



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TOXICOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA AMBIENTAL

TESIS

**“PERFIL FITOQUÍMICO, PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIMICROBIANA Y
ANTIBIOPELÍCULA DEL EXTRACTO DE BRÁCTEAS DE BUGANVILIA (*Bougainvillea
glabra*)”**

PRESENTA

BIOL. INGRID GUADALUPE ORNELAS GARCÍA

para optar por el grado de DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COTUTORA

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

COTUTOR

DR. FRANCISCO JAVIER AVELAR GONZÁLEZ

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

DRA. NORMA ANGÉLICA CHÁVEZ VELA

AGUASCALIENTES, AGS., JUNIO 2025

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

NOMBRE DEL DECANO (A)
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

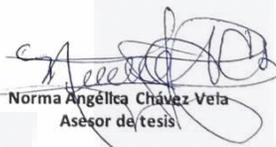
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **INGRID GUADALUPE ORNELAS GARCÍA** con ID **161874** quien realizó *la tesis* titulado: **PERFIL FITOQUÍMICO, PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTIMICROBIANA Y ANTIBIOPELÍCULA DEL EXTRACTO DE BRÁCTEAS DE BUGANVILIA (*Bougainvillea glabra*)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *ella* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 11 de Junio de 2025.


Alma Lilián Guerrero Barrera
Tutor de tesis


Francisco Javier Avelar González
Co-Tutor de tesis


Norma Angélica Chávez Veta
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 13 de junio de 2025

NOMBRE: Ingrid Guadalupe Ornelas García ID 161874

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Directa LGAC (del posgrado): Toxicología y Bioingeniería Ambiental

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Perfil fitoquímico, propiedades antioxidantes, antimicrobiana y antiopelícula del extracto de brácteas de buganvilia (*Bougainvillea glabra*)

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):
 El presente trabajo posiciona a las brácteas de *Bougainvillea glabra* como una nueva alternativa natural accesible, segura y sostenible para combatir la creciente resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, a que los resultados demostraron que las brácteas presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiopelícula, frente a diversas bacterias de importancia clínica.

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coincide con el título y objetivo registrado
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El estudiante es el primer autor
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí No

FIRMAS

Elaboró: Dr. Edgar Eduardo Hernández Cuéllar

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dr. Gilberto Alejandro Escamilla Acosta

Revisó: Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó: M. en C. Jorge Martín Alferez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado
 En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.
 Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
 Aprobado por: D. Control Escolar/D. Apoyo al Posg.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Yunyao Jiang,
Tsinghua University, China

REVIEWED BY
Smith B. Babiaka,
Humboldt University of Berlin, Germany
Latifa Bouissane,
Université Sultan Moulay Slimane,
Morocco
Tushar Dhanani,
Florida Agricultural and Mechanical
University, United States
Mohd Yusuf,
Glocal University, India
Armando Zarrelli,
University of Naples Federico II, Italy
Juan Monribot,
Instituto de Ecología (INECOL), Mexico

*CORRESPONDENCE
Alma L. Guerrero Barrera,
✉ alguerre@correo.uaa.mx

RECEIVED 12 August 2023
ACCEPTED 22 September 2023
PUBLISHED 19 October 2023

CITATION
Ornelas García IG, Guerrero Barrera AL,
Avelar González FJ, Chávez Vela NA and
Gutiérrez Montiel D (2023), *Bougainvillea
glabra* Choisy (Nyctinaginaceae): review of
phytochemistry and
antimicrobial potential.
Front. Chem. 11:1276514.
doi: 10.3389/fchem.2023.1276514

COPYRIGHT
© 2023 Ornelas García, Guerrero Barrera,
Avelar González, Chávez Vela and
Gutiérrez Montiel. This is an open-access
article distributed under the terms of the
[Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s)
and the copyright owner(s) are credited
and that the original publication in this
journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Bougainvillea glabra Choisy (Nyctinaginaceae): review of phytochemistry and antimicrobial potential

Ingrid G. Ornelas García¹, Alma L. Guerrero Barrera^{1*}, Francisco J. Avelar González², Norma A. Chávez Vela³ and Daniela Gutiérrez Montiel¹

¹Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Aguascalientes, Mexico, ²Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Estudios Ambientales, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Aguascalientes, Mexico, ³Laboratorio de Biotecnología, Centro de Ciencias Básicas, Departamento Ingeniería Bioquímica, Aguascalientes, Mexico

The *Bougainvillea glabra* or bougainvillea is a climbing plant native from South America belonging to the Nyctaginaceae family. The bougainvillea is recognized worldwide for its horticultural importance, due to the color of its bracts, commonly known as “flowers,” made up of bracts, which are the striking parts, and the true flowers, which are white and small. Bougainvillea is widely known in traditional medicine to treat respiratory diseases such as cough, asthma, and bronchitis, gastrointestinal diseases, also for its antibacterial and insecticidal capacity. The antimicrobial potential of the involucre of this plant has not been studied, despite research showing a high phytochemical presence of secondary metabolites such as alkanes, phenols, terpenes, and betalains. This review compiles information about the traditional uses of *B. glabra*, its botanical description, ecological relevance, phytochemistry, antimicrobial and antibiofilm activity, such as the toxicology of bracts and flowers.

KEYWORDS

Bougainvillea glabra, bracts, traditional medicine, betalains, betacyanins, antimicrobial, phytochemistry

Introduction

Plants are part of the history of man, since antiquity they have served as a natural medicinal remedy to cure different diseases, the knowledge of these plants has been maintained from generation to generation by sorcerers, healers, or shamans (Azmir et al., 2013; Tugume and Nyakoojo, 2019).

The World Health Organization (WHO) reports that there are about 20,000 medicinal plants, which provide primary healthcare to more than 80% of the world’s population (Sasidharan et al., 2011; Tugume and Nyakoojo, 2019). For this reason, phytochemistry and pharmacology have used medicinal plants to investigate new ecological and biodegradable chemical entities that function in the treatment of different pathologies due to their central structures (Yusuf and Khan, 2022). In addition, the WHO recommends and promotes the use of herbal remedies in national healthcare programs, due to their low cost, popular acceptance, and safety by causing fewer side effects (Pandey and Tripathi, 2013).

Agradecimientos

Quiero comenzar expresando mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por brindarme una nueva oportunidad para continuar con mi formación académica y profesional, así como por el apoyo institucional y los recursos proporcionados para la realización de este proyecto.

Agradezco la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por la beca otorgada, la cual representó un apoyo fundamental para la realización y el desarrollo de esta investigación.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la Dra. Alma por haberme brindado su confianza para llevar a cabo este proyecto. Su dedicación, paciencia y compromiso a lo largo de estos años han sido clave tanto en el desarrollo de la investigación como en mi crecimiento académico. Valoro profundamente su apoyo.

Al Dr. Avelar extiendo mi sincero agradecimiento por su invaluable orientación y apoyo constante a lo largo de este trabajo. Sus comentarios y observaciones enriquecieron significativamente el desarrollo de esta investigación.

Extiendo mi reconocimiento y gratitud a la Dra. Norma por su confianza y disposición para guiarme y alentarme durante el desarrollo de este trabajo. Su orientación, experiencia y compromiso, fueron de gran valor.

Agradezco sinceramente al Dr. Cristian y a su equipo de trabajo por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio, lo cual contribuyó de manera significativa al avance de esta investigación. Asimismo, a la Dra. Daniela por hacer posible esta colaboración.

Al Centro Ecológico “Los Cuartos” y a su equipo de trabajo, en especial a Fer, Yvón e Israel, por recibirme siempre con disposición y brindarme su valioso apoyo durante la recolección del material vegetal.

