquebrajada y agrietada (31).

TABLA 3: CARÁCTERÍSTICAS DE LOS SOLVENTES OCUPADOS (26, 28, 30, 31)

Propiedades físico-química de los solventes				
Características	n-HEXANO	ACETATO DE ETILO	ETANOL	METANOL
Descripción	Incoloro, volátil	Líquido volátil, altamente inflamable.	Líquido, incoloro	Líquido incoloro
Fórmula y masa molecular	C ₆ H ₁₄ y 86,18 g/mol	C ₄ H ₈ O ₂ y 88,11 g/mol	CH ₃ CH ₂ OH y 46,07 g/mol	CH ₃ OH y 32,04 g/mol
Viscosidad, dinámica	0,50 mm ² /s (20 °C)	0,44 <u>mPa.s</u> a 20 °C	1,2 <u>mPa.s</u> a 20 °C	0,597 <u>mPa.s</u> a 20 °C
Punto de ebullición	69 °C	77 °C	78,3 °C	64,5 °C
Densidad	0,66 g/cm ³ a 20 °C	0,90 g/cm ³ a 20 °C	0,790 - 0,793 g/cm ³ a 20 °C	0,792 g/cm ³ a 20 °C
Solubilidad en agua	0,0095 g/L a 20 °C	85,3 g/L a 20 °C	a 20 °C totalmente miscible	Totalmente miscible

3.9 Cromatografía en capa fina (32):

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica analítica rápida y sencilla, que permite separar una mezcla de compuestos, determinar el grado de pureza y realizar el seguimiento de una reacción química. Consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración diferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre una superficie plana. En esta técnica, una solución de la muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de un adsorbente inerte (sílica, alúmina, entre otros) distribuido uniformemente (fase estacionaria). Entonces, la lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). A medida que la mezcla de disolvente asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presente en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.

La relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa se conoce como frente de retención (R_f), y tiene un valor constante para cada compuesto en condiciones cromatográficas específicas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.). Para calcular el R_f , la distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha y se aplica la siguiente ecuación:

$$R_f = \text{distancia recorrida por el compuesto (X)} / \text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}$$

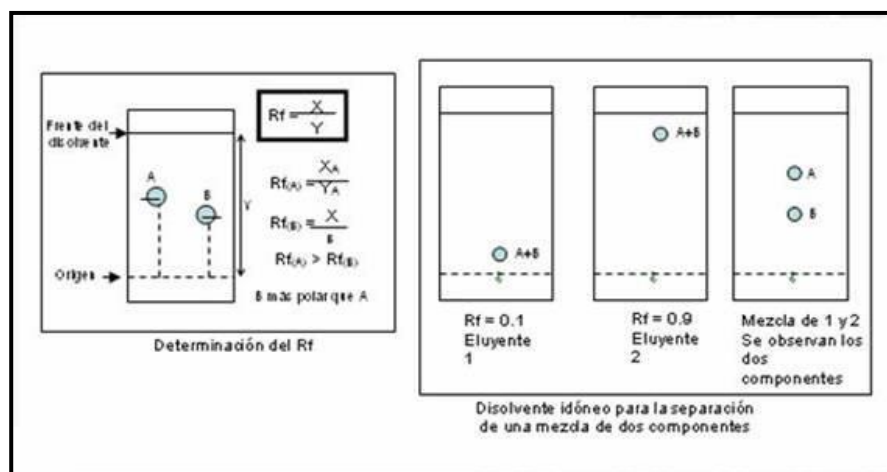


FIG. 3: Cromatografía en Capa Fina (32)

3.10 Cromatografía en columna (32):

Es un método utilizado para la separación y purificación, de diferentes compuestos orgánicos que se encuentren en estado sólido o líquido. La fase estacionaria utilizada, es decir, el adsorbente, se coloca en el interior de una columna de vidrio, con terminación en una llave de paso. La fase estacionaria se impregna con el eluyente o fase móvil; en seguida la muestra que nos interesa

separar, la colocamos en la parte superior de la fase estacionaria y se hace pasar la fase móvil, se empieza a eluir la columna con el disolvente. Los compuestos que se encuentran disueltos en la fase móvil, poco a poco saldrán de la columna cromatográfica (CC), y se recogen en fracciones. Las fracciones menos polares serán las primeras en salir de la columna, las sustancias más polares, quedan retenidas por más tiempo en el absorbente, y a menudo es necesario el uso de diferentes disolventes con la finalidad de incrementar su polaridad para que sean arrastradas por estos.

3.11 Bioautografía (32)

Este método es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas, es colocado sobre una placa de CCF, posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto. La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad del mismo. La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para detectar compuestos que afectan las tasas de crecimiento de microorganismos en mezclas y matrices complejas, como los extractos de plantas se conoce como purificación guiada por bioensayos. Esta técnica tiene un gran número de ventajas ya que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir de extractos crudos, utiliza relativamente muy poca cantidad de muestra, lo cual es ideal cuando se trabaja con extractos de plantas, además da una idea precisa de la polaridad de los compuestos activos es un ensayo práctico, fácil de realizar y es sumamente reproducible, una vez que se ha estandarizado la técnica.

3.11.1 Bioautografía por inmersión o por superposición de agar (32):

En esta el cromatograma es cubierto con una capa de 0,8% de agar Müller Hinton semisólido previamente inoculado, hay que considerar que el agar debe estar aproximadamente a 45 °C al momento de inocularlo para evitar inactivar al microorganismo en cuestión. Posteriormente, la placa cubierta con agar es incubada durante el tiempo y la temperatura apropiada, después de esto, zonas claras sobre la placa de CCF indican la actividad antimicrobiana de los componentes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos del fruto del Copao, sobre distintos microorganismos causantes de patogénesis en el hombre y determinar sus fracciones enriquecidas de compuestos orgánicos más activas.

4.2 Objetivos específicos

- Preparar extractos orgánicos crudos de la pulpa y la cáscara del fruto del Copao usando solventes orgánicos de diferentes polaridades.
- Realizar ensayos antimicrobianos y Bioautografía de los extractos orgánicos de la pulpa y la cáscara del fruto del Copao como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana.
- Efectuar ensayos de Bioautografía de las fracciones obtenidas de los extractos más activos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de extractos naturales del fruto del Copao

Los frutos del Copao se obtuvieron en la IV Región de Coquimbo dónde se separan en dos grupos: frutos rojo/morados redondos y frutos verdes en punta. Éstos fueron congelados desde el 31 de enero 2019 al 11 de Marzo 2019 a -80°C . Se descongelan hasta temperatura ambiente y se masan. Las frutas fueron separadas en cáscara y pulpa para realizar posteriormente las extracciones.

Primera etapa: Se obtuvieron los extractos a través de 3 ciclos de baño ultrasonido (AutoScience As3120) durante 30 minutos dónde se usó 300 mL Hexano p.a. (MERCK, Alemania), luego los extractos fueron reunidos y concentrados hasta sequedad en rotavapor (BÜCHI R-200). La pulpa y cáscara fueron utilizadas en la siguiente etapa.

Segunda etapa: Los extractos de acetato de etilo fueron obtenidos siguiendo la misma metodología que el extracto hexánico. La pulpa y cáscara extraídas se ocuparon en la próxima etapa.

Tercera etapa: Los extractos etanólicos fueron elaborados siguiendo la metodología antes mencionada. La pulpa y cáscara extraídas se ocuparon en la próxima etapa.

Cuarta etapa: Los extractos metanólicos fueron producidos siguiendo la metodología antes mencionada. La pulpa y cáscara extraídas se guardaron para otras investigaciones.

