



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**Actividad antimicrobiana contra bacterias gastrointestinales y
fitoquímica de los extractos de las hojas y látex de *Brosimum
utile* (Kunth) Pittier**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: CRISTIAN ISRAEL SILLAGANA VERDEZOTO

TUTOR: JAN SPENGLER PhD.

CO-TUTOR: YEIMY MARLENE ROJAS DE HIDALGO PhD (c).

Napo- Ecuador

2023

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 11 de mayo de 2023

Yo, Cristian Israel Sillagana Verdezoto con documento de identidad N° 1600738619, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniero en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,



Cristian Israel Sillagana Verdezoto

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Yo, **Cristian Israel Sillagana Verdezoto**, con documento de identidad N° **1600738619**, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: **Actividad antimicrobiana contra bacterias gastrointestinales y fitoquímica de extractos de las hojas y látex de *Brosimum utile* (Kunth) Pittier**, de conformidad con el Art.114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Super.

Tena, 11 de mayo de 2023



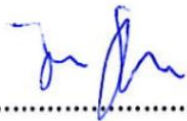
Cristian Israel Sillagana Verdezoto

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certificamos que el trabajo de integración curricular titulado: **Actividad antimicrobiana ~~contra~~ bacterias gastrointestinales y fitoquímica de extractos de las hojas y látex de *Brosimum utile* (Kunth) Pittier**, en la modalidad de: artículo, fue realizado por: Cristian Israel Sillagana Verdezoto, bajo nuestra dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 11 de mayo de 2023



PhD. Jan Spengler
C.I: 1757762099



Mgs. Yeimy Rojas
C.I: 1757847783

AGRADECIMIENTO

A Iliana Alcocer PhD. y Mgs. Fernanda Yauri de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE); a Lorena Mejía PhD. de la Universidad San Francisco de Quito; a Carolina Proaño PhD. y a la ingeniera Giovanna Morán de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, por la generosa donación de las cepas bacterianas empleadas en este estudio. A la Mgs. Amanda Cevallos de la PUCE por la donación de los reactivos químicos. A mis tutores Jan Spengler PhD. y Yeimy Rojas PhD (c). por el apoyo constante durante todo el proceso de la investigación. A la técnica del Laboratorio de Biología Molecular de Docencia, Andrea Carolina Castro por el apoyo académico y personal durante todo el proceso. A los técnicos Giovanna Morán, Joel Medina y Carolina Ñacato por el apoyo académico durante mi estancia en sus laboratorios. A Juan Grefa por ser él guía durante la recolección del material vegetal.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi madre Carmen Lucía, por el apoyo incondicional durante todo el proceso de formación profesional y personal. A mis hermanos Alison y Roger por su apoyo. A mi abuelita Rosa, quien fue mi inspiración para iniciar esta investigación y por la cual me enfoque en estudiar enfermedades gastrointestinales.

ÍNDICE GENERAL

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Autorización de publicación en el repositorio institucional	¡Error! Marcador no definido.
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	4
Obtención de las hojas y látex del árbol de sande	4
Extracción sólido-líquido (Soxhlet) de metabolitos de las hojas	5
Extracción líquida- líquida de metabolitos del látex.....	5
<i>Obtención de los extractos del látex mediante fraccionamiento con solventes</i>	5
<i>Obtención de los extractos de alcaloides de látex</i>	5
<i>Obtención del extracto acuoso de látex</i>	6
Ensayos antimicrobianos	6
<i>Cepas bacterianas</i>	6
<i>Ensayo de difusión en agar</i>	7
<i>Evaluación de sinergismo</i>	7
<i>Concentración mínima inhibitoria y actividad bactericida</i>	7
Caracterización Fitoquímica	8
<i>Tamizaje fitoquímico preliminar</i>	8
<i>Determinación del contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides totales mediante espectrofotometría UV-Vis</i>	9
<i>Ensayo de captación de radicales libres</i>	10
Análisis estadístico	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
Rendimiento de los extractos de las hojas	11
Rendimiento de los extractos de látex	11
Ensayos biológicos	12

<i>Actividad antibacteriana de los extractos del árbol de sande</i>	13
<i>Evaluación de sinergismo</i>	14
<i>Concentración mínima inhibitoria y bactericida</i>	14
Análisis de la caracterización fitoquímica.....	16
<i>Tamizaje fitoquímico</i>	16
<i>Determinación del contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides totales</i>	17
<i>Análisis de antioxidantes</i>	18
CONCLUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	1
ANEXOS	1

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rendimiento de los extractos de las hojas de árbol de sande.	11
Tabla 2. Rendimiento de los extractos de látex de árbol de sande.....	12
Tabla 3. Identificación bioquímica y fenotípica de las bacterias gastrointestinales estudiadas.....	12
Tabla 4. Diámetro de los halos de inhibición de los extractos de alcaloides de látex del árbol de sande frente a bacterias gastrointestinales.	13
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de los extractos de alcaloides de látex del árbol de sande frente a bacterias gastrointestinales.....	15
Tabla 6. Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos de hoja y látex del árbol sande.	17
Tabla 7. Contenido total de flavonoides, fenoles y alcaloides de los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.	18
Tabla 8. Porcentaje de eliminación de radicales libres del ácido ascórbico (AC) y extractos activos del árbol de sande.	19

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexos 1.** Morfología de las hojas del árbol de sande después de ser secadas durante 72 horas a 37°C.
- Anexos 2.** Obtención del látex del árbol de sande mediante una corte transversal en forma de V.
- Anexos 3.** Halos de inhibición de los extractos de alcaloides de látex (54,7 mg/mL) frente a bacterias gastrointestinales.
- Anexos 4.** Sinergismo entre los extractos de alcaloides de látex (54,7 mg/mL) con la amoxicilina (1 mg/mL) frente a *E. faecalis*.
- Anexos 5.** Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.
- Anexos 6.** Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.
- Anexos 7.** Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales presentes en los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.
- Anexos 8.** Curva de calibración de atropina para la cuantificación de alcaloides totales presentes en los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.

RESUMEN

Introducción: las infecciones gastrointestinales son una amenaza para el sistema de salud a nivel mundial, es por ello que se buscan alternativas frente a la resistencia bacteriana a partir de moléculas bioactivas procedentes de plantas usadas en la medicina ancestral. **Objetivo:** determinar la actividad antimicrobiana frente a bacterias gastrointestinales y caracterizar fitoquímicamente los extractos de las hojas y látex de *Brosimum utile*. **Métodos:** se realizaron extracciones de metabolitos de las hojas y del látex de *B. utile*. La actividad antimicrobiana se evaluó frente a nueve bacterias gastrointestinales usando la técnica de difusión en agar y concentración mínima inhibitoria con resazurina. Adicionalmente, se evaluó la posible existencia de sinergismos entre antibióticos comerciales con los extractos activos. Se realizaron ensayos de tamizaje fitoquímico, cuantificación de fenoles, flavonoides, alcaloides y captación de radicales libres con DPPH. **Resultados:** todas las bacterias fueron susceptibles a los extractos de alcaloides del látex; en cambio, los extractos clorofórmico y metanólico de las hojas solo inhibieron el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Los extractos de alcaloides presentaron acción sinérgica con la amoxicilina frente a *Enterococcus faecalis*. La evaluación fitoquímica demostró la presencia de fenoles, flavonoides, ácidos grasos, alcaloides, quinonas y terpenos. Los extractos de alcaloides presentaron mayor actividad antioxidante y posiblemente protegen la capa interna del estómago del estrés oxidativo (actividad gastroprotectora). **Conclusión:** los extractos de alcaloides del látex presentaron actividad antibacteriana significativamente mayor y una acción sinérgica con la amoxicilina, así como una mayor presencia de componentes fitoquímicos y una actividad antioxidante más destacable en comparación a los extractos de hojas.

Palabras claves: Árbol de sande, Bacterias gastrointestinales, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*.