Expreso mi reconocimiento y profundo agradecimiento a Adriana Moreno y Fabiola Galindo por el trabajo constante que realizan en el laboratorio. Su apoyo, paciencia y disposición para enseñarme las técnicas fueron invaluable. Su dedicación y profesionalismo fueron fundamentales para el desarrollo y éxito de este proyecto.

Agradezco sinceramente la oportunidad de haber aprendido y crecido junto a mis compañeros Magda, Leslie, Claudia, Osvaldo, Daniela, Diana. Su apoyo, colaboración y consejos fueron invaluable. Además, agradezco a la Dra. Flor por compartir su experiencia, enseñanzas y por su constante disposición para guiarnos.

Quiero reconocer el trabajo de cada uno de los alumnos que colaboraron en el desarrollo de esta tesis: Fernanda, Alex y Carlos. Su participación fue fundamental no solo para el avance del proyecto, sino también para recordarme que “Aprende a enseñar, Enseñando aprenderás”.

A mis amigos, les expreso un profundo agradecimiento por su apoyo incondicional, por su paciencia, palabras de aliento y por estar presentes en cada etapa. En especial a Fer, Mariana y Raúl, cuya compañía y consejos fueron clave para ayudarme a superar los desafíos y mantener la motivación en los momentos más difíciles.

Agradezco profundamente a mis padres, Nicolás y Gris, y a mi hermano Nico, por su amor incondicional y por estar siempre a mi lado. Su apoyo constante, sus palabras de aliento y su confianza en mí han sido fundamentales para alcanzar mis metas personales y académicas. Gracias por escucharme, sostenerme en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada logro. Sin ustedes, este camino no habría sido posible.

A Polly y Pelu por su compañía y amor en cada nueva etapa.

En este momento de culminación, agradezco a Dios por ser mi guía y fortaleza a lo largo de todo el proceso de esta tesis. Su amor y presencia me han sostenido en cada etapa y han sido esenciales para alcanzar otro logro académico.

Índice

Resumen	10
Abstract.....	11
1. Introducción.....	12
2. Marco Teórico.....	14
2.1. Fitoquímica	14
2.2. Principios activos de las plantas medicinales.....	14
2.2.1. Terpenos	15
2.2.2. Fenoles	16
2.2.3. Alcaloides	18
2.3. Extracción de compuestos.....	18
2.4. Métodos de extracción	21
2.4.1. Extracción por Soxhlet	22
2.4.2. Extracción por maceración	23
2.4.3. Sonicación.....	23
2.5. Métodos de separación e identificación.....	24
2.5.1. Espectroscopía infrarroja (IR).....	24
2.6. Purificación de polifenoles por adsorción.....	26
2.7. Actividad antioxidante.....	28
2.8. Resistencia bacteriana	31
2.9. Biopelículas	32
2.9.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	33
2.9.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.9.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.9.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	35
2.9.5. <i>Escherichia coli</i>	36
3. Antecedentes	37
3.1. Generalidades de <i>Bougainvillea</i> spp.....	37
3.1.1. Origen y distribución.....	37

3.1.2.	Descripción morfológica de <i>Bougainvillea</i> spp.....	37
3.1.3.	Hábitat.....	38
3.2.	<i>Bougainvillea glabra</i>	38
3.2.1.	Clasificación taxonómica de <i>B. glabra</i>	38
3.2.2.	Usos tradicionales.....	39
3.3.	Fitoquímica del género <i>Bougainvillea</i>	39
3.4.	Estudios antimicrobianos con extractos de <i>B. glabra</i>	42
4.	Hipótesis	44
5.	Justificación.....	44
6.	Objetivo.....	45
6.1.	Objetivo general.....	45
6.2.	Objetivos específicos.....	45
7.	Metodología	46
7.1.	Diagrama experimental	46
7.2.	Recolección de <i>B. glabra</i>	46
7.3.	Extracción con Soxhlet.....	47
7.4.	Extracción por maceración	47
7.5.	Extracción por sonicación	47
7.6.	Pulverizado de los extractos.....	47
7.7.	Prueba de solubilidad	47
7.8.	Purificación de compuestos polifenólicos.....	48
7.9.	Evaluación de la actividad antioxidante.....	48
7.9.1.	Inhibición del radical ABTS ^{•+}	48
7.9.2.	Poder antioxidante reductor férrico (FRAP).....	49
7.9.3.	Compuestos Fenólicos Totales (CFT).....	49
7.10.	Rendimiento.....	49
7.11.	Espectrofotómetros de transformada de Fourier (FTIR)	49
7.12.	Sólidos Totales.....	50
7.13.	Cuantificación de betalaínas.....	50
7.14.	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC)	51
7.15.	Actividad antimicrobiana.....	51
7.15.1.	Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	51

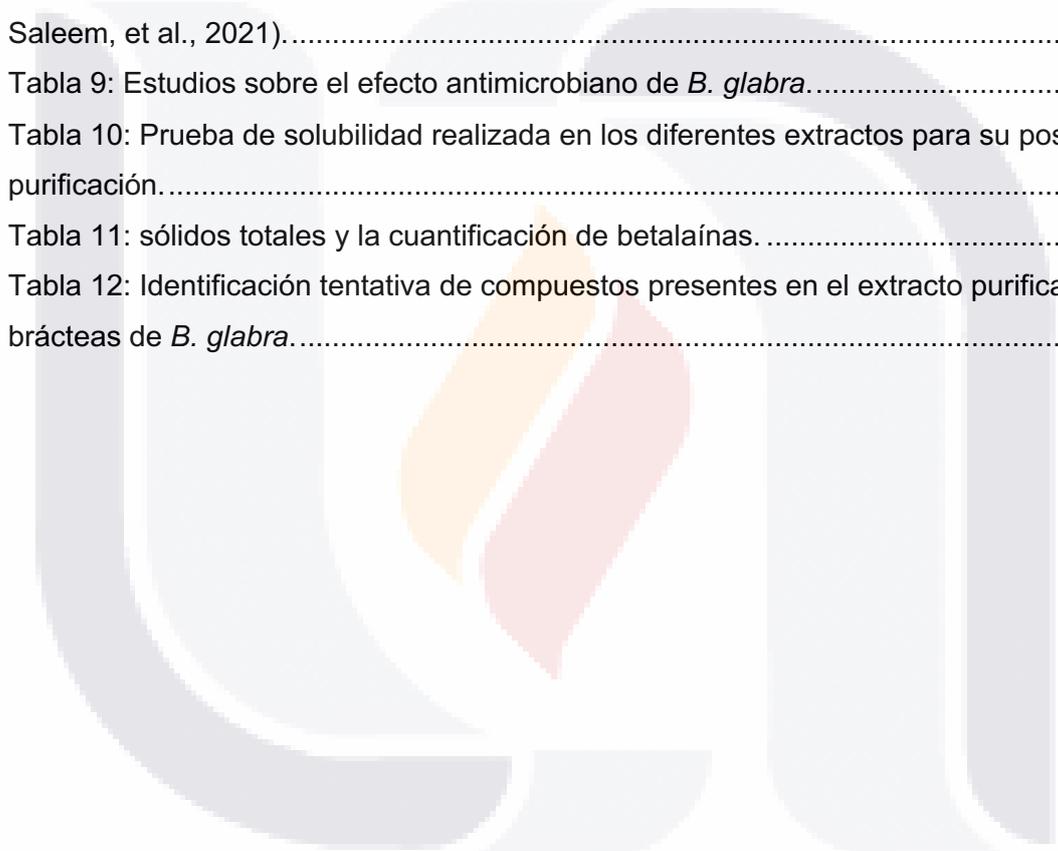
7.15.2.	Difusión en pozo.....	52
7.15.3.	Concentración Mínima Inhibidora (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)	52
7.16.	Actividad anti-adherencia de biopelículas	53
7.16.1.	Porcentaje de inhibición de biopelículas	53
7.16.2.	Evaluación anti-adherencia de biopelículas mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM).....	54
7.17.	Ensayo de citotoxicidad por tinción de fluorescencia de las células NPTr 54	
7.18.	Análisis estadístico.....	55
8.	Resultados	55
8.1.	Prueba de solubilidad	55
8.2.	Evaluación de actividad antioxidante	56
8.2.1.	Inhibición del radical ABTS ^{•+}	56
8.2.1.1.	Soxhlet crudo vs purificado.....	56
8.2.1.2.	Sonicación crudo vs purificado	56
8.2.1.3.	Maceración crudo vs purificado	57
8.2.2.	Poder antioxidante reductor férrico (FRAP).....	58
8.2.2.1.	Soxhlet crudo vs purificado.....	58
8.2.2.2.	Sonicación de extracto crudo vs purificado.....	58
8.2.2.3.	Maceración del extracto crudo vs purificado.....	59
8.2.3.	Compuestos Fenólicos Totales (CFT).....	59
8.2.3.1.	Soxhlet crudo vs purificado.....	59
8.2.3.2.	Sonicación de extracto crudo vs purificado.....	60
8.2.3.3.	Maceración de extracto crudo vs purificado	61
8.3.	Rendimiento de extracto crudo vs purificado.....	61
8.4.	Espectrofotómetro de transformada de Fourier (FTIR).....	62
8.4.1.	FTIR extractos purificados	62
8.4.2.	FTIR extractos crudos.....	63
8.5.	Sólidos Totales y Cuantificación de betalaínas.....	64
8.6.	Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC).....	64
8.7.	Actividad antimicrobiana por difusión en pozo	67
8.7.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	67