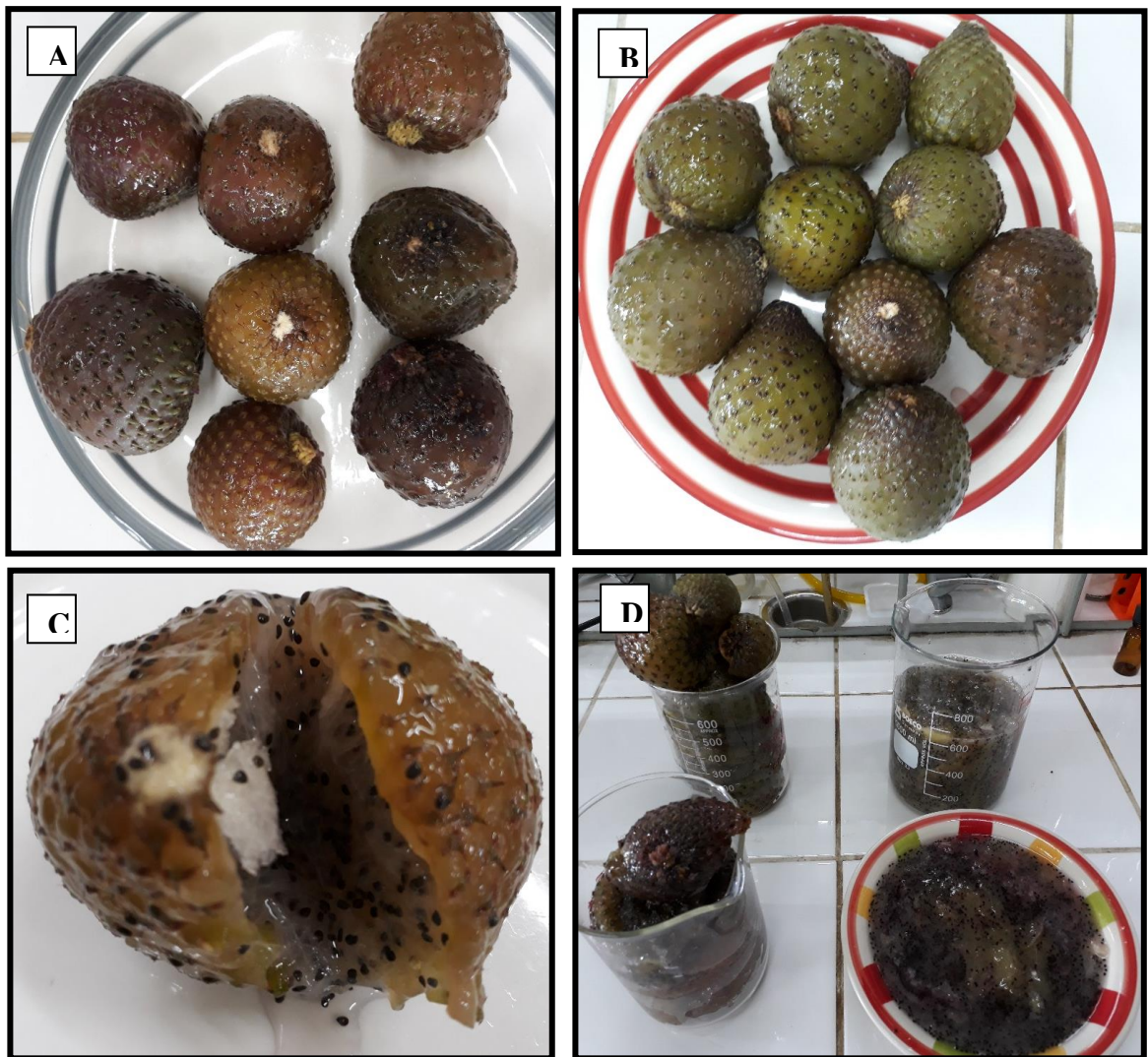


FIG 4: Frutos del Copao trabajados en el laboratorio. A: Fruto rojo-morado. B: Fruto verde en punta. C: Diferencia entre cáscara y pulpa del fruto rojo-morado. D: Separación del fruto verde en punta y rojo-morado en la cáscara y pulpa respectivamente.

TABLA 4: DENOMINACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON SU RESPECTIVA LETRA Y ABREVIACIÓN

Letra asignada	Tipo de extracto	Abreviación
A	Hexánico de la pulpa del fruto rojo-morado	EHPR0319
B	Acetato de etilo pulpa del fruto rojo-morado	EAEPR0319
C	Hexánico de la cáscara del fruto rojo-morado	EHCR0319
D	Acetato de etilo cáscara fruto rojo-morado	EAECR0319
E	Etanólico de la cáscara del fruto rojo-morado	EECR0319
F	Etanólico de la pulpa del fruto rojo-morado	EEPR0419
G	Etanólico de la pulpa del fruto verde	EEPV0419
H	Etanólico de la cáscara del fruto verde	EECV0419
I	Metanólico de la pulpa fruto rojo-morado	EMPR0419
J	Metanólico de la cáscara fruto rojo-morado	EMCR0419
K	Hexánico de la pulpa del fruto verde	EHPV0419
L	Hexánico de la cáscara del fruto verde	EHCV0419
M	Acetato de etilo pulpa del fruto verde	EAEPV0419
N	Acetato de etilo cáscara fruto verde	EAECV0419
O	Metanólico de la pulpa del fruto verde	EMPV0419
P	Metanólico de la cáscara fruto verde	EMCV0419

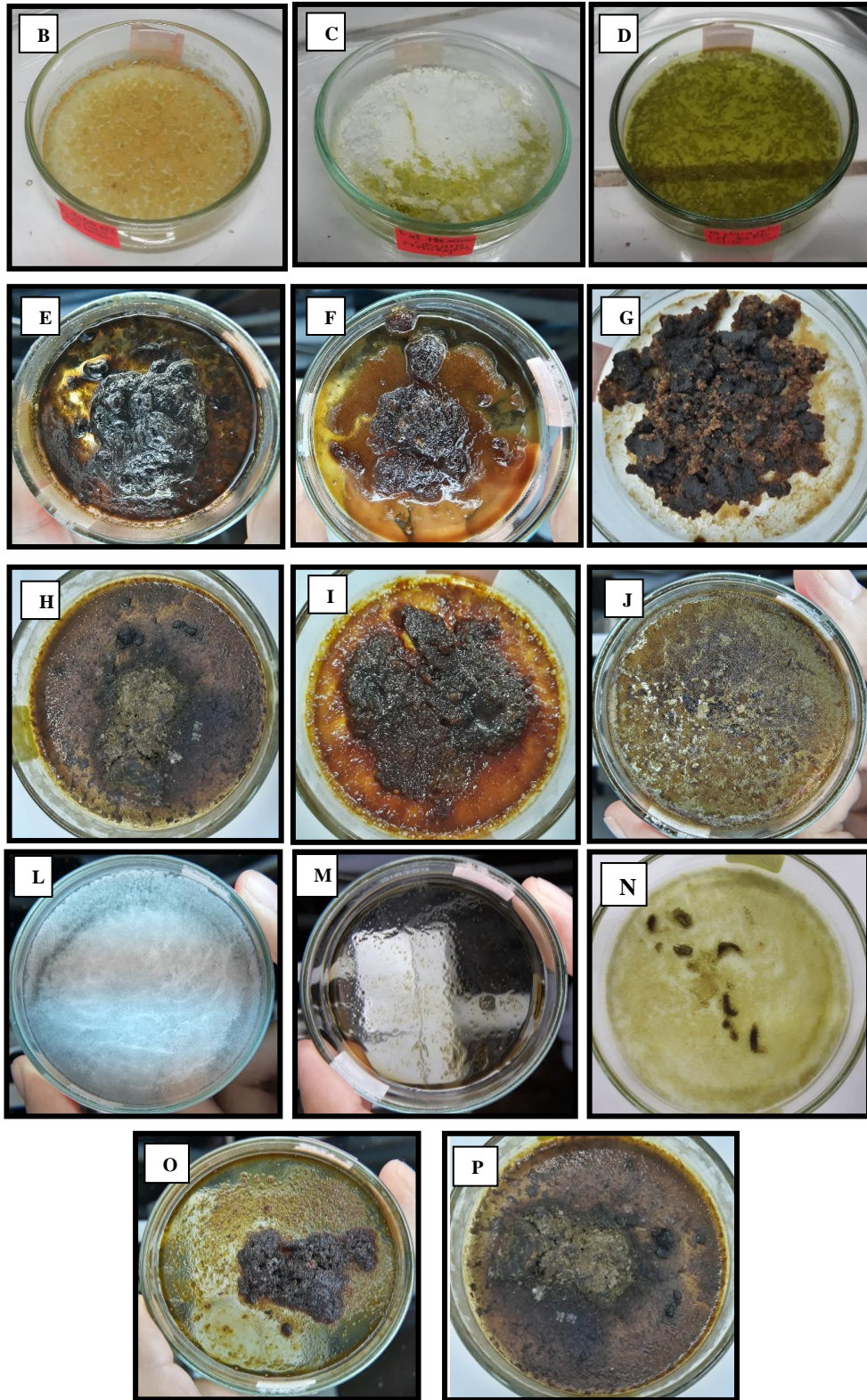


FIG. 5: Extractos del fruto del Copao obtenidos con sus respectivas denominaciones dadas en la Tabla N°4.

5.2 Microorganismos patógenos

Los microorganismos a estudiar son causantes de enfermedades clínicamente relevantes, ya sea porque producen enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) o son productores de enfermedades nosocomiales; estas cepas bacterianas pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica de la Universidad de Talca.

Las bacterias Gram positivas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* y *B. cereus*. Las bacterias Gram negativas a utilizar son *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *S. sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 08105, *A. baumannii*, *E. cloacae* y *C. freundii*. También se utilizó una levadura, *C. albicans*.

5.3 Preparación de sensidiscos impregnados con los extractos

Se masaron 10 mg en aquellos extractos que se haya obtenido una baja concentración y 50 mg en aquellos que se obtuvo una gran concentración y luego se disuelven en 500 μ L de DMSO al 1%. Se usaron discos de papel filtro esterilizado al UV de 5 mm que fueron impregnados con 0,5 mg de extracto.

5.3.1 Actividad antimicrobiana con extractos

Se utiliza la técnica de difusión en agar basándose en las guías que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

5.3.2 Preparación del inóculo: Se toman 3 a 5 colonias de la placa de cultivo incubada anteriormente entre 18 a 24 horas y se siembra en un caldo BHI (MERCK, Alemania), se inoculó a temperatura ambiente hasta conseguir

una turbidez del 0,5 de la escala Mc Farland que se realizó con densidad óptica a 620 nm, si la turbidez es menor se le agrega 1 o 2 colonias más. Si la turbidez es mayor se realiza el ajuste necesario con el mismo caldo.

5.3.3 Inoculación de las placas: Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, se introduce una tórula y se rota por las paredes del tubo para eliminar el exceso. Inocular las placas de Müeller-Hinton (MERK, KGaA, Alemania) completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el escobillón por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Dejar secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos.

5.3.4 Dispensación de los sensidiscos: Se colocan los sensidiscos con los extractos manualmente con pinzas limpias asegurándose que tomen contacto perfectamente con la superficie del agar. Se incuban las placas invertidas por 18 a 24 horas dejando en la estufa a 35°C las bacterias Gram negativas, Gram positivas y la levadura.

5.4 Bioautografía de los Extractos orgánicos de acetato de etilo de la pulpa y la cáscara del fruto del Copao

La actividad investigativa se continuó sólo con los extractos que tuvieron más actividad antimicrobiana.

En la cromatografía de capa fina efectuada en sílica gel con base de plástico utilizando el solvente Acetato de Etilo: Metanol (9,5: 0,5) se logra visualizar de manera óptima la separación de los compuestos de EAEPR0319 (B), EAECR0319 (D), EAEPV0419 (M), EAECV0419 (N) y Cloranfenicol como control positivo; a través de una lámpara con un espectro de 254 nm dónde se consiguió ver los compuestos no fluorescentes como los compuestos carotenoides, flavonoides, los

pigmentos y a través de un espectro de 366 nm se consigue visualizar los compuestos fluorescentes como los anillos aromáticos (compuestos fenólicos), compuestos con estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados.