ABSTRACT

Introduction: gastrointestinal infections are a threat to the health system worldwide, which is why alternatives are sought against bacterial resistance from bioactive molecules from plants used in ancestral medicine. **Objective:** to determine the antimicrobial activity against gastrointestinal bacteria and to characterize phytochemically the extracts of the leaves and latex of *Brosimum utile*. **Methods:** extractions of metabolites from the leaves and latex of *B. utile* were performed. The antimicrobial activity was evaluated against nine gastrointestinal bacteria using the agar diffusion technique and minimum inhibitory concentration with resazurin. Additionally, the possible existence of synergisms between commercial antibiotics with the active extracts was evaluated. Phytochemical screening tests, quantification of phenols, flavonoids, alkaloids, and free radical uptake were performed with DPPH. **Results:** all the bacteria were susceptible to the latex alkaloid extracts; instead, the chloroform and methanolic extracts of the leaves only inhibited the growth of *Listeria monocytogenes*. The alkaloid extracts presented synergistic action with amoxicillin against *Enterococcus faecalis*. The phytochemical evaluation demonstrated the presence of phenols, flavonoids, fatty acids, alkaloids, quinones and terpenes. The alkaloid extracts showed higher antioxidant activity and possibly protect the inner layer of the stomach from oxidative stress (gastroprotective activity). **Conclusion:** the alkaloid latex extracts presented significantly higher antibacterial activity and a synergistic action with amoxicillin, as well as a greater presence of phytochemical components and a more remarkable antioxidant activity compared to the leaf extracts.

Keywords: árbol de sande, Gastrointestinal bacteria, *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales se caracterizan por dos entidades clínicas diferenciadas: infección gástrica producida por *Helicobacter pylori* y gastroenteritis.¹ *Helicobacter pylori*, es el agente infeccioso causante de gastritis crónica. En cambio, la gastroenteritis es una enfermedad que se caracteriza principalmente por presentar diarrea, vómito, fiebre y dolor abdominal. Los agentes causales de la gastroenteritis son virus, bacterias, parásitos y hongos, quienes producen inflamación de la mucosa gástrica e intestinal.² En esta investigación nos enfocamos en bacterias que producen enfermedades y generan preocupación a nivel mundial como la salmonelosis, shigelosis y listeriosis.

Solo la salmonelosis cada año causa alrededor de 93,8 millones de casos de infección, del cual, 15500 se derivan en mortalidad.³ La shigelosis produce 80 millones de casos de diarrea y 700 muertes, de estos el 60% de la mortalidad ocurren en niños menores de 5 años.⁴ Los listeriosis genera 1600 casos cada año con 260 defunciones.⁵ Otros agentes bacterianos que ocasionan infecciones gastrointestinales en menor grado son *Staphylococcus aureus*, que se conoce mayormente por causar infecciones en la piel y el tracto respiratorio superior⁶ y *Enterococcus faecalis*, causante de infecciones genitourinarias y gastrointestinales.⁷

Los antibióticos constituyen el tratamiento para combatir infecciones bacterianas. Sin embargo, el uso indiscriminado y mal uso de los antimicrobianos han incrementado el apareamiento de bacterias resistentes dificultando la eficiencia de los tratamientos, incrementando los costos de hospitalización, morbilidad y mortalidad de los pacientes.⁸ La Organización Mundial de la Salud menciona que la resistencia microbiana es una amenaza mundial, dado que puede afectar a los individuos sin importar la edad o el país de origen.^{4,9}

Los compuestos químicos procedentes de las plantas medicinales son una fuente de productos naturales con actividad antimicrobiana. Ejemplo de ellos lo constituye la galangina, el cual es un flavonoide con actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y fue aislado de las raíces de *Helichrysum aureonitens*. Así también nos encontramos a la piperina, alcaloide con actividad antibacteriana y antifúngica aislada de *Piper nigrum*.¹⁰⁻¹³

Brosimum utile (Kunth) Pittier es un árbol nativo que pertenece a la familia Moraceae y comúnmente es conocido como árbol de sande o sandy. Dentro de la nacionalidad cofán utilizan el látex del árbol como medicina ancestral por sus propiedades gastroprotectora, antidiarreica, y astringente.¹⁴ Investigaciones han demostrado que los extractos de látex de *Brosimum utile* presentan alcaloides y poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Psudomona* spp., *Klebsiella* spp., *Thichopyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Candida albicans*.¹⁴

El látex es un fluido lechoso producido por estructuras secretoras complejas denominadas laticíferos, que se encuentran en una amplia variedad de plantas.¹⁵ El cual puede exhibir moléculas que son responsables de la actividad antimicrobiana como proteínas, metabolitos secundarios e inclusive péptidos antimicrobianos. Este fluido puede presentar varios colores de acuerdo a la especie, desde blanco lechoso a amarillento, naranja a marrón e incluso incoloro.¹⁶

Se ha reportado que los extractos de látex presentan moléculas con actividad antioxidante como el maltol y el ácido butánico.¹⁷ Además, los extractos de las plantas lactíferas poseen la capacidad de capturar radicales libres.¹⁸ La actividad antioxidante del látex es importante destacar porque algunos agentes antioxidantes como el ácido ascórbico tienen efecto protector sobre la mucosa gástrica.¹⁹

Nuestro propósito es determinar la actividad antimicrobiana frente a bacterias gastrointestinales de importancia clínica y caracterizar fitoquímicamente los extractos de las hojas y látex de *Brosimum utile* (Kunth) Pittier.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las hojas y látex del árbol de sande

El material vegetal fue colectado en la comunidad Guambula del cantón Archidona (S 00°53.949' y W 077°50.265'). Se recolectaron hojas maduras y 2 L de látex crudo del árbol de sande haciendo un corte en V en el tallo.

Extracción sólido-líquido (Soxhlet) de metabolitos de las hojas

Las hojas recolectadas se lavaron con agua destilada y se secaron al ambiente por cuatro horas. Luego, se mantuvieron en la estufa a 37 °C por 72 horas y se trituraron hasta obtener un polvo fino. Un total de 10 g del polvo seco se extrajeron con el equipo Soxhlet con 300 mL de metanol durante 48 horas. El extracto se concentró en un rotaevaporador y se mantuvo a 4 °C hasta su posterior análisis. El mismo procedimiento se repitió para los extractos con cloroformo y hexano.

Extracción líquida-líquida de metabolitos del látex

Para la extracción de metabolitos del látex se usaron dos protocolos estandarizados y se emplearon diferentes solventes para eliminar las sustancias neutras presentes en el látex, tales como ceras, mucílagos y gomas, que podrían afectar la solubilidad de los extractos en los ensayos de actividad biológica.

Obtención de los extractos del látex mediante fraccionamiento con solventes

Se realizó una primera extracción de metabolitos de látex. Se maceró durante 24 horas 500 mL de látex con 500 mL metanol en una botella y se filtró. El producto de la filtración se rotaevaporará a 40 °C hasta eliminar el metanol. Seguidamente, la solución restante se extrajo con 250 mL de hexano. La fase orgánica se concentró en un rotaevaporador y la fase acuosa se mezcló con 125 mL metanol y 125 mL de agua. Después, se agregaron 250 mL de éter dietílico. Las fases etérea y metanólica se concentraron por separado. Seguidamente, se mezclaron 350 mL de acetona con el residuo gomoso de la filtración obtenida previamente. La fase acetónica se concentró hasta su sequedad.²⁰

Obtención de los extractos de alcaloides de látex

Por otro lado, se realizó una la extracción de alcaloides. Primero, se mezclaron 500 mL metanol con 500 mL de látex y se filtró. El residuo con textura gomosa y coloración lechosa se descartó y el filtrado se acidificó con agua acidulada hasta un pH de 1. Nuevamente, se filtró y el producto ácido se alcalinizó con una solución de hidróxido de sodio al 50% (m/v) hasta un pH de 9. Seguidamente, la solución resultante se extrajo con 250 mL cloroformo. La fase orgánica se concentró en un rotaevaporador. Por otra parte, se mezclaron 500 mL de agua acidulada con 500 mL látex. La solución fue filtrada y al producto de la filtración se añadieron 150 mL de éter dietílico, se mezcló y se dejó reposar por 10 min. A continuación, se filtró y el producto fue alcalinizado con hidróxido de sodio

hasta un pH de 9. Se extrajo con 250 mL cloroformo y se concentró en un rotaevaporador.¹⁴

Obtención del extracto acuoso de látex

Se mezcló 500 mL agua destilada con 500 mL látex, se filtró y el producto resultante se liofilizó.