8.7.2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	68
8.7.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	68
8.7.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
8.7.5.	<i>Escherichia coli</i>	70
8.8.	Concentración Mínima Inhibidora (MIC) y Concentración Mínima Bactericida 70	
8.8.1.	MIC y MBC de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
8.8.2.	MIC y MBC de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	71
8.8.3.	MIC y MBC de <i>Acinetobacter baumannii</i>	72
8.8.4.	MIC y MBC <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
8.8.5.	MIC y MBC de <i>Escherichia coli</i>	73
8.9.	Actividad anti-adherencia de biopelículas.....	73
8.9.1.	Porcentaje de inhibición de biopelículas.....	73
8.9.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	73
8.9.1.2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	74
8.9.1.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	75
8.9.1.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
8.9.1.5.	<i>Escherichia coli</i>	76
8.9.2.	Evaluación anti-adherencia de biopelículas mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM).....	76
8.9.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	76
8.9.2.2.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	77
8.9.2.3.	<i>Acinetobacter baumannii</i>	78
8.9.2.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
8.9.2.5.	<i>Escherichia coli</i>	79
8.10.	Ensayo de citotoxicidad por tinción de fluorescencia de las células NPTr 80	
9.	Discusión	80
10.	Conclusión.....	92
11.	Bibliografía	94

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Índice de tablas

Tabla 1: Polaridad de los disolventes empleados en extractos.....	20
Tabla 2: Propiedades y compuestos activos de los disolventes.....	21
Tabla 3: Resumen de las condiciones de experimentación.....	24
Tabla 4: Métodos de separación e identificación.....	24
Tabla 5: características de la Amberlite XAD-16 (Dupont, 2022).	28
Tabla 6: Características morfológicas de <i>B. glabra</i>	38
Tabla 7: Clasificación taxonómica.	39
Tabla 8: Fitoquímica aislada de las brácteas de buganvilia (Abarca y Petricevich, 2018; Saleem, et al., 2021).....	42
Tabla 9: Estudios sobre el efecto antimicrobiano de <i>B. glabra</i>	44
Tabla 10: Prueba de solubilidad realizada en los diferentes extractos para su posterior purificación.....	56
Tabla 11: sólidos totales y la cuantificación de betalaínas.	64
Tabla 12: Identificación tentativa de compuestos presentes en el extracto purificado de brácteas de <i>B. glabra</i>	67



Índice de figuras

Figura 1: Estructura química del fenol (Azcón y Talón, 2008).....	16
Figura 2: Estructura general de los flavonoides (Ringuelet, 2013).....	17
Figura 3: Equipo Soxhlet (Núñez, 2008).	22
Figura 4: Tipos de vibraciones en las moléculas (Sierra, et al., 2009).....	25
Figura 5: Metabolismo del oxígeno molecular (Sánchez y Méndez, 2013).	28
Figura 6: ABTS (Londoño, 2012).....	30
Figura 7: Fundamento de la técnica FRAP (Londoño, 2012).	30
Figura 8: Reacción oxido reducción (redox) donde los elementos tungsteno (W) y molibdeno (Mo) (color amarillo) se reducen a una forma iónica de 5+ y el anillo fenólico se oxida (color azul) (Carmona, et al., 2021).....	31
Figura 9: Diagrama experimental.	46
Figura 10: Flor y bráctea de buganvilia.	46
Figura 11: Columna cromatográfica.	48
Figura 12: A-B biopelícula <i>S. aureus</i> . C-D tratamiento con 11.4 mg/ml de extracto de bráctea de <i>B. glabra</i>	77
Figura 13: A-B formación biopelícula <i>S. epidermidis</i> . C-D inhibición de biopelícula con 11.4 mg/ml de extracto de bráctea de <i>B. glabra</i>	77
Figura 14: Formación biopelícula de <i>A. baumannii</i> (A, B). Efecto del extracto de <i>B. glabra</i> (C, D) en la generación de biopelícula.	78
Figura 15: Biopelícula <i>P. auroginosa</i> (A, B). Acción del extracto de bráctea <i>B. glabra</i> sobre la formación de <i>P. auroginosa</i> (C, D).	79
Figura 16: Actividad del extracto metanólico de bugambilia contra la biopelícula de <i>E. coli</i>	79
Figura 17: Citoesqueleto de actina de células NPTr teñidas de verde con faloidina Alexa Fluor 488. Los núcleos se marcaron con Hoetch (azul). (A) Células control. (B) Células tratadas con 5.7 mg/ml de extracto de buganvilia.	80