Se mezclan 18 mL de agar BHI semisólido al 0,8% (MERCK, Alemania) más 2 mL de caldo BHI con el microorganismo ajustado al 0,5 Mc Farland realizado por densidad óptica a 620 nm y a una temperatura del caldo que permita la viabilidad de los microorganismos. Se posiciona la placa TLC sobre una placa petri de 9 cm que contiene M-H solidificado y se le agregan los 20 mL de medio con los microorganismos en estudio y se deja semi-solidificando. Se deja enfriar y se incuba tapa abajo a 37 °C durante 18 horas y se revisa el crecimiento y formación del halo en cualquier región del agar sobre el cromatofolio donde están los compuestos y en caso de no existir halo o de haber poco crecimiento se deja en la estufa y se revisa hasta que exista crecimiento.

Al momento de evidenciar halos de inhibición en cualquier sector de la placa dónde se encuentra el cromatofolio, se retira la placa petri de la estufa y se deja a temperatura ambiente para su estudio evitando un sobrecrecimiento de la placa que interfiera en la visualización del halo y se interprete como un falso negativo.

5.5 Cromatografía en columna de los extractos de Acetato de Etilo del fruto rojo-morado

Los extractos B (EAEPR0319) y D (EAECR0319) fueron analizados a través de cromatografía en columna de silicagel 60 (radio 0,2-0,5 mm) como fase estacionaria y distintas combinaciones de solventes como fase móvil (hexano, acetato de etilo y metanol). Las fracciones obtenidas fueron agrupadas según los resultados de los análisis de CCF y revelados tanto sobre radiación UV (254 y 366 nm) como con los reactivos 2-Aminoetildifenilo borato (DPBA) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DDPH).

TABLA 5: SOLVENTES UTILIZADOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO B (EAEPR0319) DE LA PULPA FRUTO ROJO-MORADO

EXTRACTO B (EAEPR0319)

	Cantidad	Mezcla de solventes utilizados	Razón
1°	50 mL	Hexano: Acetato de etilo	8:2
2°	50 mL	Hexano: Acetato de etilo	6:4
3°	50 mL	Acetato de etilo	100%
4°	50 mL	Acetato de etilo: metanol	9,8: 0,2
5°	50 mL	Acetato de etilo: metanol	9,4: 0,6
6°	50 mL	Acetato de etilo: metanol	9,0: 1,0

TABLA 6: SOLVENTES UTILIZADOS EN LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DEL EXTRACTO D (EAECR0319) CÁSCARA FRUTO ROJO-MORADO

EXTRACTO D (EAECR0319)

	Cantidad	Mezcla de solventes utilizados	Razón	Fracciones
1°	50 mL	Hexano: Acetato de etilo	6:4	F1 – F8
2°	50 mL	Hexano: Acetato de etilo	2:8	F9 – F14
3°	50 mL	Acetato de etilo	100%	F15 – F22
4°	50 mL	Acetato de etilo: Metanol	95:5	F23 – F28
5°	50 mL	Acetato de etilo: Metanol	80:20	F29 – F35
6°	50 mL	Acetato de etilo: Metanol	50:50	F36 – F42
7°	50 mL	Acetato de etilo: Metanol	25:75	F43 – F49
8°	50 mL	Metanol	100%	F50 – F57

5.5.1 CCF de las fracciones agrupadas: Luego de obtener las fracciones se correlacionaron con el ensayo de la bioautografía de los extractos y se dejaron las fracciones con el Rf más parecido al de los extractos

activos. Se realizó CCF a 2 fracciones de la pulpa (5B y 6B) y 3 fracciones de la cáscara (2D, 4D y 5D).

5.5.2 Bioautografía de las fracciones 5B, 6B, 2D, 4D y 5D: Para este ensayo se utilizaron sólo las 8 cepas bacterianas que dieron positivo para el ensayo de la bioautografía de los extractos: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. cloacae*, *B. cereus*, *S. sonnei*, *A. baumannii*, *L. monocytogenes*. Se realizaron los controles de la bioautografía depositando las fracciones en el origen y estas placas no se corrieron con ningún solvente. Se mezclaron 18 mL de agar BHI semisólido al 0,8% (MERCK, Alemania) más 2 mL de caldo BHI con el microorganismo ajustado al 0,5 Mc Farland realizado por densidad óptica a 620 nm y a una temperatura del caldo que permita la viabilidad de los microorganismos. Se posicionó la placa TLC sobre una placa petri de 9 cm que contiene M-H solidificado y se le agregaron 20 mL de medio con los microorganismos en estudio y se dejó semi-solidificando. Se enfrió y se incubó tapa abajo a 37 °C durante 18 horas y se revisó el crecimiento y formación del halo en cualquier región del agar sobre el cromatofolio donde estuvieran los compuestos y en caso de no existir halo o de haber poco crecimiento se dejó en la estufa y se revisó hasta que existiera crecimiento.

6. RESULTADOS

A continuación se muestran una secuencia de figuras y tablas de los ensayos químicos y biológicos realizados durante esta investigación:

TABLA 7: RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO NATIVO DEL COPAO **ROJO-MORADO**, REGIÓN DE COQUIMBO, CHILE.

PARTE DEL FRUTO	TIPO DE EXTRACTO			
	Hexano	Acetato de Etilo	Etanol	Metanol
Pulpa	0,0025 g (6×10^{-4} %)	0,4015 g ($9,8 \times 10^{-2}$ %)	4,9052 g (1,2 %)	5,0272 g (1,2 %)
Cáscara	0,0307 g ($7,3 \times 10^{-3}$ %)	0,3075 g ($7,3 \times 10^{-2}$ %)	6,0282 g (1,4 %)	1,1846 g ($2,8 \times 10^{-1}$ %)

TABLA 8: RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO NATIVO DEL COPAO **VERDE EN PUNTA**, REGIÓN DE COQUIMBO, CHILE.

PARTE DEL FRUTO	TIPO DE EXTRACTO			
	Hexano	Acetato de Etilo	Etanol	Metanol
Pulpa	0,0065 g (1×10^{-3} %)	0,2835 g ($4,4 \times 10^{-2}$ %)	9,7985 g (1,5 %)	3,6090 (0,6 %)
Cáscara	0,0241 g ($4,2 \times 10^{-3}$ %)	0,3155 g ($5,4 \times 10^{-2}$ %)	3,1719 g (0,5 %)	3,3986 g (0,6 %)

6.1 Actividad antimicrobiana con extractos impregnados en sensidiscos

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos tipos de extractos del fruto del Copao, se les designó una letra en orden alfabético y se hicieron los antibiogramas por duplicado para las 11 cepas. La realización de los ensayos antibacterianos se dividió en 3 etapas dónde en una primera etapa se probó la actividad de los extractos A, B, C, D y E. En una segunda etapa los extractos F, G, H, I y J. Por último, en una tercera etapa los extractos K, L, M, N, O y P.

TABLA 9: ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *EULYCHNIA ACIDA PHIL.*

PROMEDIOS DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)																
Extractos del fruto del Copao																
Microorganismo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	s/i	13±0	s/i	10±0	8±0	12±0	11±0	8±0	7,5±0,7	8±0	s/i	s/i	10±0	7±1,4	s/i	s/i
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 08105	s/i	12±1,4	s/i	10,5±0,7	8±0	6±0	6±0	6±0	6±0	8±0	s/i	s/i	11±1,4	9±1,4	7±1,4	s/i
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	s/i	8,5±0,7	s/i	8±0	7±0	7,5±0,7	7±1,4	7±0	8±2,8	8,5±0,7	s/i	s/i	9,5±0,7	7,5±0,7	6±0	s/i
<i>Enterobacter cloacae</i>	s/i	12±0	s/i	10±0	7,5±0,7	10,5±0,7	11,5±2,1	10±1,4	9,5±2,1	10±0	s/i	s/i	7,5±0,7	7±1,4	s/i	s/i
<i>Bacillus cereus</i>	s/i	11,5±0,7	s/i	12±1,4	7,5±0,7	9±2,8	8,5±2,1	7,5±0,7	8±1,4	8±1,4	s/i	s/i	11±0	10,5±0,7	8,5±0,7	s/i
<i>Citrobacter freundii</i>	s/i	11±1,4	s/i	10,5±0,7	8±0	6±0	6±0	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	10,5±0,7	7±0	5,5±0,7	s/i
<i>Shigella sonnei</i>	s/i	11±0	s/i	10±0	7,5±0,7	8,5±1,4	7±0	12,5±3,5	7,5±0	10±1,4	s/i	s/i	9,5±0,7	7±0	6±0	s/i
<i>Candida albicans</i>	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	5.5	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i
<i>Acinetobacter baumannii</i>	s/i	15±1,4	s/i	14,5±0,7	12,5±0,7	9,5±0,7	8,5±0	10±	9,5±2,1	9,5±0,7	s/i	s/i	9,5±0,7	8±0	6±0	s/i
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	s/i	s/i	s/i	8±0	s/i	8±1,4	7±0	8,5±2,8	s/i	7,5±0	8±0	s/i	9±1,4	10±0	8±0	s/i
<i>Listeria monocytogenes</i>	s/i	s/i	s/i	6±0	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	s/i	8±0	s/i	s/i	s/i

s/i: Sin Inhibición

*Control Positivo: Se utilizó Cloranfenicol 30 mcg, Cefepime 30 mcg en el caso de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *S. typhimurium* debido a que son bacterias resistentes al Cloranfenicol y Fluconazol en el caso de la *C. albicans*

*Control negativo: Sensidisco natural.