El cálculo del rendimiento de extracción se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{Masa del extracto seco}}{\text{Masa seca de la muestra}} * 100$$

Ensayos antimicrobianos

Cepas bacterianas

Se evaluó la actividad antimicrobiana sobre cinco bacterias Gram negativas: *Shigella flexneri* ATCC 12022, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Shigella boydii* ATCC 9207, *Escherichia coli* ATCC 29213 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium o *Salmonella* Typhimurium y cuatro bacterias Gram positivas: *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* multirresistente (resiste a ceftazidima, cefoxitina, azitromicina y tigeciclina) y *Enterococcus faecalis*. Los microorganismos fueron donados por el laboratorio de microbiología de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito y el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímicas de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Las bacterias fueron confirmadas mediante identificación fenotípica (tinción Gram) y pruebas bioquímicas.

Suspensión estandarizada de colonias

Se sembraron las bacterias en Agar Mueller Hinton (MHA) y se colocaron en la incubadora a 37°C por 18 horas. Transcurrido el tiempo, se tomaron colonias aisladas de los cultivos y fueron suspendidas en caldo Mueller Hinton (MHB). Seguidamente, se usó un espectrofotómetro con una longitud de onda de 600 nm y se midió el valor de la absorbancia de la suspensión bacteriana previamente preparada que debió estar entre

un rango de 0,08 a 0,1 A; con la finalidad de llegar al 0,5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

Ensayo de difusión en agar

Se inoculó la suspensión bacteriana (1×10^8 UFC/mL) en césped con un hisopo estéril sobre MHA. Se realizaron tres perforaciones equidistantes de 4 mm de diámetro con una punta de micropipeta de 10-100 μ L en el agar. A cada perforación se colocaron 40 μ L de extracto (54,7 mg /mL disuelto en DMSO). Como control negativo se empleó DMSO. Una vez difundido el extracto en el agar, se incubó por 18 horas a 37 °C.²¹ Los halos de inhibición se midieron en mm.

Evaluación de sinergismo

Para evaluar si los extractos activos tenían una acción sinérgica con la amoxicilina se preparó una solución homogénea de los extractos (54,7 mg/mL) con la amoxicilina (1 mg/mL disuelto en agua destilada). Se repitió el procedimiento del ensayo de difusión en agar. Como control positivo se usó la amoxicilina. En el caso de *S. aureus* multirresistente se utilizó gentamicina (1 mg/mL disuelto en agua destilada) como antibiótico.

Concentración mínima inhibitoria y actividad bactericida

Los extractos que fueron activos en los ensayos de difusión en agar se procedieron a realizar los ensayos de concentración mínima inhibitoria y actividad bactericida. La suspensión bacteriana estandarizada (1×10^8 UFC/mL) se diluyó 1:100 en MHB (10^6 UFC/mL). En la placa de 96 pocillos, se realizaron diluciones seriadas de los extractos disueltos en DMSO desde 50 hasta 1,56 mg/mL. Seguidamente, se agregaron 30 μ L de MHB, 10 μ L de la suspensión bacteriana (1×10^6 UFC/mL) y 10 μ L de resazurina al 1% (m/v, disuelto en agua destilada estéril) en cada uno de los pocillos.²² Como control de inhibición se usó amoxicilina (1 mg/mL) para las bacterias en general y gentamicina (1 mg/mL) para *S. aureus* multirresistente y se realizaron seis diluciones seriadas más un control negativo con DMSO. Como controles de inocuidad y esterilidad se usaron los extractos y MHB sin microorganismos. Las placas se incubaron a 37 °C en la oscuridad durante 18 horas. Transcurrido el tiempo, se midió la fluorescencia a una $\lambda_{excitación}$ de 520 nm y $\lambda_{emisión}$ de 590 nm usando un lector de micro placas.²³

Para determinar la acción bacteriostática o bactericida, se inoculó 10 μ L de los pocillos que presentaron MIC (ensayo anterior) en MHA y a las 18 horas de incubación se observó el crecimiento (acción bacteriostática) o no crecimiento microbiano (bactericida).

Caracterización Fitoquímica

Tamizaje fitoquímico preliminar

Los extractos de las hojas y el látex fueron sometidos a ensayos fitoquímicos cualitativos para detectar la presencia de fenoles, flavonoides, terpenos, ácidos grasos, quinonas y alcaloides.

Prueba para fenoles: 100 mg de la muestra se hirvió con 4 mL de agua destilada y se filtró. Al filtrado se añadieron 5 gotas de tricloruro de hierro al 0,1 % (m/v). La coloración verde pardoso o negro azulado de la muestra mostró la presencia de compuestos fenólicos.

Prueba para flavonoides: Se añadieron 5 gotas de amoníaco al 1% (v/v) a la muestra diluida en metanol. La coloración amarillo intenso indicó la presencia de flavonoides.

Prueba para Terpenos: 100 mg de la muestra se mezclaron con 2 mL cloroformo en un tubo de ensayo. Posteriormente, se añadieron 3 mL de ácido sulfúrico. La formación de una interfase con tonalidad marrón rojiza mostró la presencia de terpenos.

Prueba para glucósidos cardíacos: Se agregó 1 mL de ácido sulfúrico en un tubo de ensayo. Después, se añadió la muestra diluida en metanol. Seguidamente, se agregaron 2 mL de ácido acético glacial con 1 gota de tricloruro de hierro al 0,1% (m/v). Finalmente, se añadió 1 mL de ácido sulfúrico. La formación de un anillo de color marrón indicó la presencia de glucósidos cardíacos.

Prueba para Ácido graso: En un tubo de ensayo, se mezclaron 100 mg de la muestra con 3 mL de la solución del reactivo de Sudán al 1% (m/v, disuelto en metanol). La aparición de una película de color rojo en las paredes del tubo mostró la presencia de ácidos grasos.

Ensayo para Quinonas: 100 mg del extracto se mezclaron con 1 mL de cloroformo. Después, se agregó 1 ml de hidróxido de potasio al 5% (m/v) y se dejó en reposo durante 5 minutos. La formación de una tonalidad rosada indico la presencia de quinonas.

Ensayo para Alcaloides: Se mezclaron 100 mg del extracto con 1 mL de metanol y se filtró. Al filtrado se le agregó 1 mL de HCl al 1% (v/v). Después, se añadieron 5 gotas del reactivo de Dragendorff. La aparición de un precipitado con tonalidad rojo- anaranjado indico la presencia de alcaloides.^{24,25}

Determinación del contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides totales mediante espectrofotometría UV-Vis

La cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides totales se realizó con aquellos extractos que fueron activos en los ensayos antimicrobianos.

Cuantificación de fenoles totales

Los extractos se diluyeron en 10 mL de agua desionizada y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos. Se tomó 1 mL de la muestra y se agregaron 40 µL del reactivo Folin Ciocalteu y 860 µL de agua desionizada, se homogenizó en el vórtex y se dejó reposar 5 minutos en la oscuridad. Pasado el tiempo, se agregaron 100 µL de carbonato de sodio al 7% (m/v) y 1 ml de agua desionizada. Se dejó bajo incubación durante 1 hora en oscuridad. La curva de calibración se preparó con ácido gálico disuelto en agua desionizada en concentraciones de 50 a 250 µg/ml. El blanco se preparó sin el ácido gálico. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de UV-Vis a 430 nm. El contenido de compuestos fenólicos totales se expresó en g de ácido gálico por mg de extracto seco.²⁶

Cuantificación de flavonoides totales

Se diluyeron los extractos en 10 mL de metanol y se colocaron en una centrifugadora a 4000 rpm durante 10 minutos. Después, se mezclaron 1 mL de la muestra con 1 mL de tricloruro de aluminio al 2% (m/v) y se incubaron en la oscuridad por 10 min. La curva de calibración se preparó con la quercetina disuelta en metanol en concentraciones de 3-12 µg/mL. Los blancos para las muestras y para cada punto de la curva de calibración se prepararon sin tricloruro de aluminio. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro a