Índice de gráficas

Gráfica 1. Comparación de la capacidad ABTS entre extracto crudo y purificado extraído mediante Soxhlet con solventes de diferentes polaridades. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-h) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías, seguido del Prueba de comparación múltiple Tukey's.	56
Gráfica 2: Actividad de ABTS entre extracto crudo y purificado extraído mediante sonicación con metanol y etanol. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías y Prueba de comparación múltiple Tukey's.	57
Gráfica 3: Comparación de la actividad antioxidante por ABTS entre el extracto por maceración a 23°C crudo y purificado. Al evaluar la misma variable en diferente tipo de extracto, diferente literal (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba T de Student).	57
Gráfica 4: Analogía de la actividad de FRAP entre los extractos de Soxhlet crudos y purificados. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías y Prueba de comparación múltiple Tukey's.	58
Gráfica 5: Efecto de FRAP entre el extracto de sonicación a 40°C crudo y purificado. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías y Prueba de comparación múltiple Tukey's.	58
Gráfica 6: Evaluación de FRAP entre el extracto de maceración (23°C) crudo y purificado. Al evaluar la misma variable en diferente tipo de extracto, (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba T de Student).	59
Gráfica 7: Comparación de la cantidad de fenoles totales entre extractos crudo y purificado extraído mediante Soxhlet con solventes de diferentes polaridades. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-d) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías, seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's.	60
Gráfica 8: Cantidad de fenoles totales comparado entre extracto crudo y purificado extraído mediante sonicación a 40°C. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), "ns" indica que no hay diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías para promedio \pm DS ($n=3$), seguido de un Prueba de comparación múltiple Tukey's.	60
Gráfica 9: Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales entre el extracto por maceración a 23°C crudo y purificado. Al evaluar la misma variable en diferente tipo de extracto, (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba T de Student).	61
Gráfica 10: Comparación del rendimiento de extractos crudos y purificados. Al evaluar la misma variable con dos factores (crudo y purificado), "ns" indica que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$), mediante ANOVA de dos vías seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's.	62
Gráfica 11: Espectros FTIR de los extractos purificados de brácteas de buganvilia por medio de diferentes técnicas de extracción y solventes: Soxhlet (metanol y agua), sonicación 40°C (metanol y agua) y maceración 23°C y 37° (metanol).	63
Gráfica 12: Espectros FTIR de los extractos crudos de brácteas de buganvilia por medio de diferentes técnicas de extracción Soxhlet de metanol y agua, sonicación 40°C de metanol y agua; así como maceración metanol 23°C y 37°C.	64
Gráfica 13: Compuestos presentes en el extracto purificado de brácteas de Bougainvillea glabra identificados mediante UPLC.	65
Gráfica 14: Evaluación de la actividad antimicrobiana con diferentes concentraciones (57, 28.5, 5.7 mg/ml) de extracto de bráctea contra <i>Staphylococcus aureus</i> . Calculado	

mediante ANOVA de dos vías, al evaluar la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), (Prueba de comparación múltiple Tukey's)..... 67

Gráfica 15: Evaluación de la actividad antimicrobiana con las concentraciones a 57, 28.5, 5.7 mg/ml de extracto de brácteas contra *Staphylococcus epidermidis*. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio \pm DS ($n=3$) la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-d) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), y Prueba de comparación múltiple Tukey's..... 68

Gráfica 16: Evaluación de la actividad antimicrobiana con diferentes concentraciones (57, 28.5, 5.7 mg/ml) de extracto de bráctea contra *Acinetobacter baumannii*. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio \pm DS ($n=3$), seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's, la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$). 69

Gráfica 17: Evaluación de la actividad antimicrobiana con diferentes concentraciones de extracto de brácteas contra *Pseudomonas aeruginosa*. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio \pm DS ($n=3$) la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) y Prueba de comparación múltiple Tukey's..... 70

Gráfica 18: Gráfica 18. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* con diferentes concentraciones de extracto de bráctea. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio \pm DS ($n=3$), seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's, la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$). 70

Gráfica 19: Evaluación de MIC y MBC a diferentes concentraciones del extracto contra *Staphylococcus aureus*. Observamos la media de tres repeticiones de la absorbancia a 595 nm. Al evaluar mediante ANOVA de una vía ($n=3$) la absorbancia de crecimiento a diferente concentración del extracto, “*” indica que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$), y Prueba de comparación múltiple Tukey's..... 71

Gráfica 20: MIC y MBC de *Staphylococcus epidermidis*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía ($n=3$) la absorbancia de crecimiento a diferente concentración del extracto, “*” indica que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba de comparación múltiple Tukey's)..... 71

Gráfica 21: MIC y MBC de *Acinetobacter baumannii*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, * significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de comparación múltiple Tukey's)..... 72

Gráfica 22: MIC y MBC *Pseudomonas aeruginosa*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia del crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, * revelan que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de comparación múltiple Tukey's)..... 73

Gráfica 23: Gráfica 23. MIC y MBC de *Escherichia coli*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, * significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de comparación múltiple Tukey's)..... 73

Gráfica 24: Gráfica 24. Inhibición de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* empleando extracto de bráctea de *B. glabra*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's). 74

Gráfica 25: Gráfica 25. Inhibición de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* con extracto de *B. glabra*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's)..... 74

Gráfica 26: Acción inhibitoria del extracto metanólico de brácteas de *Bougainvillea glabra* contra *Acinetobacter baumannii* (n=3). ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's). 75

Gráfica 27: . Efecto del extracto de bráctea de *Bougainvillea glabra* sobre la inhibición de la biopelícula de *P. aureginosa*. ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's). 75

Gráfica 28: Efecto inhibitor de *Bougainvillea glabra* contra biopelícula de *Escherichia coli*. ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's). 76



Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el potencial biológico y fitoquímico del extracto de brácteas de *Bougainvillea glabra*, un órgano vegetal poco conocido, destacando sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antibiopelícula y citotóxicas. Primeramente, se evaluaron tres técnicas de extracción: Soxhlet, maceración y sonicación, utilizando diferentes solventes (agua, metanol, etanol, acetona). La eficiencia de cada método fue evaluada en función del contenido de fenoles totales, la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP) y de rendimiento. El extracto metanólico obtenido por Soxhlet presentó el mayor contenido fenólico (168.98 EAG $\mu\text{g/ml}$), así como la mejor capacidad antioxidante (ABTS de 84.64 ET $\mu\text{g/ml}$ y 165.57 EAG $\mu\text{g/ml}$ en FRAP), por lo que fue seleccionado para pruebas posteriores. La caracterización espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), reveló la presencia de grupos funcionales típicos de compuestos fenólicos y flavonoides. Posteriormente, se identificaron metabolitos específicos mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC), entre ellos quercetina y kaempferol. La actividad antimicrobiana del extracto se evaluó contra bacterias patógenas mediante el método de difusión en pozo, observándose mejores zonas de inhibición contra *P. aeruginosa* (15.6 mm). Las pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) mostraron valores entre 15.7 y 17.8 mg/ml. Asimismo, se determinó su capacidad para inhibir la formación de biopelículas mediante el ensayo de cristal violeta y análisis con microscopía confocal láser (CLSM). El extracto inhibió hasta el 100 % de la formación de biopelículas y redujo significativamente su biomasa.

La cuantificación de betacianinas mostró un mayor contenido de betaxantinas (15.3 mg/ml) respecto a betacianinas (13.1 mg/ml), lo que puede explicar en parte la potente actividad antioxidante y antibacteriana. Finalmente, la evaluación de citotoxicidad se realizó utilizando células epiteliales de tráquea de cerdo recién nacido (NPTr). El análisis morfológico con tinción Hoechst y faloidina-Alexa Fluor 488 demostró que el extracto no produce daño estructural en el núcleo ni en el citoesqueleto.

Estos resultados posicionan a *B. glabra* como una nueva fuente potencial, segura y eficaz de compuestos bioactivos con aplicaciones en el desarrollo de agentes antioxidantes, antimicrobianos y antibiopelícula de origen natural.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the biological and phytochemical potential of the bract extract of *Bougainvillea glabra*, a little-studied plant organ, with emphasis on its antioxidant, antimicrobial, antibiofilm, and cytoprotective properties. Three extraction techniques: Soxhlet, maceration, and sonication, were assessed using different solvents (water, methanol, ethanol, and acetone). Extraction efficiency was evaluated based on total phenolic content, antioxidant capacity (ABTS and FRAP assays), and yield.

The methanolic extract obtained via Soxhlet showed the highest phenolic content (168.98 μg GAE/mL) and the strongest antioxidant activity (84.64 μg TE/mL for ABTS and 165.57 μg GAE/mL for FRAP), and was therefore selected for further analyses. Characterization by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) confirmed the presence of functional groups characteristic of phenolic compounds and flavonoids. Specific metabolites, including quercetin and kaempferol derivatives, were identified using ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC).