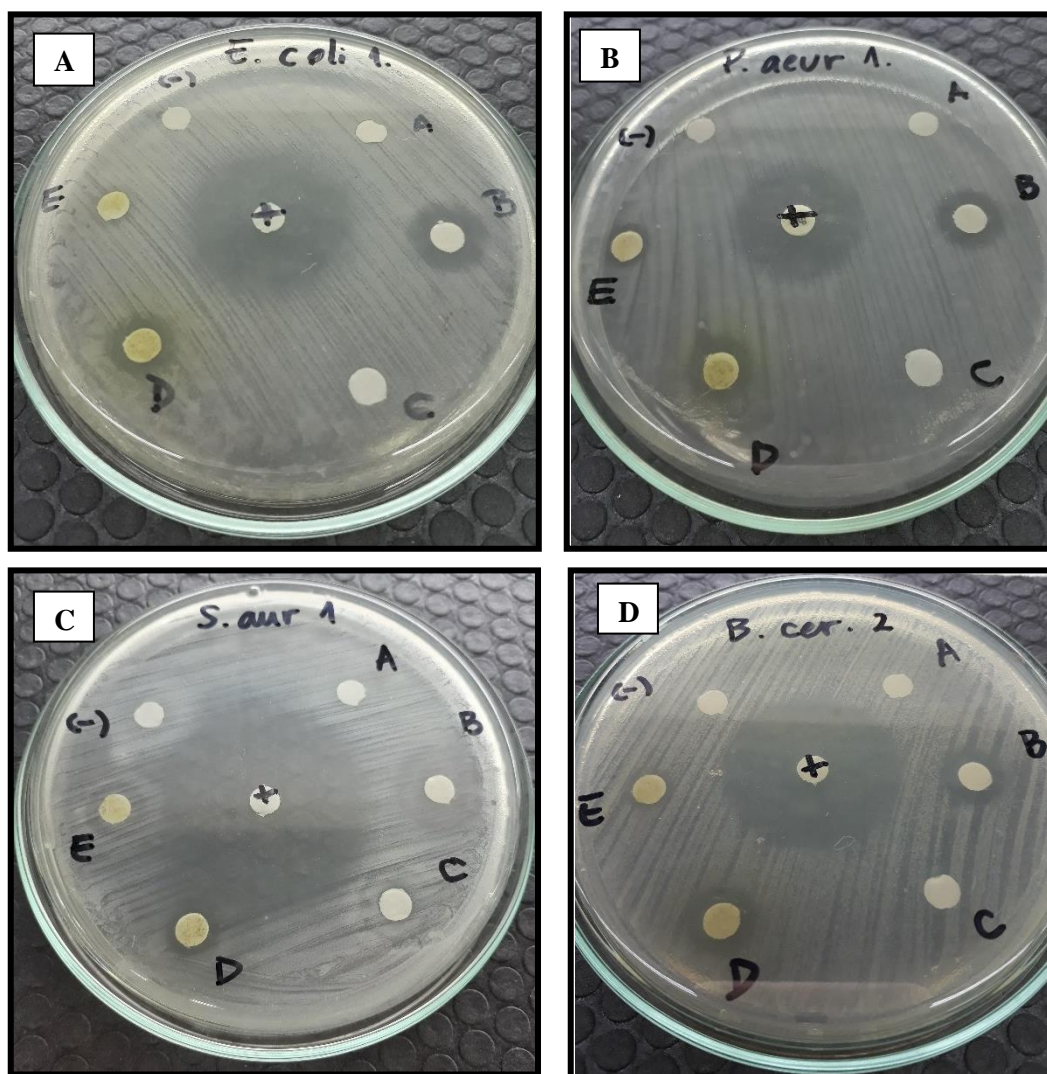


FIG. 6: Actividad antibacteriana de los extractos A, B, C, D y E sobre las cepas A: *E. coli*, B: *P. aeruginosa*, C: *S. aureus*, D: *B. cereus*

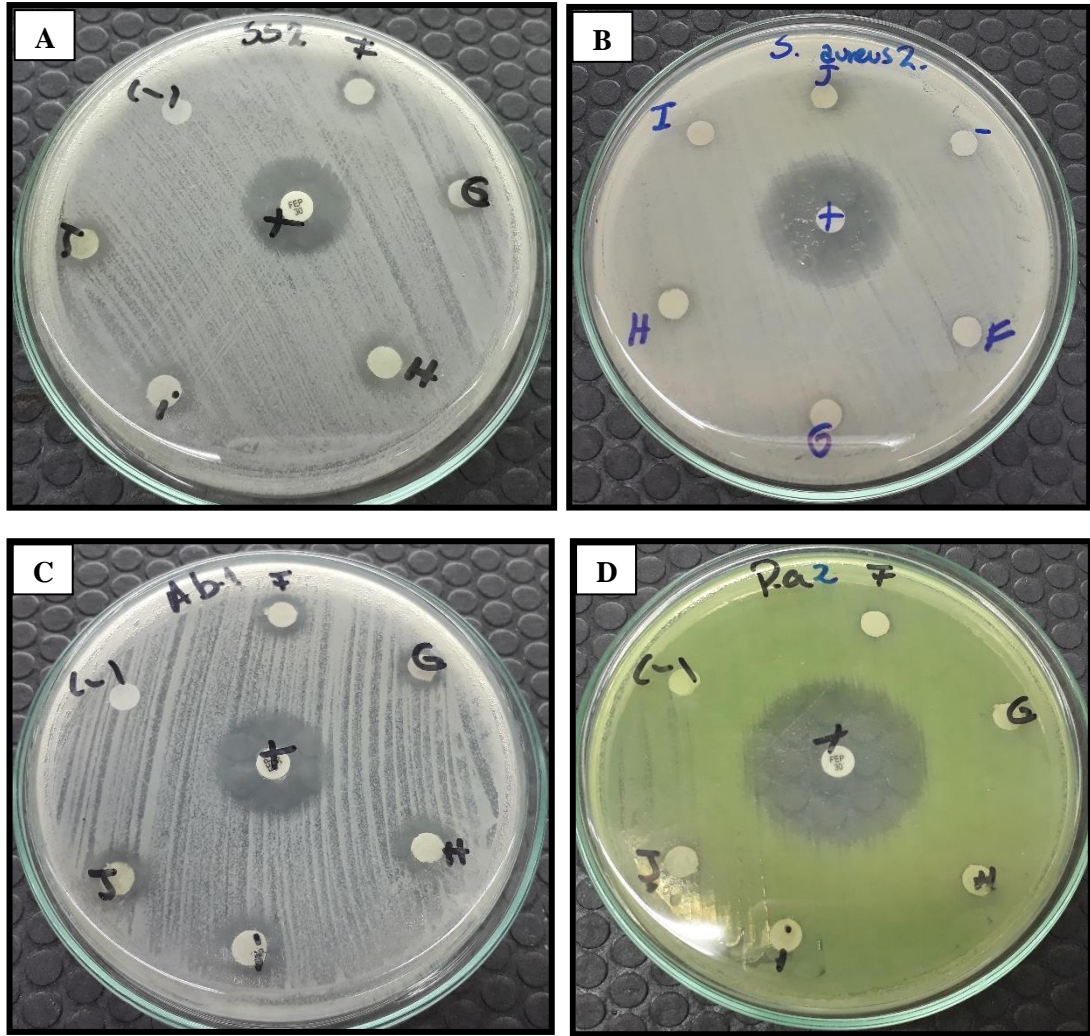


FIG. 7: Actividad antibacteriana de los extractos F, G, H, I y J sobre las cepas
A: *S. sonnei*, B: *S. aureus*, C: *A. baumannii*, D: *P. aeruginosa*

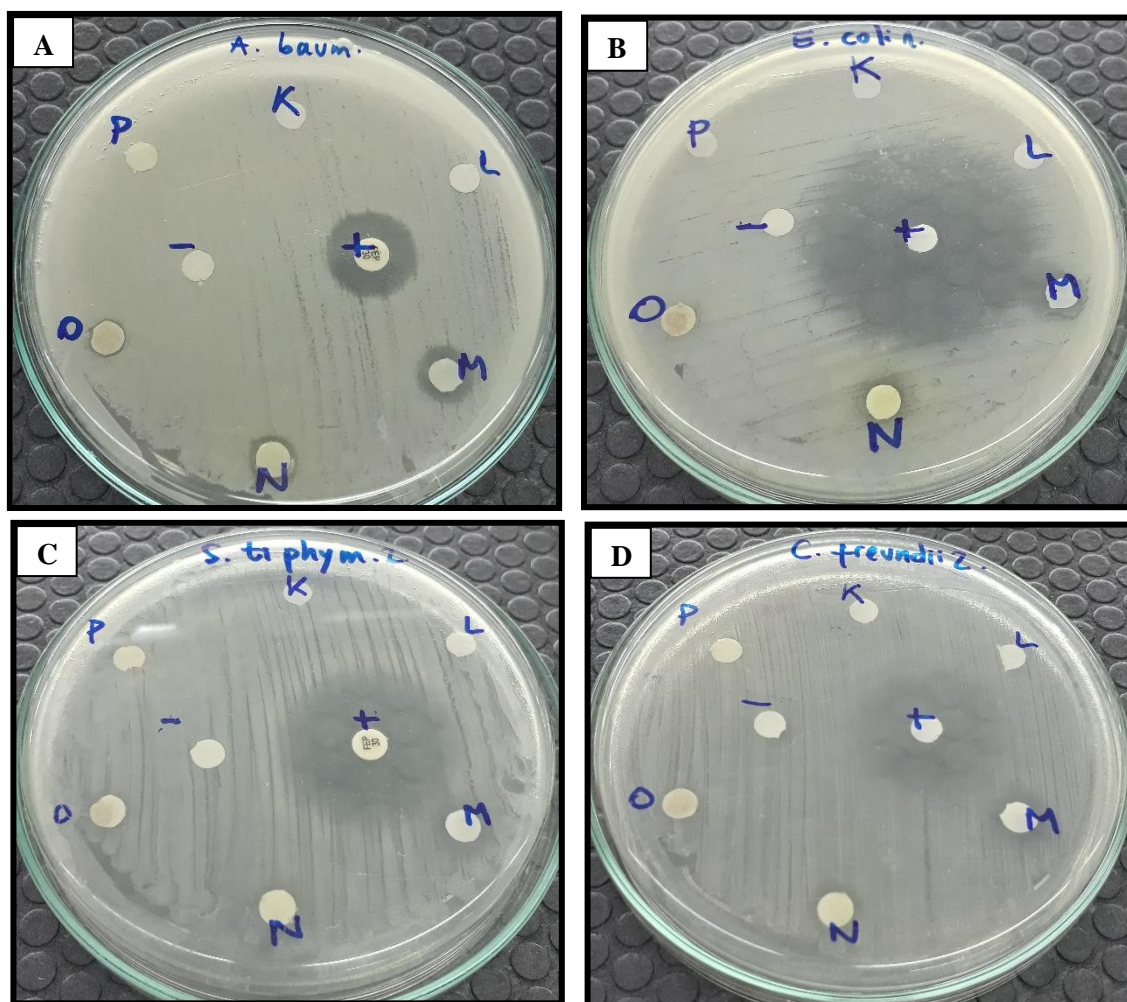


FIG. 8: Actividad antibacteriana de los extractos K, L, M, N, O y P sobre las cepas A: *A. baumannii*, B: *E. coli*, C: *S. typhimurium* D: *C. freundii*