438 nm. El contenido de flavonoides totales se expresó en g de quercetina por mg de extracto seco.²⁷

Cuantificación de alcaloides totales

Los extractos se diluyeron en 10 mL de agua desionizada y se centrifugaron a 4 000 rpm durante 10 minutos. En un tubo, se colocaron 1 mL de la muestra, 2,5 mL de tampón fosfato al 3,4% (m/v), 2,5 mL de verde de bromocresol al 0,07% (m/v) disuelto en agua desionizada y 5 mL de cloroformo. El tubo de ensayo se colocó en el vórtex por 1 min y se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos. Luego, se recolectó la fase orgánica. La curva de calibración se preparó con atropina disuelta en agua desionizada en concentraciones de 4-24 µg/mL. El blanco se preparó sin atropina con el mismo procedimiento. La absorbancia se midió en el espectrofotómetro a 415 nm. El contenido de alcaloides totales se expresó en g de atropina por mg de extracto seco.²⁶

Ensayo de captación de radicales libres

Se realizó el ensayo de captación de radicales libres para los extractos que fueron activos en los ensayos antimicrobianos. Se preparó la solución de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) al 0,13% (m/v) disuelto en etanol al 96% (v/v). Los extractos y el ácido ascórbico (estándar) fueron disueltos en etanol al 96% y se prepararon 5 diluciones seriadas en un rango de 100 hasta 6,25 µg/mL. En una micro placa de 96 pocillos, se mezclaron 195 µL de la muestra o ácido ascórbico con 5 µL de DPPH. Posteriormente, se mantuvieron en la oscuridad durante 30 minutos. Se usó el etanol al 96% como control. La absorbancia se registró con un lector de placas a 490 nm.^{28,29} La eliminación de radicales libres DPPH se determinó con la siguiente ecuación:

$$\%DPPH = \frac{Abs\ control - Abs\ muestra}{Abs\ control} * 100$$

Análisis estadístico

Los ensayos cuantitativos se realizaron por triplicado y se presentó como promedio ± desviación estándar. El análisis estadístico se hizo en el software R con el estadístico ANOVA bidireccional con 95% de límite de confianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de los extractos de las hojas

El rendimiento de la extracción depende de la interacción intermolecular entre el solvente y las moléculas a extraer, que a su vez está relacionada con la polaridad de ambas especies.³⁰ La Tabla 1 evidencia el rendimiento de los extractos de las hojas, demostrando que el metanol y el cloroformo presentaron mayor porcentaje de extracción, en comparación al hexano. Los extractos de la Tabla 1 fueron sometidos a temperaturas equivalentes al punto de ebullición del solvente durante varias horas debido al uso del método de extracción Soxhlet. Como resultado de este proceso, es posible que haya ocurrido una descomposición térmica de cualquier molécula termolábil, lo que posiblemente puede afectar la actividad biológica de los extractos.³¹

Tabla 1. Rendimiento de los extractos de las hojas de árbol de sande.

Extracto	Rendimiento (%)
Hexano	1,942 ± 0,134
Metanol	10,450± 0,282
Cloroformo	6,210 ± 0,464

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

Rendimiento de los extractos de látex

Los datos de la Tabla 2 muestran el rendimiento de la extracción del látex. El extracto de acetona evidencia una tonalidad ligeramente amarilla con una consistencia bastante pegajosa, a su vez, presentó un mayor rendimiento de extracción debido a que la acetona es un disolvente polar y extrae principalmente resinas que presenta compuestos como: triterpenos, alcaloides, ácidos grasos y compuestos solubles en acetona.³² En la extracción de alcaloides, los extractos de metanol y éter presentaron un rendimiento de 16,98 y 9,95 % respectivamente. Acosta y colaboradores (2017) reportaron rendimientos de extracción de 25 y 18 % para los extractos de alcaloides con metanol y éter respectivamente,¹⁴ posiblemente estas diferencias se deben a la naturaleza del látex, estado de maduración del espécimen vegetal, las condiciones de recolección y extracción.

Tabla 2. Rendimiento de los extractos de látex de árbol de sande.

Extractos	Rendimiento
Crudo	-
Acuoso	3,601 ± 0,058
Hexano	0,913 ± 0,008
Acetona	40,458 ± 0,234
Éter	3,780 ± 0,297
Metanol	3,534 ± 0,019
Metanol*	16,98 ± 0,507
Éter*	9,95 ± 0,041

Donde: *Extracto de alcaloides del látex.

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023

Ensayos biológicos

Para confirmar la identidad de las bacterias se realizaron pruebas bioquímicas y de tinción de Gram como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Identificación bioquímica y fenotípica de las bacterias gastrointestinales procedentes de aislados clínicos.

Bacteria	Tinción de Gram	Morfología	Agar kligler			Agar Sangre
			K/A	H ₂ S	Gas	
<i>E. faecalis</i>	Positivo	Coco	x	x	x	Gamma
<i>S. aureus</i> multirresistente	Positivo	Coco	x	x	x	Beta
<i>S. Typhimurium</i>	Negativo	Bacilo	K/A	+	-	x
<i>L. monocytogenes</i>	Positivo	Bacilo	x	x	x	Beta

Donde: + positivo, -negativo, k alcalino, A ácido, x no se realizó la prueba.

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

Actividad antibacteriana de los extractos del árbol de sande

Las plantas medicinales son una fuente de compuestos con actividad biológica que, a pesar de los avances de la medicina química, siguen siendo un recurso importante de medicina para muchos pueblos.³³ Los resultados demostraron que hubo diferencias significativas en los halos de inhibición entre las bacterias ($p < 0,005$), pero no entre los extractos ($p > 0,005$). *L. monocytogenes* resultó ser susceptible frente a los extractos de cloroformos y metanol de las hojas presentando halos de inhibición de $12,7 \pm 0,533$ mm y $11,4 \pm 0,533$ mm respectivamente, mientras que las demás bacterias estudiadas no presentaron halos de inhibición frente a los extractos de hojas. Hasta el momento, no hay reportes que demuestran que los extractos de las hojas de *B. utile* presenten actividad antimicrobiana, sin embargo; los extractos de las hojas de plantas procedentes de la familia Moraceae han demostrado que tiene actividad frente a diferentes microorganismos, estos incluyen a bacilos Gram positivos.^{34,35}

Los extractos metanólico y etéreo provenientes de la extracción de alcaloides de látex fueron potencialmente activos frente a todas las bacterias estudiadas, de las cuales la menos susceptible fue *E. faecalis* (Tabla 4). Según Ahumada (2017) menciona que *E. faecalis* es un microorganismo que ha generado resistencia intrínseca y adquirida a la mayoría de antimicrobianos disponibles en el mercado.³⁶ Por otro lado, *L. monocytogenes* resultó ser la más susceptible a los extractos activos del látex, presentando halos de inhibición superiores a 14 mm (Tabla 4).

Tabla 4. Diámetro de los halos de inhibición de los extractos de alcaloides de látex del árbol de sande frente a bacterias gastrointestinales.