Antimicrobial activity was evaluated against pathogenic bacteria using the well diffusion method, with the largest inhibition zone observed for *Pseudomonas aeruginosa* (15.6 mm). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assays revealed values ranging from 15.7 to 17.8 mg/mL. The extract's antibiofilm activity was assessed using crystal violet staining and confocal laser scanning microscopy (CLSM), showing up to 100% inhibition of biofilm formation and a significant reduction in biomass.

Betalain analysis revealed a higher concentration of betaxanthins (15.3 mg/mL) compared to betacyanins (13.1 mg/mL), which may contribute to the extract's strong antioxidant and antimicrobial properties. Lastly, cytotoxicity was evaluated using newborn pig tracheal epithelial (NPT_r) cells. Morphological analysis using Hoechst and phalloidin-Alexa Fluor 488 staining confirmed that the extract did not cause structural damage to the nucleus or cytoskeleton.

These findings suggest that *B. glabra* bracts represent a promising, safe, and effective natural source of bioactive compounds, with potential applications in the development of antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm agents.

1. Introducción

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias representan uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, pues provocan aumento en la morbilidad y mortalidad (Silva et al., 2023). Lo anterior se agrava por la creciente resistencia de los patógenos a los antibióticos existentes, un fenómeno atribuido al uso indiscriminado de fármacos. Como consecuencia, se ha intensificado la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas (Dhankhar, 2013; Song et al., 2021). La formación de biopelículas juega un papel crucial en esta resistencia antimicrobiana (Asma et al., 2022). Las biopelículas son comunidades bacterianas adheridas a superficies biológicas o inertes, envueltas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que les confiere la capacidad de resistir concentraciones de antimicrobianos hasta 1000 veces superiores a las necesarias para eliminar bacterias en su forma planctónica (Hathroubi et al., 2016; Silva et al., 2023).

Desde la antigüedad, las plantas han sido utilizadas por sus propiedades medicinales en el tratamiento de diversas enfermedades (Azmir et al., 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen alrededor de 20,000 especies de plantas medicinales, las cuales proporcionan atención primaria de salud a más del 80 % de la población mundial (Sasidharan et al., 2011). Por ello, la investigación científica ha puesto especial énfasis en el estudio de los compuestos presentes en estas plantas, basándose en su uso tradicional. Además, la OMS promueve la inclusión de remedios herbales en los programas nacionales de salud, por su bajo costo, la no producción de efecto secundario y la aceptación popular (Pandey y Tripathi, 2013).

Las plantas producen gran diversidad de metabolitos secundarios que son la base de numerosos medicamentos farmacéuticos, gracias a su actividad biológica, que incluye propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes. Estos principios activos se obtienen a partir de extractos de diferentes partes de la planta, como hojas, tallos, flores y frutos (Azmir et al., 2013; Abubakar y Haque, 2020; Flores et al., 2020).

La familia Nyctaginaceae alberga a 30 géneros y alrededor de 290 especies tropicales y subtropicales (Ali et al., 2003), el género *Bougainvillea* se encuentra en esta familia, integrado por tres especies de relevancia hortícola: *Bougainvillea glabra*, *B. spectabilis* y *B. peruviana* (Gupta et al., 2009). *B. glabra*, conocida en México como “bugambilia”, “flor de papel” o “Santa Rita”, es un arbusto trepador que alcanza entre 1 y 7 metros de altura, con tallos gruesos, ramas colgantes provistas de espinas curvas, hojas simples y vistosas brácteas que acompañan a sus inflorescencias (Saleem et al., 2021).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

B. glabra destaca en la medicina tradicional por su uso en el tratamiento del asma, bronquitis, diarreas, úlceras y diabetes, así como por sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, insecticidas y su aplicación en el tratamiento del acné (Abarca y Petricevich, 2018; Saleem et al., 2021). Diversos estudios han identificado en esta planta la presencia de compuestos bioactivos como flavonoides, taninos, alcaloides, pinitol, betacianinas y saponinas, los cuales exhiben actividad antimicrobiana (Edwin et al., 2007; Saleem et al., 2021).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial bioactivo de las brácteas de *B. glabra*, una estructura vegetal poco explorada, mediante la aplicación de distintas técnicas y condiciones de extracción, con el fin de identificar el método más eficiente en la obtención de compuestos con alta actividad biológica. Los extractos obtenidos fueron caracterizados cualitativamente por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), y se identificaron metabolitos específicos mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC).

Con base en los resultados preliminares, el extracto obtenido por Soxhlet con metanol demostró la mayor actividad antioxidante, por lo que fue seleccionado para estudios posteriores. A este extracto se le cuantificaron las betalaínas presentes y se evaluaron sus propiedades antimicrobianas y anti biopelícula frente a bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

Finalmente, se realizó un análisis de citotoxicidad utilizando células epiteliales de tráquea de cerdo recién nacido (NPT_r), mediante la observación de posibles alteraciones morfológicas en el núcleo y el citoesqueleto, con el propósito de determinar la seguridad del extracto a nivel celular.

2. Marco Teórico

2.1. Fitoquímica

La fitoquímica es la disciplina científica dedicada al estudio de los compuestos de origen vegetal, conocidos como fitoquímicos (Montesano & Gallo, 2023). La fitoquímica abarca el estudio de los compuestos químicos desde sus estructuras químicas, metabolismos (biosíntesis y degradación), distribución natural, función biológica, extracción y evaluación cualitativa y cuantitativa. La importancia del estudio de esta disciplina de las plantas radica en su actual aplicación en áreas como la farmacéutica, alimentaria, industrial, y química (Azmir, et al., 2013; Ringuelet, 2013).

2.2. Principios activos de las plantas medicinales

Los tejidos vegetales están conformados por un 90% de agua, un 1% de iones, y el resto por moléculas orgánicas como los carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos secundarios (Molina, 2019)

Se conocen como principios activos a los constituyentes de una droga que presenta propiedades medicinales; siendo los metabolitos secundarios los más representativos. Por esta razón, estos compuestos han sido ampliamente utilizados por el ser humano en diversas industrias, como la farmacéutica, la terapéutica de cultivos, la alimentaria, la perfumista y el curtido de cueros (Molina, 2019; Ringuelet, 2013).

Antiguamente se creía que los metabolitos secundarios eran productos finales del metabolismo sin ninguna función, por ello se conocían como metabolitos desecho, ya que no cumplían una función directa en el crecimiento o desarrollo de la planta (Taiz, y Zeiger, 2006). Sin embargo, actualmente se conoce que cumplen diferentes funciones como la de generar toxicidad letal contra hongos e insectos que infectan la planta, inhibir la germinación de otras especies (alelopatía), proteger frente a herbívoros, defender contra patógenos microbianos, atraer polinizadores y dispersores de semillas, al conferir coloración a flores y frutos, y estabilizan las membranas fotosintéticas en condiciones de calor extremo (Molina, 2019; Ringuelet, 2013; Taiz, y Zeiger, 2006).

Los metabolitos secundarios se clasifican principalmente en tres grupos: alcaloides o compuestos que contienen nitrógeno, terpenos y fenoles. Además, se han identificado glucósidos, hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, ácidos grasos, amidas y ésteres. Su distribución es específica dependiendo de la especie y del órgano, por lo que no se encuentran en toda la planta (Molina, 2019; Taiz, y Zeiger, 2006).

2.2.1. Terpenos

Los terpenos o también llamados isoprenoides son el grupo de compuestos secundarios más ampliamente encontrados en las plantas (Azcón y Talón, 2008). Son compuestos insolubles en agua, biosintetizados a partir del ácido mevalónico (Taiz, y Zeiger, 2006; Chiocchio, et al., 2021).