6.2 Cromatografía en capa fina (CCF)

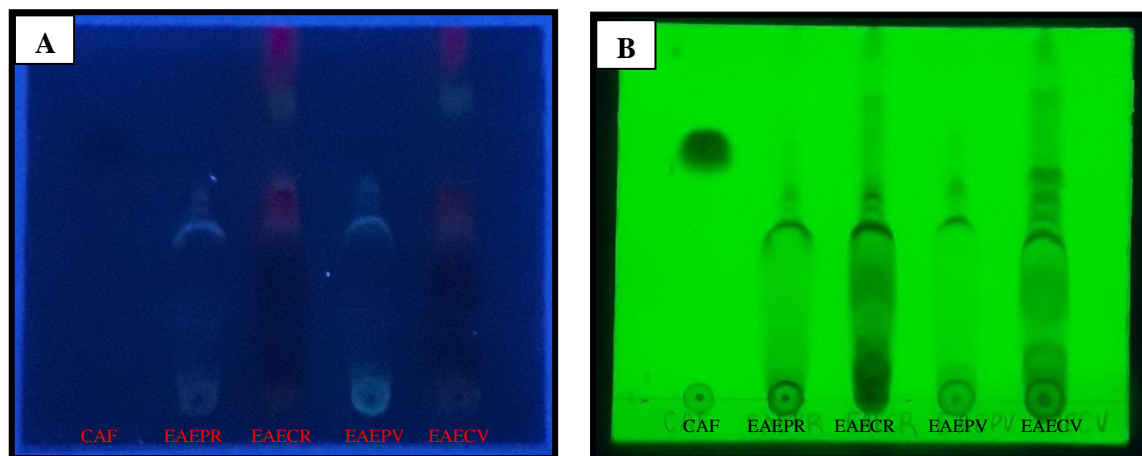


FIG. 9: Cromatografía en capa fina de los extractos. A: Espectro de luz azul a 366 nm. B: Espectro de luz fluorescente a 254 nm.

6.3 Bioautografía de los extractos

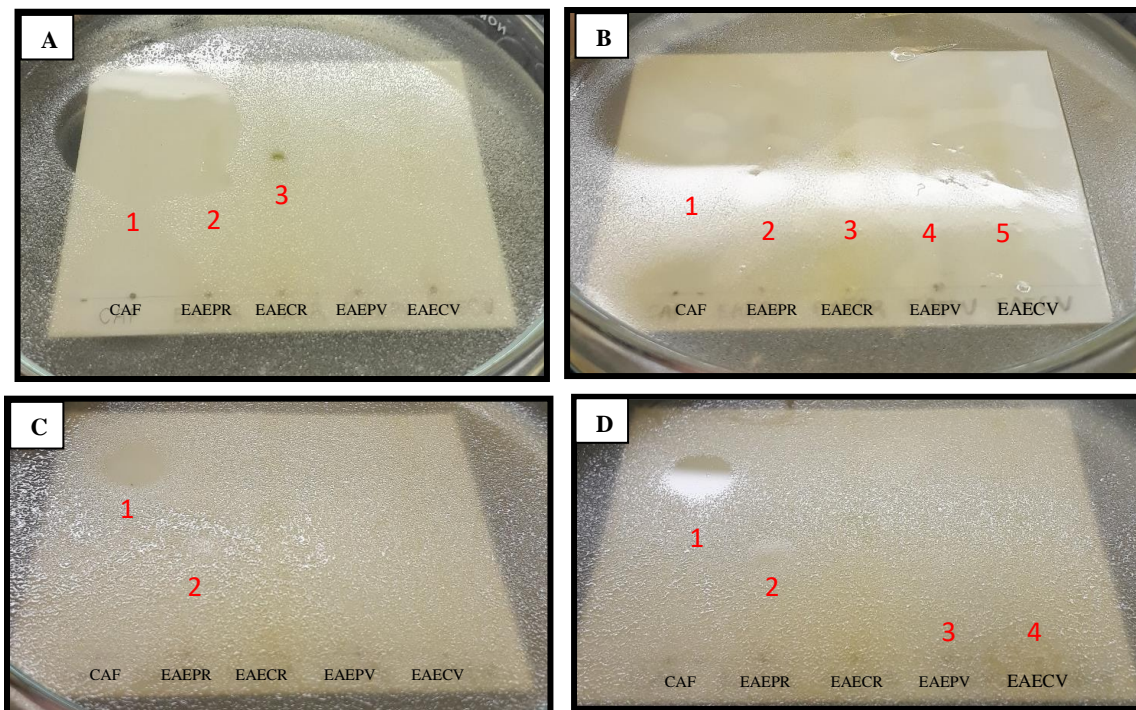


FIG. 10: Zonas de inhibición de los extractos B (EAEPR0319), D (EAECR0319), M (EAEPV0419) y N (EAECV0419) en distintas cepas bacterianas.

En **A** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *B. cereus* donde el n°1 es el halo de inhibición del CAF, el n°2 es la inhibición de EAEPR0319 y el n°3 es la inhibición de EAECR0319. En **B** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *E. cloacae* dónde el n°1 es el halo de inhibición del CAF, seguido del n° 2, 3, 4 y 5 que presentan inhibición a la misma altura para sus respectivos extractos. En **C** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *A. baumannii* donde el n°1 es la inhibición del CAF y el n° 2 indica donde se encuentra la pequeña inhibición de EAEPR0319. En **D** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *S. sonnei*, dónde el n°1 es el halo de inhibición del CAF, el n°2 es la inhibición de EAEPR0319, el n°3 y 4 es la inhibición de EAEPV0419 y EAECV0419 respectivamente.

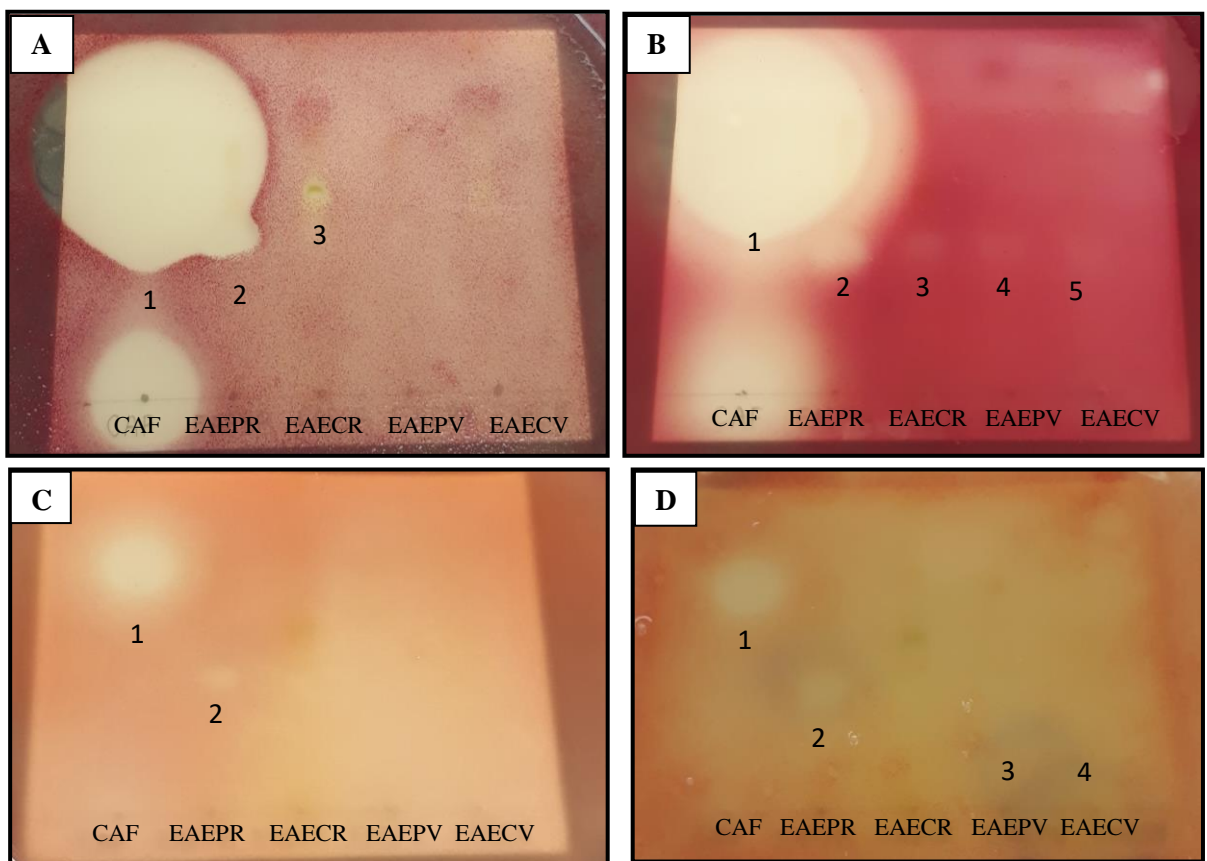


FIG. 11: Zonas de inhibición de los extractos B (EAEPR0319), D (EAECR0319), M (EAEPV0419) y N (EAECV0419) en distintas cepas bacterianas reveladas con el reactivo MTT (2:3:5-cloruro de trifeníl-tetrazolium).