Bacteria	Látex (54,7 mg/mL)	
	Metanol (mm)	Éter (mm)
<i>E. faecalis</i>	9±0,92	10±0,92
<i>S. aureus</i> multirresistente	11,3±0,92	11,5±0,92
<i>S. aureus</i>	11,2±0,92	11±0,92
<i>S. flexneri</i>	12± 0,92	13,5± 0,53

<i>S. sonnei</i>	11,1± 0,92	12,8± 0,92
<i>S. boydii</i>	11,1± 1,06	12± 0,92
<i>E. coli</i>	11,2±0,53	11,7±0,92
<i>S. Typhimurium</i>	11,6±0,53	12,7±0,92
<i>L. monocytogenes</i>	14,7±0,53	14,4±0,53

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

Evaluación de sinergismo

La sinergia implica la acción de una molécula en combinación con otras de causar un mayor efecto, que el producido por las moléculas de forma independiente.³⁷ Se evidenció que existe un sinergismo entre los extractos de alcaloides de látex (54,7 mg/mL) con la amoxicilina (1 mg/mL) frente a *E. faecalis*, presentando halos de inhibición de: 28 ± 0.923 mm para el extracto metanólico con la amoxicilina y 30 ± 0.923 mm para el extracto etéreo con la amoxicilina en comparación con los halos de: la amoxicilina (19 ± 0.876 mm), extracto etéreo (10 ± 0.786 mm) y extracto metanólico (9 ± 0.923 mm). En cambio, *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus multirresistente*, *L. monocytogenes* y *S. Typhimurium* no presentaron una acción sinérgica. Posiblemente, los extractos de alcaloides de látex potencializaron la actividad bactericida de la amoxicilina, logrando una mayor actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*, esto puede deberse a que hubo una inhibición de la transpeptidación (procesos de entrecruzamiento en la síntesis de la pared celular) al unirse a las proteínas de unión de la amoxicilina, lo que conlleva a la lisis de la pared celular y destrucción de la célula.^{37,38}

Concentración mínima inhibitoria y bactericida

Los extractos de hoja (cloroformo y metanol) presentaron valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 12.5 mg/mL y la concentración mínima bactericida (MBC) de 25 mg/mL frente a *L. monocytogenes*. En contraste, los extractos de alcaloides del látex demostraron una actividad antimicrobiana mayor, con valores de MIC en un rango de 3,125 a 6,25 mg/mL y MBC entre 6,25 a 12,5 mg/mL (Tabla 5). Según Acosta y colaboradores (2017), reportaron que los extractos de *B. utile* presentaron actividad en contra de *E. coli* y *S. aureus*,¹⁴ sin embargo; el valor de MIC fue de 1,6 mg/mL, está diferencia de MIC podría deberse al método utilizado (método de Mistcher), el cual se

basa en la determinación de la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento microbiano visible en un medio sólido. La interpretación de los resultados obtenidos mediante este método puede ser subjetivas y no siempre reproducible. Además, la siembra en agar puede no garantizar una distribución uniforme de la bacteria en el medio de cultivo, lo que lo convierte en un método semicuantitativo que no proporciona una medida exacta de MIC.³⁹

Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria y bactericida de los extractos de alcaloides del árbol de sande frente a bacterias gastrointestinales.

Microorganismos	Látex				Amoxicilina
	Metanol**		Éter**		**
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
<i>E. faecalis</i>	6,25	12,5	6,25	12,5	0,0312
<i>S. aureus</i> multirresistente	3,125	6,25	3,125	6,25	0,0312*
<i>S. aureus</i>	3,125	6,25	3,125	6,25	0,0312
<i>S. flexneri</i>	6,25	12,5	3,125	6,25	0,0625
<i>S. sonnei</i>	6,25	12,5	3,125	6,25	0,0156
<i>S. boydii</i>	3,125	6,25	3,125	6,25	0,0156
<i>E. coli</i>	6,25	12,5	3,125	6,25	0,0312
<i>S. Typhimurium</i>	6,25	12,5	3,125	6,25	0,0156
<i>L. monocytogenes</i>	3,25	6,25	3,25	6,25	0,0019

Donde: * Gentamicina, ** las unidades del MIC y MBC son mg/mL.

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

Los datos obtenidos revelan que las bacterias Gram negativas son más susceptibles a los extractos de alcaloides del látex en comparación con las Gram positivas, a excepción de *L. monocytogenes*, que es un bacilo Gram positivo. Esto está correlacionado con el estudio de Hernández y colaboradores (2017), quienes demostraron que los extractos

del látex de *Jatropha neopauciflora* Pax fueron más activos frente a bacterias Gram negativas⁴⁰. Las bacterias Gram negativas y positivas comparten organelas en común, como ribosomas, citoplasma y núcleo, por lo que la susceptibilidad de las Gram negativas frente a los extractos de alcaloides posiblemente no está relacionada con la inhibición de procesos en dichas organelas. En cambio, la membrana, la pared celular y las bombas de eflujos son estructuras que diferencian a estos dos tipos de bacterias. Las bacterias Gram negativas poseen una pared celular delgada menor a 10 nm, mientras que las Gram positivas tienen una pared más gruesa de 20 a 80 nm.⁴¹ Las bombas de eflujos son proteínas de transporte implicadas en la extracción de sustratos tóxicos, están presentes en algunas especies y reconocen un gran número de compuestos farmacológico.⁴² Es así que posiblemente la actividad de los extractos está relacionada con la afinidad que poseen para unirse a los peptidoglicanos y polisacáridos presentes en la pared y membrana externa celular, y también a la inhibición de las funciones de las bombas de eflujo de las Gram negativas. Otros autores, como Alvarado (2020), proponen que las bacterias Gram negativas son más susceptibles debido a que los extractos fenólicos pueden difundirse pasivamente por la membrana externa bacteriana, sin tener contacto con los mecanismos de defensa de los antibióticos convencionales y actuar al nivel del citoplasma.⁴³ Los mecanismos de inhibición de los compuestos activos presentes en los extractos no son claros, por lo que se necesitan más investigaciones para obtener una comprensión detallada.

Análisis de la caracterización fitoquímica

Tamizaje fitoquímico

En general, los componentes fitoquímicos son los responsables de la actividad biológica de los extractos, actúan en conjunto o por separado para generar inhibición o muerte microbiana. La Tabla 6 muestra los resultados de las pruebas fitoquímicas cualitativas realizadas. Donde, se puede observar que los fenoles, flavonoides, alcaloides, terpenoides, quinonas y ácidos grasos son los metabolitos presentes en los extractos del árbol de sande.

Tabla 6. Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos de hoja y látex del árbol sande.

Extractos	Fenoles	Flavonoides	Ácidos grasos	Alcaloides	Quinonas	Terpenos
Extractos de hojas						
Cloroformo	-	+	+	-	-	-
Hexano	-	+	+	-	-	-
Metanol	+	+	+	+	+	-
Extractos de látex						
Acuoso	-	-	+	-	+	+
Hexano	-	-	-	-	-	+
Metanol	-	-	-	-	+	+
Éter	-	-	-	-	-	+
Crudo	-	-	-	-	-	+
Acetona	-	-	-	-	-	+
Metanol*	-	-	-	+	-	+
Éter*	-	+	+	+	+	-

Donde: + presente, - ausente, *extractos de alcaloides de látex.

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

Determinación del contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides totales

Los resultados obtenidos demuestran que hubo diferencias significativas ($p < 0,005$) en la cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides totales (Tabla 7). El contenido de fenoles, flavonoides y alcaloides totales se determinó mediante la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración, se evidenció que el extracto metanólico de las hojas presentó mayor contenido de fenoles y alcaloides, y el extracto de éter de látex mostró mayor contenido de flavonoides.

La actividad antimicrobiana de los extractos de látex del árbol de sande puede estar asociado a ciertos metabolitos como los fenoles, flavonoides y alcaloides. Investigaciones

han demostrado que los flavonoides inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, las funciones de la membrana y metabolismos energéticos,⁴⁴ mientras los fenoles generan daños en la permeabilidad de la membrana plasmática.^{43,45,46} En cambio, los alcaloides inhiben la síntesis de proteínas, ácido nucleico, bombas de eflujo, metabolismo bacteriano, y generan daño a nivel en la membrana y pared celular.⁴⁷ Estos tres grupos fitoquímicos poseen actividad frente un amplio espectro de bacterias, estas incluyen a bacterias gastrointestinales como *Shigella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Enterococcus* spp, *Yersinia* spp, *Helicobacter pylori* y *Campylobacter* spp.^{44,48–50}

Tabla 7. Contenido total de flavonoides, fenoles y alcaloides de los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.

Contenido total de fitoquímicos	Hojas		Látex	
	Cloroformo	Metanol	Éter	Metanol
Fenoles*	37,98±0,07	100,73±0,28	-	11,73±0,20
Flavonoides**	48,12±0,01	28,01±0,24	66,87±0,37	-
Alcaloides***	-	14,98±0,04	1,10±0,12	1,23±0,07

Donde: *Contenido de fenoles totales expresado en g de ácido gálico por mg de extracto seco. ** Contenido de flavonoides totales expresado en g de quercetina por mg de extracto seco. *** Contenido de alcaloides totales expresado en g de atropina por mg de extracto seco. – no se realizó el ensayo.