Los terpenos se sintetizan a partir de un compuesto de 5 carbonos, el isopentenil difosfato, generando isopreno activo, clasificándose según el número de isopreno que contengan; si presentan 2 unidades serán monoterpenos; sesquiterpenos con 3 unidades; diterpenos (4 unidades); triterpenos (6 unidades); tetraterpenos (8 unidades) y politerpenos (más de 8 unidades). Entre los isoprenoides más distinguidos destacan los triterpenos y los esteroides, que generalmente son compuestos policíclicos que desempeñan importantes funciones fisiológicas en las plantas e importantes propiedades farmacológicas. Dentro de los esteroides se encuentran las saponinas esteroídicas y los glucósidos cardiotónicos (Azcón y Talón, 2008).

Las **saponinas** o saponósidos se caracterizan por producir una espuma al estar en contacto con el agua, esto se debe a su capacidad de disminuir la tensión superficial del agua; presentan un elevado peso molecular, se extraen mediante alcoholes o soluciones hidroalcohólicas. Son compuestos heterósidos que presentan una parte glucídica (con uno o más azúcares) y de una genina (parte no glucídica) llamada sapogenina, de naturaleza esteroide y triterpénica, volviéndolos poco polares. Los azúcares más habituales que constituyen las saponinas son la glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa; mientras que el ácido glucurónico se observa en las saponinas triterpénicas (López, 2001; López et al., 2022). Dentro de sus usos farmacéuticos destaca como expectorante, antiinflamatorio, antifúngico y antibacteriano (Azcón y Talón, 2008).

Los terpenos desempeñan una amplia variedad de funciones en las plantas, como la atracción de polinizadores y la protección de tejidos dañados frente a herbívoros, insectos y parásitos. En función de su papel biológico, diversos monoterpenos han demostrado ser tóxicos para insectos, hongos y bacterias. Por otro lado, saponinas esteroídicas como los cardenólidos presentan toxicidad en muchos animales, no obstante, esta misma propiedad las convierte en compuestos con potencial terapéutico. Además, debido a sus numerosas bioactividades, los terpenos encuentran múltiples aplicaciones en distintos sectores industriales, como el farmacéutico, alimentario, cosmético, perfumería y agrícola, donde se emplean como medicamentos, suplementos nutricionales, sabores, fragancias, biopesticidas, entre otros (Chiocchio, et al., 2021).

2.2.2. Fenoles

Los fenoles son los compuestos químicos con mayor distribución en las plantas, derivados de la vía de biosíntesis del shikimato (Chiocchio, et al., 2021). Su estructura química consta de al menos un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos (Ringuelet, 2013). El compuesto elemental es el fenol (figura 1), pero la mayoría son polifenoles, de los cuales se han identificado 8000, destacando las quinonas fenólicas, las cumarinas, lignanos, estilbenos, flavonoides, ligninas, taninos y tirosina (Azcón y Talón, 2008).



Figura 1: Estructura química del fenol (Azcón y Talón, 2008).

Las principales funciones de los fenoles en la planta es que sirven de defensa contra herbívoros o patógenos, como atracción de polinizadores y dispersantes de frutos, absorben la radiación ultravioleta dañina, reducen el crecimiento de plantas competidoras cercanas, como compuestos alelopáticos, agentes antifúngicos y antimicrobianos; además son parte esencial de la estructura de las paredes celulares, principalmente las ligninas, cutinas y suberinas, que funcionan como soporte mecánico y como barrera de la invasión microbiana (Taiz, y Zeiger, 2006; Ringuelet, 2013).

La mayor parte de los fenoles son hidrosolubles, solubles en solventes polares, por esta condición se localizan generalmente en las vacuolas celulares. La solubilidad en agua es atribuida al aumento de los grupos hidroxilo, además algunos de estos compuestos están mezclados con azúcares formando glicósidos, lo cual favorece la afinidad con el agua (Ringuelet, 2013).

Los **flavonoides** comprenden un grupo estructuralmente muy diverso, que se emplea en la medicina para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Son pigmentos hidrosolubles, de bajo peso molecular, presentes en las vacuolas de las células vegetales (Farhadi, et al., 2018; Molina, 2019). Su estructura consta de dos anillos de benceno (anillos A y B) unidos por una cadena de tres átomos de carbono, que frecuentemente se cierra para formar un anillo piránico (anillo C) (Chiocchio, et al., 2021)

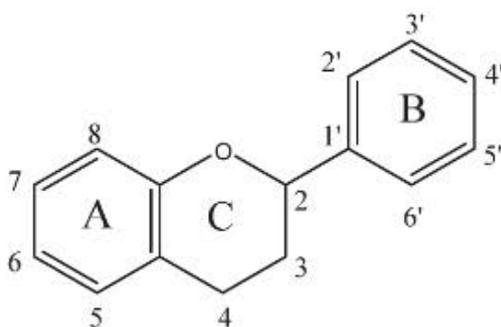


Figura 2: Estructura general de los flavonoides (Ringuelet, 2013).

Del grado de insaturación y oxidación del anillo central de tres carbonos se obtienen los subgrupos de flavonoides, los cuales son los flavonoles, como la quercetina, kaempferol y miricetina; la flavanona, que se encuentran en las frutas cítricas; las flavonas como luteolina; chalconas, como licocalcona A y B; catequinas; antocianina; e isoflavonoides (Farhadi, et al., 2018).

La **fitoalexinas** son compuestos fenólicos (isoflavonoides), inducibles, de bajo peso molecular que responden al ataque microbiano, debido a que son capaces de reconocer los elicitores, moléculas sintetizadas por los parásitos. En cambio, las **fitotoxinas** son toxinas constitutivas de los tejidos sanos de la planta en concentraciones suficientes para protegerlos de alguna posible infección (Taiz, y Zeiger, 2006; Ringuelet, 2013).

Los **taninos** son polímeros fenólicos no nitrogenados solubles en agua, su popularidad se debe a que se emplean para convertir la piel animal en cuero, proceso conocido como curtido, donde los taninos se unen al colágeno de la piel produciendo resistencia al agua, calor y microorganismos (Taiz, y Zeiger, 2006). Los taninos pueden ser hidrolizables o condensados; los hidrolizables más habituales son ésteres del ácido gálico con azúcares, mientras que los taninos condensados se relacionan con flavonoides (Azcón y Talón, 2008).

Los taninos son compuestos ampliamente estudiados por sus actividades biológicas. Su efecto antimicrobiano se debe a su capacidad para inactivar proteínas y enzimas secretadas por los microorganismos, interfiriendo en sus procesos de infección. Asimismo, su propiedad astringente surge de su afinidad por las proteínas de la mucosa y la saliva, lo que los convierte en efectivos disuasores frente a los depredadores (Ringuelet, 2013).

La **lignina** es una macromolécula fenólica compleja, y representa, después de la celulosa, una de las sustancias orgánicas más abundantes en las plantas. Está formada por tres unidades fenilpropanoides, conocidas como monolignoles: alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Taiz y Zeiger, 2006). Como componente estructural

de la pared celular, la lignina facilita el transporte eficiente de agua y nutrientes (Molina, 2019). Además, la lignina actúa como una barrera física frente a patógenos (Ringuelet, 2013).

2.2.3. Alcaloides

Son el grupo de metabolitos secundarios más diverso, con aproximadamente 15,000 descritos, y que se pueden encontrar en un 20% en las plantas vasculares, aunque actualmente también se pueden encontrar en animales, insectos y microorganismos (Taiz, y Zeiger, 2006; Ringuelet, 2013).