En **A** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *B. cereus* donde el n°1 es el halo de inhibición del CAF, el n°2 es la inhibición de EAEPR0319 y el n°3 es la inhibición de EAECR0319. En **B** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *E. cloacae* donde el n°1 es el halo de inhibición del CAF, seguido del n° 2, 3, 4 y 5 que presentan inhibición a la misma altura para sus respectivos extractos. En **C** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *A. baumannii* donde el n°1 es la inhibición del CAF y el n° 2 indica donde se encuentra la pequeña inhibición de EAEPR0319. En **D** se observan las zonas de inhibición del crecimiento de *S. sonnei*, dónde el n°1 es el halo de inhibición del CAF, el n°2 es la inhibición de EAEPR0319, el n°3 y 4 es la inhibición de EAEPV0419 y EAECV0419 respectivamente.

TABLA 10: ENSAYO DE BIOAUTOGRAFÍA DE LOS EXTRACTOS DE ACETATO DE ETILO CON PLACAS CCF

Microorganismo	Descripción a las 24 horas
<i>Escherichia coli</i>	No se observó inhibición.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inhibición en EAEPR0319
<i>Salmonella typhimurium</i>	Inhibición en todos los extractos.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Inhibición a la misma altura en todos los extractos.
<i>Bacillus cereus</i>	Inhibición en EAECR0319
<i>Citrobacter freundii</i>	No se observó inhibición.
<i>Shigella sonnei</i>	Inhibición en EAEPR0319, EAEPV0419 y EAECV0419
<i>Candida albicans</i>	No se observó inhibición.
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Inhibición en EAEPR0319
<i>Staphylococcus aureus</i>	No se observó inhibición.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Inhibición en EAEPR0319, EAECR0319 y EAEPV0419

6.4 Obtención de las fracciones del extracto de Acetato de Etilo

Del extracto B (EAEPR0319) se obtuvieron 109 fracciones las que se unieron con fracciones parecidas según la visualización UV de la cromatografía en capa fina agrupándose finalmente en las siguientes fracciones, dónde B5 y B6 fueron las fracciones con Rf más parecidos a las placas de la bioautografía de los extractos:

TABLA 11: MASA DE FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO B (EAEPR0319)

FRACCIONES DEL EXTRACTO B (EAEPR0319)		
Código asignado	Fracciones obtenidas	Masa neta (mg)
B1	F1 – F10	8,4
B2	F11 – F26	2,5
B3	F27 – F28	1,0
B4	F33 – F39	0,8
B5	F40 – F46	2,5
B6	F47 – F66	5,5
B7	F67 – F83	1,6
B8	F84 – F109	5,0

Del extracto D (EAECR0319) se obtuvieron 57 fracciones las que se unieron con fracciones parecidas según la visualización UV de la cromatografía en capa fina agrupándose finalmente en las siguientes fracciones, dónde D2, D4 y D5 fueron las fracciones con Rf más parecidos a las placas de la bioautografía de los extractos:

TABLA 12: MASA DE FRACCIONES OBTENIDAS DEL EXTRACTO D (EAECR0319)

FRACCIONES DEL EXTRACTO D (EAECR0319)		
Código asignado	Fracciones obtenidas	Masa neta (mg)
D1	F1 – F8	16,4
D2	F9 – F10	4,0
D3	F11 – F18	170,4
D4	F19 – F30	11,4
D5	F31 – F38	9,3
D6	F39 – F48	14,0
D7	F49 – F57	12,2

6.5 Cromatografía en capa fina (CCF) de las fracciones

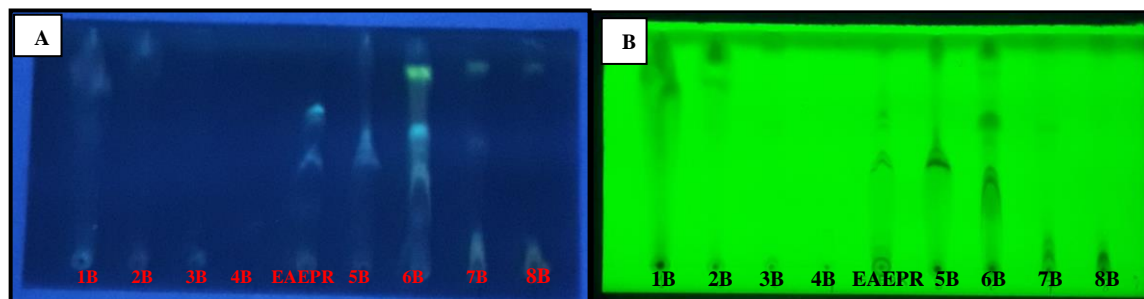


FIG. 12: Cromatografía en capa fina de las fracciones de EAEPR. A: Espectro de luz azul a 366 nm con reactivo revelador 2-Aminoetildifenilo borato (DPBA). B: Espectro de luz fluorescente a 254 nm.

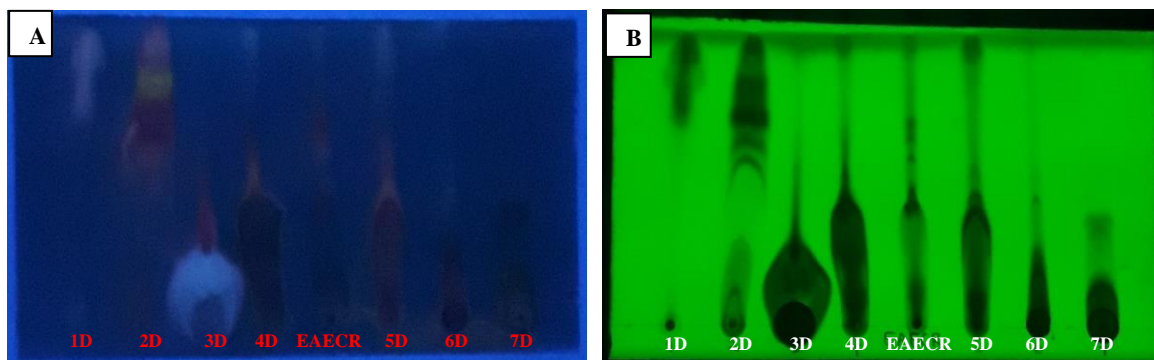


FIG. 13: Cromatografía en capa fina de las fracciones de EAECR. A: Espectro de luz azul a 366 nm con reactivo revelador 2-Aminoetildifenilo borato (DPBA). B: Espectro de luz fluorescente a 254 nm.

Para realizar el ensayo de bioautografía de las fracciones se utilizaron aquellas con Rf más parecidos al extracto, en el caso de EAECR (Extracto Acetato de Etilo Pulpa fruto rojo-morado) fueron las fracciones 5B y 6B. En el caso de EAECR (Extracto Acetato de Etilo Cáscara fruto rojo-morado) fueron las fracciones 2D, 4D y 5D.

6.6 Bioautografía con las fracciones

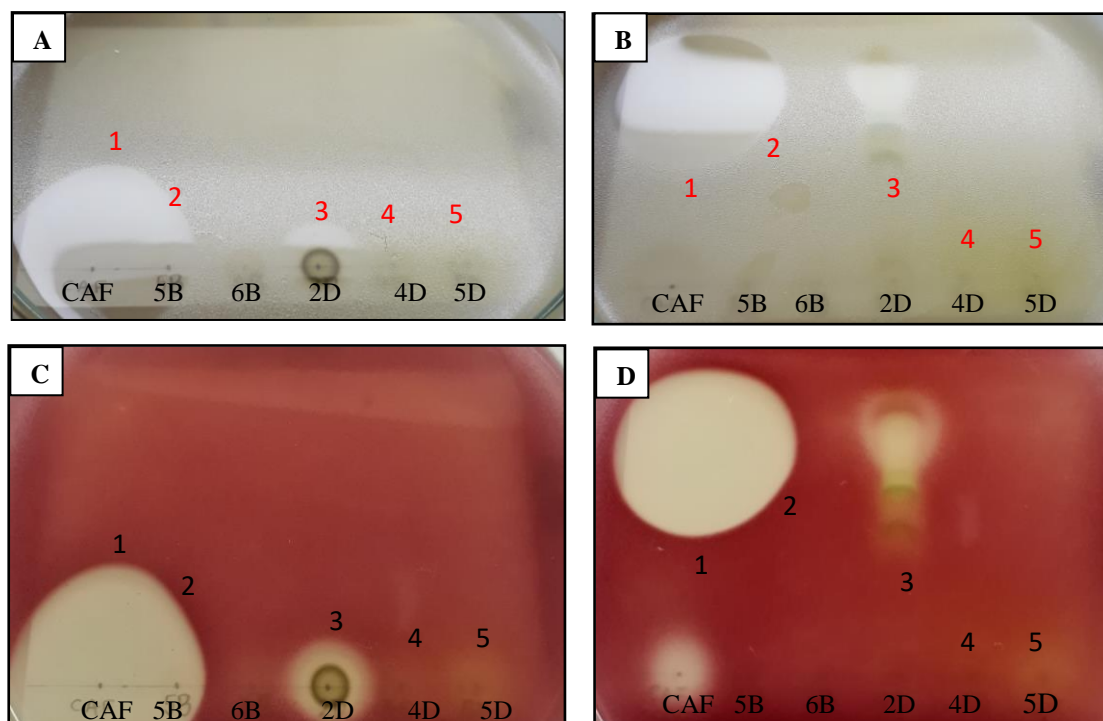


FIG. 14: Actividad antimicrobiana de las fracciones sobre *B. cereus*. A: Placa control de la técnica cromatográfica, dónde 1 es la inhibición del control de corrida (Cloranfenicol), 2 es la inhibición de 5B, 3 la inhibición de 2D, 4 es la inhibición de 4D y 5 es la inhibición de 5D. B: Placa CCF con zonas de inhibición marcadas. C: Placa control de la técnica cromatográfica con el reactivo revelador MTT(2:3:5 cloruro de trifenil-tetrazolium). D: Placa CCF con zonas de inhibición marcadas reveladas con el reactivo MTT.