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

Análisis de antioxidantes

Los antioxidantes tienen la capacidad de capturar y neutralizar algunas especies reactivas como hidroxilos, alcóxidos, aniones superóxidos, hidróxidos y nitrogenados a bajas concentraciones,^{44,51} es por ello que también tienen actividad gastroprotectora en modelos experimentales como ratones.⁵² Los extractos alcaloides de látex presentaron mayor capacidad de eliminación de radicales libres en comparación a los extractos de las hojas ($p < 0,005$), tal como se observa en la Tabla 8. Sin embargo, ningún extracto superó la actividad del ácido ascórbico (estándar) dado que exhibió mayor capacidad de eliminación debido a que es un antioxidante bien conocido. Así mismo, los flavonoides poseen una actividad citoprotectora sobre la mucosa gástrica que protegen a las células contra daños oxidativos producidos por los radicales libres.^{40,53} Estos resultados refuerzan los conocimientos tradicionales del uso de látex por sus propiedades gastroprotectoras, es así que, esta actividad puede estar atribuida a su capacidad de captar los radicales libres de algún agente antioxidante como son los flavonoides.

Tabla 8. Porcentaje de eliminación de radicales libres del ácido ascórbico (AC) y extractos activos del árbol de sande.

Concentración (µg/mL)	Extractos de las hojas		Extractos de látex		Ácido ascórbico*
	Cloroformo*	Metanol*	Éter*	Metanol*	
100	9,06±0,24	10,50±0,36	21,01±0,39	23,84±0,39	75,03±0,35
50	6,08±0,89	4,56±0,56	13,22±0,78	11,43±0,79	43,48±0,78
25	3,83±0,56	4,70±0,89	7,11±0,58	9,09±0,78	26,71±0,68
12.5	3,15±0,65	2,98±0,65	5,06±0,67	6,67±0,67	16,70±0,79
6.25	1,27±0,56	1,65±0,49	4,49±0,89	6,05±0,78	10,10±0,76

Donde: *porcentaje de eliminación de radicales libres.

Realizado: Sillagana-Verdezoto, 2023.

CONCLUSIÓN

La presente investigación demostró que los extractos etéreo y metanólico de la extracción de alcaloides de látex del árbol de sande poseen mayor actividad antimicrobiana en comparación a los extractos clorofórmico y metanólico de las hojas y a su vez los bacilos Gram negativos fueron más susceptibles. Se evidenció una acción sinérgica de los extractos de alcaloides de látex con la amoxicilina frente a *E. faecalis*, posiblemente los extractos potencializan la actividad antimicrobiana del antibiótico. De acuerdo a las pruebas fitoquímicas, los extractos de látex exhibieron mayores metabolitos secundarios en comparación a los extractos de las hojas, tal es el caso de los terpenos, que solo estaban en los extractos de látex. Los componentes presentes en los extractos metanólico de látex presentaron mayor capacidad de capturar radicales libres y en conjunto con el extracto etéreo podrían ser una fuente potencial de antioxidantes con efecto gastroprotector. Estos resultados refuerzan los conocimientos ancestrales de los pueblos amazónicos sobre el uso del látex de sande para tratar infecciones gástricas, sin embargo; es necesario realizar ensayos de fraccionamiento e identificación de las moléculas responsables de la actividad biológica y pruebas de citotoxicidad, eficiencia clínica *in vivo* con la finalidad de obtener resultados más concretos y fiables sobre el potencial farmacológico de los extractos activos del árbol de sande.

BIBLIOGRAFÍA

1. Balsalobre L, Alarcón T. Diagnóstico rápido de las infecciones del tracto gastrointestinal por parásitos, virus y bacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017 Jun 1;35(6):367–76.
2. Sattar SBA, Singh S. Gastroenteritis, Bacterial. *StatPearls*. 2018.
3. Alfaro R. Aspectos relevantes sobre *Salmonella* sp en humanos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 2018;34(3):110–22.
4. World Health Organization. Disease Outbreak News; Extensively drug-resistant *Shigella sonnei* infections - Europe. World Health Organization. 2022.
5. Angelo KM, Jackson KA, Wong KK, Hoekstra RM, Jackson BR. Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Linked to Fresh, Soft Hispanic-Style Cheese United States, 2021. *Clinical Infectious Diseases*. 2016 Dec 1;63(11):1487–9.
6. Lauwers G, Mino M, Kradin R. Infections of the Gastrointestinal Tract. In: Richard L, Kradin M, editors. *Diagnostic Pathology of Infectious Disease*. 2018. p. 215–54.
7. Carrero C, Cristina M, Gilbert G, Alexandra M, Lapiolo M, Serna F, et al. Low frequency of *Enterococcus faecalis* in the oral mucosa of subjects attending dental consultation. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2015;26(2):261–70.
8. Cruz Cruz M. Antibiotics vs. bacterial resistance. *Revista Electrónica Dr Zoilo E Marinello Vidaurreta*. 2015;40.
9. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antibióticos. 2020.
10. Gorlenko C, Kiselev H, Budanova V., Zamyatnin A, Ikryannikova N. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: New heroes or worse clones of antibiotics? *Antibiotics*. 2020;9(4).
11. Paiva P, Gomes F, Napoleão T. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;1(2):396–406.
12. Cowan M. Plant products as antimicrobial agents. Vol. 12, *Clinical Microbiology Reviews*. 1999.
13. Afolayan J, Meyer M. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J Ethnopharmacol*. 1997;57(3).
14. Acosta K, Jiménez A, Vinuesa D, Pilco G, Abdo S. Evaluación in vitro de las actividades antibacteriana y antidermatofica del extracto alcaloidal del látex de *Brosimum utile* (Kunth) Pittier. *Perfiles*. 2017;2(16):82–9.
15. Ramos MV, Demarco D, da Costa Souza IC, de Freitas CDT. Laticifers, Latex, and Their Role in Plant Defense. Vol. 24, *Trends in Plant Science*. 2019. p. 553–67.
16. Gracz J, Mazur O, Nawrot R. Functional studies of plant latex as a rich source of bioactive compounds: Focus on proteins and alkaloids. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. p. 12427.
17. Jadhav V, Kalase V, Patil P. GC-MS analysis of bioactive compounds in methanolic extract of *Holigarna grahamii* (wight) Kurz. *International Journal of Herbal Medicine IJHM*. 2014;35(24):35–9.
18. Suellen P, Silva P, Nunomura SM, Rita De Cássia, Nunomura S. Estudo fitoquímico e da atividade antioxidante do extrato metanólico do látex do leite de amapa. 2011.

19. Dursun H, Albayrak F, Bilici M, Koc F, Alp HH, Candar T, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of opipramol on indomethacin-induced ulcers in rats. *Yakugaku Zasshi*. 2009;129(7):861–9.
20. Miranda A, Vinuela D, Acosta K, Toaquiza F, Mendez E, Arias F. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad citotóxica del látex de *Euphorbia laurifolia* Juss. Ex. lam sobre *Artemia salina*. *Perfiles*. 2018;2(20):13–20.
21. Karthikeyan G, Vidya AK. Phytochemical Analysis Antioxidant and Antibacterial Activity of Pomegranate Peel. *Life Science Informatics Publication*. 2019;5(218):218–31.
22. Sarker D, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007;42(4):321–4.
23. Travnickova E, Mikula P, Oprsal J, Bohacova M, Kubac L, Kimmer D, et al. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. *AMB Express*. 2019;9(1).
24. Mikail HG. Phytochemical screening, elemental analysis and acute toxicity of aqueous extract of *Allium sativum* L. bulbs in experimental rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(4):322–6.
25. Krishnaiah D, Devi T, Bono A, Sarbatly R. Studies on phytochemical constituents of six Malaysian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2009;3(2):67–72.
26. Cevallos C, Cisneros P, Llive R, Ricaurte M, Reinoso C, Meneses MA, et al. *Croton lechleri* extracts as green corrosion inhibitors of admiralty brass in hydrochloric acid. *Molecules*. 2021;26(24).
27. Chandra S, Khan S, Avula B, Lata H, Yang MH, Elsohly MA, et al. Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2014; 2014:1–9.
28. Moein S, Moein MR. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010;4(7):517–21.
29. Pankaj P, Khamrui K, Devaraja HC, Singh RRB. Journal of Medicinal Plants Research The effects of alcoholic extract of Arjuna (*Terminalia arjuna* Wight & Arn.) bark on stability of clarified butterfat. *Journal of Medicinal Plants Research [Internet]*. 2013;7(35):2545–50.
30. Jacotet M, Laguerre M, Fabiano AS, Tenon M, Feuillère N, Bily A, et al. What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition, and activity of the extracts. *Electrophoresis*. 2018;39(15):1946–56.
31. López A, Luque de Castro MD. Chapter 11- Soxhlet extraction. In: *Liquid-Phase Extraction*. 2020. p. 327–54.
32. Nakayama FS. Guayule future development. *Ind Crops Prod*. 2005;22(1):3–13.
33. Ali P, Chen YF, Sargsyan E. Bioactive Molecules of Herbal Extracts with Anti-Infective and Wound Healing Properties. In: *Microbiology for Surgical Infections: Diagnosis, Prognosis and Treatment*. 2014. p. 205–20.
34. Afifi WM, Ragab EA, Mohammed AESI, El-Hela AA. Bioactivities and phytoconstituents of *Ficus trigonata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014;3(4):178–84.