Su estructura consta de uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, que forma parte de un anillo heterocíclico; se sintetizan a partir de aminoácidos o sus derivados. Su importancia radica en que actúan como sustancias alelopáticas o como disuasorios alimentarios para proteger a la planta de la competencia o contra patógenos o depredadores (Azcón y Talón, 2008). También son auxiliares para mantener el equilibrio iónico por su carácter alcalino, además ayudan a absorber rayos UV, por la presencia de núcleos aromáticos (Ringuelet, 2013).

De acuerdo con su estructura molecular y biosintética los alcaloides se clasifican en: alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los alcaloides verdaderos son aquellos que se sintetizan por una amina biógena formada por descarboxilación del aminoácido; presentan un nitrógeno intracíclico, son básicos y forman sales con el ácido acético, oxálico, láctico, málico, tartáico y cítrico. Los protoalcaloides proceden de aminoácidos o aminas biógenas, el nitrógeno se encuentra en cadena alifática, en lugar de estar en un sistema heterocíclico. Los pseudoalcaloides, presentan un nitrógeno heterocíclico, pero no provienen de aminoácidos (Azcón y Talón, 2008; Ringuelet, 2013).

2.3. Extracción de compuestos

Las plantas medicinales presentan principios activos o metabolitos secundarios que poseen actividad biológica, ya sea antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidantes e hipolipemiantes. La obtención de estos principios activos se logra a través de los extractos de diferentes partes de la planta como sus hojas, tallos, flores y frutos (Azmir, et al., 2013; Abubakar y Haque, 2020; Flores, et al., 2020).

La extracción tiene como finalidad separar la materia soluble (compuestos fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble) por acción de un disolvente (Sierra, et al., 2018).

Previo a la extracción se debe coleccionar el material vegetal de interés y para ello se debe de realizar su “estabilización”, la cual consiste en la fijación relativa de su composición química, para detener procesos enzimáticos que modifiquen la estructura, se pierdan

compuestos volátiles, u ocurran oxidaciones; para ello se utilizan tratamientos con calor, congelamiento, liofilización o criodesecación (Ringuelet, 2013). Posteriormente la muestra se pulveriza de manera homogénea, para mejorar la cinética de extracción analítica, y ampliar la superficie de contacto de la muestra con el solvente, aumentando la tasa de rendimiento (Sasidharan, et al., 2011; Fotsing et al., 2022).

Para obtener un proceso de extracción eficaz es necesario elegir un disolvente (menstruo) adecuado o afín a los compuestos bioactivos que se desean. La polaridad es un elemento importante que el disolvente debe presentar para lograr la solubilidad de un soluto en un solvente; por ello los disolventes polares (agua, metanol y etanol) se emplean en la extracción de compuestos altamente polares o solutos iónicos; mientras que los disolventes no polares (hexano, diclorometano) se utilizan para compuestos no polares (Ringuelet, 2013; Abubakar y Haque, 2020).

La polaridad de los disolventes polares, como el agua, metanol, etanol, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), y ácidos de bajos peso molecular como fórmico y acético, se debe al tipo de uniones iónicas o covalentes polares, a la presencia de grupos funcionales polares (hidroxilo, amino) y por formar puentes hidrógeno. Por ello los compuestos con grupo funcionales polares son solubles en estos disolventes, cuando su componente hidrocarbonado no presente más de 4 átomos de carbono. Mientras que los disolventes no polares, presentan estructura de hidrocarburos, con uniones químicas carbono-carbono; dentro de estos disolventes está el éter de petróleo, tetracloruro de carbono, ciclohexano y benceno. Por ultimo los disolventes de polaridad intermedia, como la acetona, éter etílico y el acetato de etilo, presentan estructura molecular eléctricamente asimétrica, y ciertos compuestos oxigenados (Ringuelet, 2013).

En la tabla 1 se observan los disolventes en orden de polaridad creciente empleados en extracciones (Abubakar y Haque, 2020):

Disolventes	Polaridad
<i>n</i> - Hexano	0.009
éter de petróleo	0.117
Éter dietílico	0.117
Acetato de etilo	0.228
Cloroformo	0.259
Diclorometano	0.309

Acetona	0.355
<i>n</i> - Butanol	0.586
Etanol	0.654
Metanol	0.762
Agua	1.000

Tabla 1: Polaridad de los disolventes empleados en extractos.

Las propiedades de los diferentes disolventes, así como los compuestos activos que pueden extraer se describen en la siguiente tabla 2 (Pandey y Tripathi, 2013; Abubakar y Haque, 2020; Lee et al., 2024):

Disolvente	Compuestos activos	Ventajas	Desventajas
Agua	Antocianinas Almidones Taninos Saponinas Terpenoides Polipéptidos Lectinas	Disuelve una amplia gama de sustancias, no es tóxico, no inflamable, de bajo costo y muy polar.	Promueve el crecimiento de microorganismos, puede ocasionar hidrólisis y requiere de elevadas temperaturas para concentrar el extracto.
Etanol	Taninos Polifenoles Poliacetilenos Flavonoles Terpenoides Esteroles Alcaloides	Miscible con agua, auto conservan a concentraciones superiores al 20%, a bajas concentraciones no es tóxico, no requiere elevadas	No disuelve grasas, gomas o ceras, es inflamable y volátil.
Metanol	Antocianinas Terpenoides Saponinas Taninos Xantoxilinas Totarol Quassinoides Lactonas	temperaturas para concentrar el extracto.	

	Flavonas Fenones Polifenoles		
Cloroformo	Terpenoides Flavonoides	Incoloro, de olor dulce, soluble en alcoholes, y se absorbe y metaboliza en el cuerpo.	Presenta propiedades sedantes y cancerígenas.
Éter	Alcaloides Terpenoides Cumarinas Ácidos grasos	Miscible en agua, punto de ebullición bajo e insípido por naturaleza; es un compuesto estable y no reacciona con ácidos, bases y metales.	De naturaleza altamente volátil e inflamable.
Acetona	Fenol Flavonoles	Elevada selectividad para sustancias no polares, lo que permite obtener compuestos con un alto grado de pureza, lo que reduce los costos operativos. En comparación con otros disolventes orgánicos, la acetona es relativamente económica.	Evaporación rápida y altamente inflamable.

Tabla 2: Propiedades y compuestos activos de los disolventes.

2.4. Métodos de extracción

La extracción del material vegetal puede ser por métodos convencionales y no convencionales. Los métodos no convencionales se han desarrollado en los últimos 50 años para ser ecológicos y así disminuir el uso de productos químico-sintéticos, y de solventes orgánicos; así como reducir el tiempo de funcionamiento, con un mejor

rendimiento y calidad; entre estos métodos destacan la extracción por sonicación, por campo eléctrico pulsado, digestión enzimática, extracción asistida por microondas, calentamiento óhmico y disolventes acelerados. Mientras que los métodos convencionales son la extracción por Soxhlet, filtración, maceración, digestión, maceración, decocción y extracción exhaustiva en serie (Pandey y Tripathi, 2013; Azmir, et al., 2013).

2.4.1. Extracción por Soxhlet

Este proceso también es llamado extracción en caliente continua, es ampliamente utilizado para extraer valiosos compuestos bioactivos de las plantas, y además se emplea como modelo de comparación para las nuevas técnicas de extracción (Azmir, et al., 2013; Abubakar y Haque, 2020).

Consiste en una extracción sólido-líquido, donde el material vegetal seco y finamente pulverizado se coloca dentro de un dedal, el cual se introduce en la cámara de extracción (figura 3), esta se coloca sobre un matraz que contiene el disolvente, al calentarse hasta su punto de ebullición, el disolvente se evapora, asciende y pasa a través del condensador, donde se condensa y gotea sobre el material vegetal en la cámara de extracción. El disolvente extrae los compuestos activos, hasta que el nivel del líquido alcanza la parte superior del sifón, lo que provoca que la solución con el extracto regrese al matraz, completando así el ciclo de extracción (Abubakar y Haque, 2020).