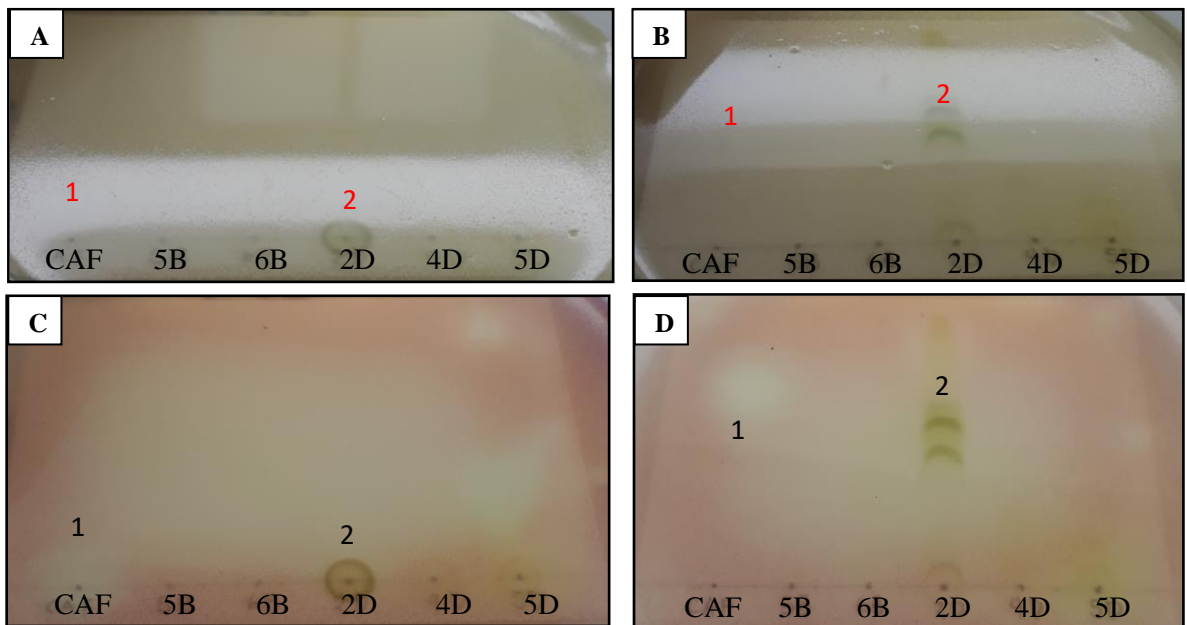


FIG. 15: Actividad antimicrobiana de las fracciones sobre *S. sonnei*. A: Placa control de la técnica cromatográfica, dónde 1 es la inhibición del control de corrida (Cloranfenicol), 2 es la inhibición de 2D. B: Placa CCF con zonas de inhibición marcadas. C: Placa control de la técnica cromatográfica con el reactivo revelador MTT. D: Placa CCF con zonas de inhibición marcadas reveladas con el reactivo MTT.

TABLA 13: ENSAYO BIOAUTOGRAFÍA DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

DESCRIPCIÓN A LAS 24 HORAS

Microorganismo	Placa control	Placa CCF
<i>Escherichia coli</i>	Inhibición en CAF se expande a 5B	Inhibición sólo en CAF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Inhibición sólo en CAF	Inhibición sólo en CAF
<i>Salmonella typhimurium</i>	Inhibición en CAF se expande a 5B	Inhibición en CAF se expande a 5B
<i>Enterobacter cloacae</i>	Inhibición sólo en CAF	Inhibición sólo en CAF
<i>Bacillus cereus</i>	Inhibición en CAF, 5B y 2D	Inhibición en CAF, 5B y 2D
<i>Shigella sonnei</i>	Inhibición en CAF y 2D	Inhibición en CAF y 2D expandida
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Inhibición sólo en CAF	Inhibición sólo en CAF
<i>Listeria monocytogenes</i>	Inhibición sólo en CAF	No crece

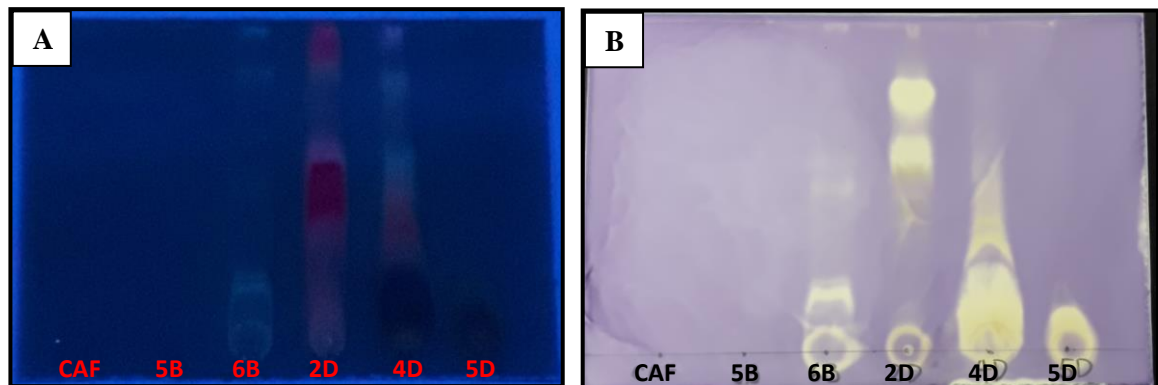


FIG. 16: Revelado de las fracciones. A: Espectro de luz UV a 366 nm. B: actividad antioxidante revelado con el reactivo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

7. DISCUSIÓN

En esta tesis se estudió la actividad antimicrobiana de 16 extractos provenientes del fruto del Copao en dos variedades distintas ya sea del fruto rojo-morado y el fruto verde en punta (Tabla 7 y 8).

Una amplia gama de tecnologías con diferentes métodos de extracción es aplicada en la exploración de compuestos con propiedades biológicas. Todos los métodos que emplean disolventes en los procedimientos (maceración, extracción asistida por microondas, extracción por sonicación, entre otros) están críticamente influenciados por los tipos de disolventes. Ningún efecto significativo es generado por el volumen de disolvente utilizado, sin embargo, los resultados cambian cuando se realizan evaluaciones del contenido de fenólicos, flavonoides, capacidad antioxidante, rendimiento total, entre otros (33, 34).

El extracto orgánico con menor rendimiento de masa fue el hexánico mientras que el de mayor rendimiento fue el etanólico para ambas variedades del fruto. Esto se debe a que la cantidad de compuestos apolares del fruto tenía menor concentración que los compuestos polares extraídos por estos solventes.

Desde los años 90 se vienen publicando investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de extractos de plantas incluyendo especias, hierbas secas, aceites esenciales o sus componentes, mostrando efecto antibacteriano frente a diversos tipos de bacterias como por ejemplo *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. dysenteriae*, *B. cereus*, y *S. aureus* (35, 36).

Existe una variedad de métodos manuales de laboratorio para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o un compuesto puro, los métodos más conocidos y básicos son los métodos de difusión en disco y dilución en caldo o agar y estos son métodos fáciles de realizar, reproducibles y de bajo costo (37).

El estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos impregnados en sensidiscos (Tabla 9) demostró que los extractos orgánicos del fruto del Copao tienen actividad antimicrobiana frente a cepas Gram positivo y Gram negativo, a excepción de *C. albicans* que no presentó inhibición. Los extractos con mayor actividad inhibitoria sobre las distintas bacterias utilizadas fueron los de acetato de etilo B, D, M y N (Fig. 6 y 8) inhibiendo el crecimiento de bacterias que clínicamente tienen panresistencia a los antibióticos y antimicrobianos como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, así como bacterias que transmiten ETAs. Por lo tanto, se continuó el trabajo investigativo sólo con estos extractos.

Los extractos crudos A, C, K, L y P no tuvieron actividad inhibitoria sobre ningún microorganismo, cabe destacar que A, C, K y L fueron los extractos hexánicos.

Los resultados de CCF (Fig. 9) mostraron que los extractos de acetato de etilo presentan perfiles de compuestos semejantes entre las cáscaras y las pulpas, pero las concentraciones de éstos fueron mayores en las cáscaras.

Existe en la literatura diversas investigaciones sobre el uso de bioautografía como una estrategia rápida y fácil para detectar e identificar fracciones/moléculas bioactivas (38, 39).

El análisis de la bioautografía (Fig. 10) reveló que los extractos de acetato de etilo del fruto rojo-morado tienen mayor inhibición que los frutos verdes en punta. El revelado de las placas con el reactivo MTT (Fig. 11) ayudó a confirmar la ubicación de los halos de inhibición. La inhibición en el extracto EAECR, sobre *B. cereus*, presentó un marcado halo mientras que los halos de inhibición sobre *E. cloacae* se observaron a una misma altura (Rf).

Las fracciones obtenidas por CC de los extractos de acetato de etilo fueron reveladas sobre luz UV (254 y 366 nm) para analizar los patrones de compuestos presentes y agruparlas (Fig 12 y 13). En la Fig.12 las fracciones 5B y 6B tuvieron Rf parecidos al extracto EAEPR y fueron seleccionadas para el ensayo de bioautografía. En la Fig. 13 las fracciones 2D, 5D y 6D presentaron Rf parecidos al extracto EAECR y fueron seleccionadas para el ensayo de bioautografía.

En la Fig. 14 se observan los resultados del ensayo de bioautografía sobre *B. cereus* de las fracciones seleccionadas. Las placas controles (A y C) mostraron halos de inhibición en el punto de origen de la fracción 2D; así mismo se observaron marcados halos de inhibición en las placas B y D de la misma fracción. En la Fig. 15 se observaron los mismos resultados que en la Fig. 14 pero esta vez sobre *S. sonnei*.

La actividad antioxidante usando el reactivo DPPH es el método más común y con más de 17 mil artículos citados en la literatura, debido a que es muy práctico de ser realizado en comparación a otros ensayos (40). Los flavonoides son una de las clases de metabolitos secundarios que se producen en diferentes partes de una planta. Ellos presentan una amplia gama de efectos farmacológicos y beneficiosos para la salud, los cuales incluyen capacidad antioxidante, prevención de enfermedades coronarias, anti ateroscleróticas, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, anticancerígenas, entre otras. Los flavonoides exhiben bajos

niveles de fluorescencia y no pueden ser vistas en concentraciones fisiológicas relevantes *in vivo*. Hace décadas fue desarrollado un método de visualización de ellas usando el reactivo 2-Aminoetildifenilo borato (DPBA) (41).