35. Usman H, Iliya V, Emmanuel Suyi H, Abdulsalam H, Hamidu C. Comparative Phytochemistry and In Vitro Antimicrobial Effectiveness of the Leaf Extracts of *Clerodendrum capitatum* (Verbenaceae) and *Ficus glumosa* (Moraceae). ~ 945 ~ Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2017;6(6):945–8.
36. Ahumada S, Otero R, Noriega E. Resistencia de los enterococos a los antimicrobianos: Implicaciones clínicas. Vol. 19, Enfermedades Infecciosas y Microbiología. 1999. p. 227–35.
37. Kuok C, Hoi S, Hoi C, Chan CH, Fong I, Ngok C, et al. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. Exp Biol Med. 2017;242(7):731–43.
38. Akhavan B, Khanna N, Vijhani P. Amoxicillin. StatPearls. 2022.
39. Abarca K, Castillo K, Fuentes L. Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de Mitscher en 20 muestras vegetales procedentes de la zona norte de Nicaragua, octubre 2017- abril 2018. [León]: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2018.
40. Hernandez A, Alarcon F, Almanza J, Nieto O, Olivares J, Duran A, et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities, wound-healing effectiveness and chemical characterization of the latex of *Jatropha neopauciflora* Pax. J Ethnopharmacol. 2017; 204:1–7.
41. Mai A, Clauson M, Hong J, Murphy AB. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. Sci Rep. 2016;6(1):1–11.
42. Marchetti M, Errecalde J, Mestorino N. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo: Impacto en la multirresistencia. Analecta Vet. 2011;31(2):40–53.
43. Alvarado Z, Bravo P, Kennedy N, Krishna M, Hussain S, Young A, et al. Antimicrobial and antivirulence impacts of phenolics on *salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antibiotics. 2020;9(10):668.
44. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Vol. 26, International Journal of Antimicrobial Agents. 2005. p. 343–56.
45. Aldulaimi O. General overview of phenolics from plant to laboratory, good antibacterials or not. Vol. 11, Pharmacognosy Reviews. 2017. p. 123.
46. Lima M, Paiva de Sousa C, Fernandez C, Harel J, Dubreuil JD, de Souza EL. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. Vol. 130, Microbial Pathogenesis. 2019. p. 259–70.
47. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. Vol. 44, International Journal of Antimicrobial Agents. 2014.
48. Yan Y, Li X, Zhang C, Lv L, Gao B, Li M. Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review. Vol. 10, Antibiotics. 2021.
49. Mahizan N, Yang S, Moo C, Song A, Chong C, Chong C, et al. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens. Vol. 24, Molecules. 2019.
50. Takó M, Kerekes EB, Zambrano C, Kotogán A, Papp T, Krisch J, et al. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. Vol. 9, Antioxidants. 2020.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine, second edition. Free Radic Biol Med. 1991;10(6).

52. Koc M, Imik H, Odabasoglu F. Gastroprotective and anti-oxidative properties of ascorbic acid on indomethacin-induced gastric injuries in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2008;126(1–3):222–36.
53. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. Vol. 17, *Nutricion Hospitalaria*. 2002.

ANEXOS

Anexos 1. Morfología de las hojas del árbol de sande después de ser secadas durante 72 horas a 37°C.



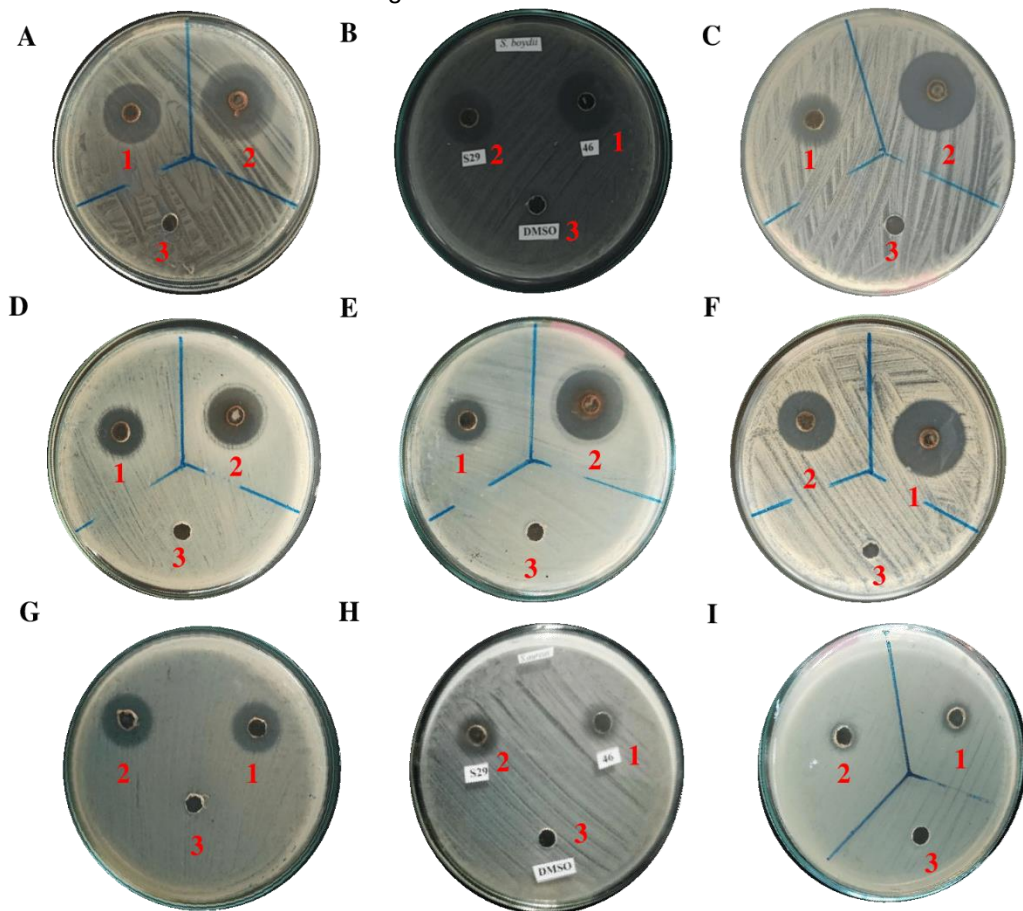
Donde: A= haz de la hoja y B= envés de la hoja
Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

Anexos 2. Obtención del látex del árbol de sande mediante una corte transversal en forma de V.



Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

Anexos 3. Halos de inhibición de los extractos de alcaloides de látex (54,7 mg/mL) frente a bacterias gastrointestinales.



Donde: A= *S. flexneri*, B= *S. boydii*, C= *S. sonnei*, D= *E. coli*, E= *S. Typhimurium*, F= *L. monocytogenes*, G= *S. aureus* multirresistente, H= *S. aureus*, I= *E. faecalis*,
1= extracto de éter, 2= extractos de metanol, 3= DMSO.

Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

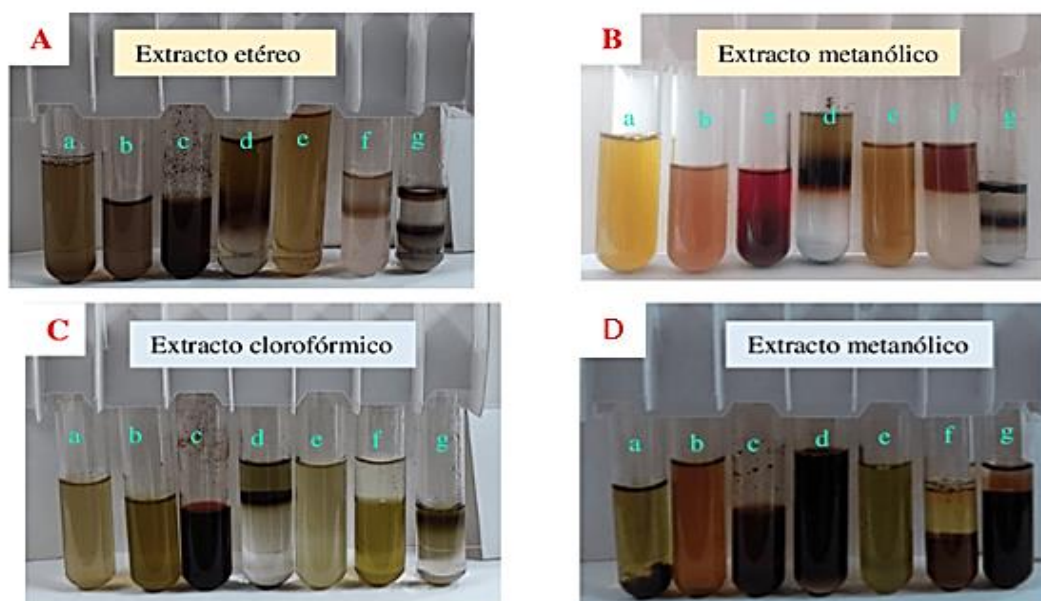
Anexos 4. Sinergismo entre los extractos de alcaloides de látex con la amoxicilina frente a *E. faecalis*.



Donde: 1= extracto de metanol con amoxicilina, 2= extracto de éter con amoxicilina y 3= amoxicilina.

Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

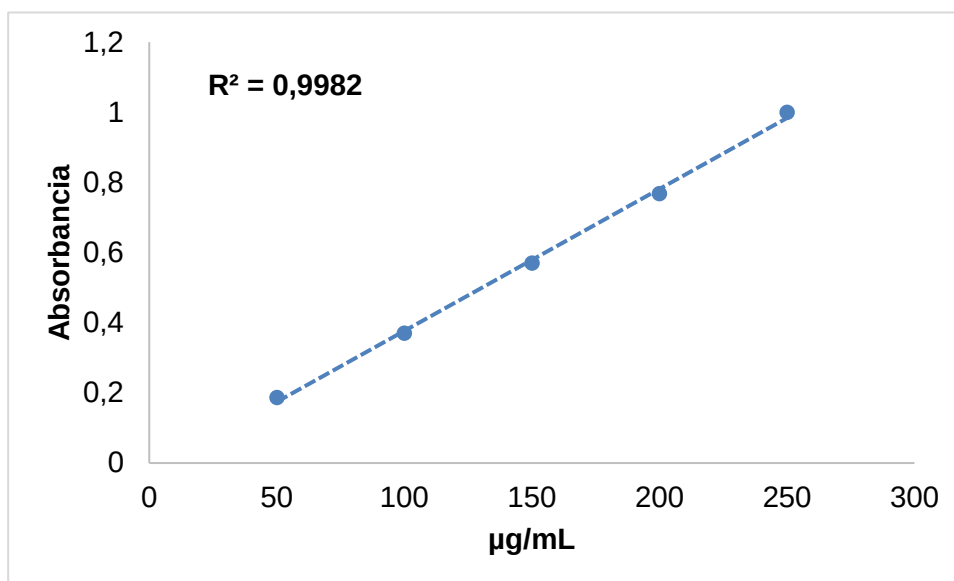
Anexos 5. Tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.



Donde: A extracto etéreo de alcaloides de látex, B extracto metanólico de alcaloides de látex, C extracto clorofórmico de hojas, D extracto metanólico de hojas, a fenoles, b flavonoides, c ácidos grasos, d glucósidos cardíacos, e alcaloides, f quinonas y g terpenos.

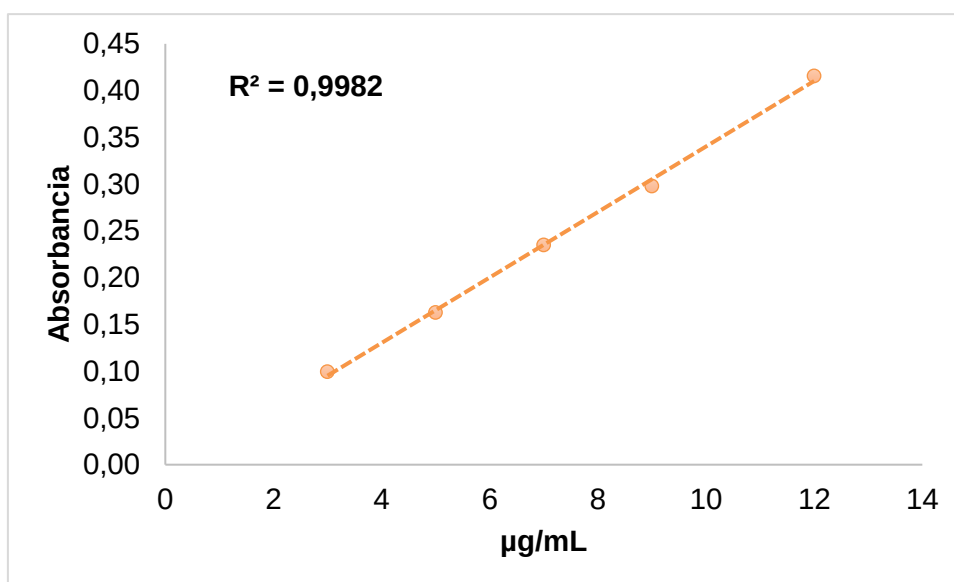
Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

Anexos 6. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales presentes en los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.



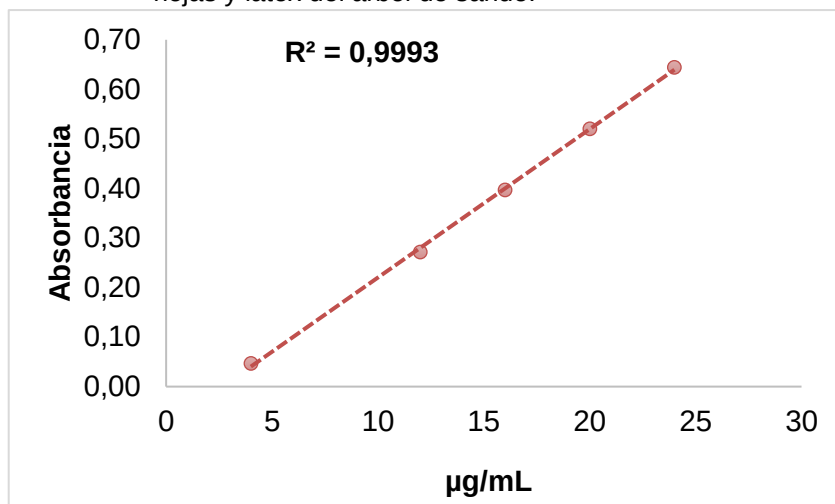
Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

Anexos 7. Curva de calibración de quercetina para la cuantificación de flavonoides totales presentes en los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.



Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023

Anexos 8. Curva de calibración de atropina para la cuantificación de alcaloides totales presentes en los extractos activos de las hojas y látex del árbol de sande.



Realizado por: Sillagana- Verdezoto, 2023