Las placas de CCF de los extractos de acetato de etilo de las fracciones seleccionadas fueron reveladas con los reactivos DPBA y DDPH. El resultado de estas revelaciones mostró que las fracciones tienen compuestos tipo flavonoides, por las fluorescencias presentadas; así también capacidad antioxidante por las manchas de color amarillo claro (Fig. 16).

La posible inhibición de la fracción 5B se vio ocultada por el gran halo de inhibición del cloranfenicol.

Los resultados obtenidos en esta tesis revelaron que los extractos de acetato de etilo del fruto del Copao presentaron marcada inhibición sobre *B. cereus* en comparación de los otros microorganismos utilizados. Los posibles compuestos responsables de esta actividad serían del tipo “flavonoides” según los reactivos reveladores (DPBA y DDPH). Estos resultados concuerdan con diversos estudios sobre la misma familia de Cactaceae, donde extractos orgánicos de diferentes partes del cactus presentan inhibición del crecimiento bacteriano (42, 43). Velásquez & Montenegro (44) relatan que plantas nativas/endémicas de Chile son fuente potencial de compuestos con propiedades antioxidantes y antibacterianas.

8. CONCLUSIÓN

- Los extractos de acetato de etilo presentaron la mejor actividad antimicrobiana frente a los extractos hexánicos, etanólicos y metanólicos, mientras que los extractos hexánicos fueron los menos efectivos en la inhibición. La fracción 2D obtenida por CC del extracto acetato de etilo (EAECR) presentó una destacada actividad antibacteriana frente a *B. cereus* y *S. sonnei*. Esta investigación científica evidencia la capacidad antimicrobiana de los extractos orgánicos del fruto del Copao.
- Los resultados obtenidos en esta tesis son inéditos, haciendo del fruto del Copao una potencial fuente alimenticia con propiedades antibacterianas, sin embargo, se requiere profundizar en aspectos químicos y moleculares de las fracciones activas dada la importancia de encontrar nuevas sustancias con capacidades antimicrobianas de naturaleza vegetal y por ende menos tóxicas para enfrentar la resistencia bacteriana que aparecen en estos microorganismos patógenos para el ser humano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez R, Chavarría R, Loría J, Rocha J. Conocimiento sobre el uso de antibióticos por personal médico del Servicio de Urgencias. *Medigraphic*. 2009; 1(1): 18-24.
2. Alvo A, Téllez V, Sedan C, Fica A. Basic concepts for the rational use of antibiotics in otorhinolaryngology. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza cuello*. 2016; 76(1): 136-147.
3. Beltrán C. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos: Utilidad práctica. *Rev. Chil Infect*. 2004; 21(1): 39-44.
4. Millanao A, Barrientos C, Siegel-Tike C, Tornova A, Ivanova L. Resistencia a los antimicrobianos en Chile y el paradigma de *Una Salud*: manejando los riesgos para la salud pública humana y animal resultante del uso de antimicrobianos en la acuicultura del salmón y en medicina. *Rev. Chil Infect*. 2018; 35(3): 299-303.
5. Labarca J, Araos R. Resistencia antimicrobiana: Problema en aumento y soluciones escasas. *Rev. Chil infect*. 2009; 26(1): 8-9.
6. Talbot G, Bradley J, Edwards J, Gilbert D, Scheld M, Bartlett J. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *CID*. 2006; 42(5): 657-668.
7. Moreno C, González R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza cuello*. 2009; 69(1): 185-192.
8. Reyes A, Bonilla S. *Escherichia coli*. Universidad Veracruzana, 2011 [Internet]. [Consultado 23 de Abril 2019]. Disponible en <https://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-l.pdf>
9. OMS [Internet]. [Consultado 23 de Abril 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
10. Seija V. Etiopatogenia microbiológica. Universidad de la República Uruguay, 2008 [Internet]. [Consultado 23 de Abril 2019]. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>

- 11.INSHT. Ficha de agentes biológicos: *Listeria monocytogenes*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2016 [Internet]. [Consultado 23 de Abril 2019]. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Listeria%20monocytogenes%202017.pdf>
- 12.OMS [Internet]. [Consultado 23 de Abril 2019]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(nontyphoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(nontyphoidal))
- 13.González A, Alós J. Shigelosis, la importancia de la higiene en la prevención. *Rev. Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2015; 33(3): 143-144.
- 14.Salvador-Luján G, García R, Gonzales E. Caracterización de metalo- β -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes hospitalizados en el Hospital Militar Central. *Rev. Peru Med Exp Salud Pública.* 2018; 35(4): 36-41.
- 15.Vanegas J, Roncancio G, Jiménez J. *Acinetobacter baumannii*: Importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Rev. CES Medicina.* 2014; 28(2): 233-246.
- 16.Castañón L. Candidiasis o Candidosis. Universidad Nacional Autónoma de México. 2016 [Internet]. [Consultado 23 de Abril 2019]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
- 17.Silva F, Martínez P. Retrato Microbiológico: Complejo *Enterobacter cloacae*. *Rev. Chil Infect.* 2018; 35(3): 297-298.
- 18.Puerta A, Mateos F. Enterobacterias. *Rev. Medicine.* 2010; 10(51): 3426-31.
- 19.Pérez I. *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Rev. Cubana de Salud Pública.* 2012; 38(1): 98-108.
- 20.Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap.* 2003; 16(4): 385-393.
- 21.Guerrero P, León P. Ficha antecedentes de especie: *Eulychnia Ácida Phil.* Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). 2018; 3(1): 1-5.
- 22.Jana C, Salvatierra A, Díaz D, Martínez L. Morphological and genetic characterization among wild populations of Copao (*Eulychnia Ácida Phil.*) cactus endemic to Chile. *Chil J Agr Res.* 2017; 77(1): 3-14.

23. Jiménez-Aspee F, Quispe C, Soriano MDPC, Fuentes J, Hüneke E, Theodoluz C, Schmeda-Hirschmann G. Antioxidant activity and characterization of constituents in copao fruits (*Eulychnia Ácida Phil.*, Cactaceae) by HPLC–DAD–MS/MSⁿ. Food Res. Int. 2014; 62(1): 286–298.
24. Jiménez-Aspee F, Alberto MR, Quispe C, Soriano MDPC, Theodoluz C, Isla MI, Schmeda-Hirschmann G. Anti-inflammatory activity of Copao (*Eulychnia Ácida Phil.*, Cactaceae) fruits. Plant Foods Hum Nutr. 2015; 70(2): 135–40.
25. INSHT. Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del n-HEXANO. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2007 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valores_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2036.pdf
26. MERCK. Ficha de datos de seguridad n-hexano. 2016 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/msds/MDA_CHEM104369?Origin=PDP
27. INSHT. Documentación toxicológica para la actualización del límite de exposición profesional del Acetato de etilo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2018 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/MIGRAR%20VARIAS/MIGRAR%20LEP%20_VALORES%20LIMITE/Doc_Toxicologica/114%20en%20adelante/DLEP%20120%20Acetato%20de%20etilo%20%20A%C3%B1o%202018.pdf
28. MERCK. Ficha de datos de seguridad acetato de etilo. 2019 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/msds/MDA_CHEM100868?Origin=PDP
29. INSHT. Documentación toxicológica para la actualización del límite de exposición profesional del Etanol. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. 2007 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en:

http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/Valor es_Limite/Doc_Toxicologica/FicherosSerie2/DLEP%2021.pdf

30. MERCK. Ficha de datos de seguridad etanol. 2019 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/msds/MDA_CHEM107017?Origin=PDP
31. MERCK. Ficha de datos de seguridad metanol. 2019 [Internet]. [Consultado 29 de Abril 2019]. Disponible en: http://www.merckmillipore.com/CL/es/product/msds/MDA_CHEM106009?Origin=PDP
32. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en Plantas de Importancia Médica. 2016. Consultado 07 de mayo de 2019. Disponible en <https://books.google.cl/books?id=8kgcDQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Enofarmacolog%C3%ADa+productos+naturales+2017&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjB9KCF8IniAhXhJbkGHYupDucQ6AEIKDAA#v=onepage&q&f=false>
33. Azwanida NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* 2015; 4(3): 1000196.
34. Hayouni EA, Abedrabba, M, Bouix, M, Hamdi M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenica* L. fruit extracts. *Food Chem* 2007; 105: 1126–1134.
35. Burt S. Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 94 (3): 223-253.
36. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100 (2): 80-84.
37. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *JPA.* 2015; 6 (2): 71-79.
38. Guerrini A, Sacchetti G, Grandini A, Spagnoletti A, Asanza M, Scalvenzi L. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2016; (12):1-8

39. Zhong-Lin S, Tao L, Shuang-Ying W, Xiao-Yue J, Qing M. TLC-bioautography directed isolation of antibacterial compounds from active fractionation of *Ferula ferulioides*. *Nat. Prod. Res.* 2019; 33(12): 1761-1764.
40. Akar Z, Küçük M, Doğan H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs *J. Enzyme. Inhib. Med. Chem.* 2017; 32(1): 640–647
41. Ferrara BT, Thompson EP. A method for visualizing fluorescence of flavonoid therapeutics in vivo in the model eukaryote *Dictyostelium discoideum*. *Biotechniques.* 2019; 66(2): 65-71.
42. Premlata S, Kumar MK, Kumar P. Comparative study of antibacterial properties of flavonoids of leaves from different cactus, perennial grasses and medicinal plant. *AJPRD.* 2018; 6(3): 32-41.
43. Suryawanshi P, Vidyasagar GM. Antimicrobial Activity of *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill Fruit and Cladode Extracts. *IJPPE.* 2016; 3: 84-89.
44. Velásquez P, Montenegro G. Chilean Endemic/Native Plant Resources as Functional and Superfoods. En: Viduranga Waisundara and Naofumi Shiomi. *Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization.* IntechOpen; 2017. p. 131-154.