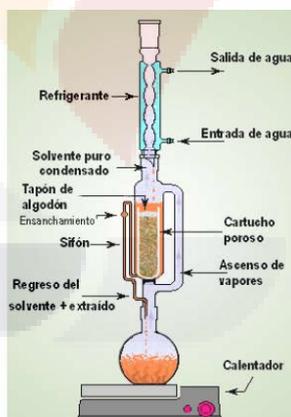


Figura 3: Equipo Soxhlet (Núñez, 2008).

Las ventajas de la extracción por Soxhlet, es que se puede extraer grandes cantidades de compuestos bioactivos con una menor cantidad de disolvente, es aplicable a material vegetal termoestable, y no se requiere filtración. Además, se emplea un solo volumen de disolvente que se recicla continuamente, su operación sencilla, bajo costo de implementación y contacto constante entre el disolvente y la muestra. Su desventaja es

que no se puede agitar con regularidad y no es conveniente para compuestos termolábiles (Abubakar y Haque, 2020; Fotsing et al., 2021).

2.4.2. Extracción por maceración

La maceración es una extracción casera que se emplea desde hace mucho tiempo. La extracción consiste en agregar el disolvente apropiado (menstruo) sobre el material vegetal triturado en un recipiente, el cual se cierra y se mantiene en agitación periódica. Una vez finalizado el proceso, la fase líquida (micela) se separa del residuo sólido (orujo) mediante filtración o decantación. Posteriormente, el disolvente se elimina de la micela por evaporación para obtener el extracto deseado. Este método se emplea para materiales termolábiles (Azmir, et al., 2013; Abubakar y Haque, 2020).

2.4.3. Sonicación

El ultrasonido corresponde a ondas sonoras de alta frecuencia, no audibles para el oído humano, que se sitúan en un rango de 20 a 2000 kHz. Estas ondas se propagan a través del medio generando ciclos de compresión y expansión que inducen el fenómeno de cavitación. Este fenómeno implica la formación, crecimiento y colapso violento de microburbujas, liberando energía suficiente para alterar estructuras celulares. La extracción por sonicación se basa en este mecanismo, ya que la cavitación aumenta la permeabilidad de las paredes celulares, facilitando así la lixiviación de compuestos orgánicos e inorgánicos desde la matriz vegetal (Azmir, et al., 2013; Fotsing et al., 2021). La ventaja de este método es que se puede aplicar a muestras pequeñas, reduce el tiempo de extracción y la cantidad de disolvente, por lo cual se maximiza el rendimiento. Pero su desventaja es que es un método de difícil reproducción, y aplicar una gran cantidad de energía puede degradar el compuesto activo al producir radicales libres (Abubakar y Haque, 2020).

A continuación (tabla 3), se presenta un resumen de las condiciones de experimentación de los 3 métodos de extracción (Sasidharan et al., 2010):

	Soxhlet	Sonicación	Maceración
Disolvente	Metanol, etanol, o mezcla de alcohol y agua.	Metanol, etanol, o mezcla de alcohol y agua.	Metanol, etanol, o mezcla de alcohol y agua.

Temperatura (°C)	Temperatura de ebullición del solvente	Se puede aplicar	Ambiente
Tiempo	3-18 horas	1 hora	3-4 días
Volumen de solvente (ml)	150-200	50-100	Depende de la muestra

Tabla 3: Resumen de las condiciones de experimentación.

2.5. Métodos de separación e identificación

La química analítica desempeña un papel fundamental en el análisis, aislamiento y cuantificación de compuestos fitoquímicos, así como en la investigación básica del metabolismo vegetal. Para el estudio de los principios activos, se emplean diversas técnicas analíticas (tabla 4), que permiten caracterizar y determinar la concentración de compuestos (Ringuelet, 2013):

Cromatografía	Cromatografía en capa fina (TLC) Cromatografía gaseosa (GC) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Cromatografía líquida capilar (μ -LC)
Electroforesis	Electroforesis en capa fina (TLE) Isotacoforesis (ITP)- Electroforesis a velocidad uniforme Electroforesis capilar (CE)
Técnicas espectroscópicas	Espectroscopía UV Espectroscopía infrarroja (IR) Espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIR) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) Espectroscopía de masas (MS)

Tabla 4: Métodos de separación e identificación.

2.5.1. Espectroscopía infrarroja (IR)

La espectroscopía infrarroja sirve para identificar los grupos funcionales presentes en una molécula. Esta técnica se basa en el uso de luz infrarroja que detecta movimientos vibratorios y de rotación de las moléculas en una muestra. Al pasar la luz a través del compuesto, algunas frecuencias son absorbidas, mientras que otras se transmiten sin alteración. La absorción de la luz infrarroja varía según el tipo de enlace presente en la molécula, ya que cada enlace como: C-C, C=C, C \equiv C, C-O, C=O, O-H y N-H, presenta una frecuencia de vibración específica. Cuando estos enlaces están presentes en una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muestra, generan bandas de absorción características en el espectro infrarrojo. Estas señales permiten identificar los grupos funcionales presentes y, en consecuencia, obtener información sobre la composición química de la sustancia analizada (Altemimi, et al. 2017; Zhang et al., 2023).

La frecuencia de vibración de los átomos para que estos sean adsorbidos por la energía infrarroja depende del momento dipolar, es decir, de la fuerza de unión del enlace y de su masa. El momento dipolar de la molécula absorbe la energía del fotón produciéndose una transferencia de energía o resonancia, ampliando así la vibración del enlace provocando que la molécula vibre a un estado excitado (Mondragón, 2017).

Las vibraciones moleculares se dividen principalmente en tensión o alargamiento, y deformación o flexión. En las vibraciones de tensión la distancia entre los átomos sufren un cambio continuo sin que el eje y el ángulo del enlace se modifique; mientras que en las vibraciones de deformación el ángulo entre dos enlaces cambia, clasificándose en cuatro tipos (figura 4): de tijera, ocurre una flexión simétrica en el plano, donde dos átomos no unidos directamente oscilan acercándose y alejándose uno del otro; de balanceo con flexión asimétrica en el plano; de aleteo con una flexión simétrica fuera del plano; y de torsión donde sucede una flexión asimétrica fuera del plano (Pickering, 1980; Sierra, et al., 2009).

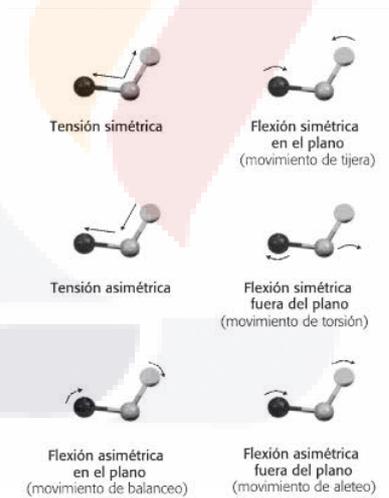


Figura 4: Tipos de vibraciones en las moléculas (Sierra, et al., 2009).

La espectrometría infrarroja asimila la absorción de la radiación de longitudes de onda λ en el intervalo de 1 y 100 micras, pero generalmente se emplea el número de onda, que equivale a la inversa de la longitud de onda, expresada en cm^{-1} . Este intervalo se divide en tres regiones: infrarrojo cercano que comprende la región de 1.0 a 2.5 μm o de 10 000 a 4000 cm^{-1} , infrarrojo medio de 2.5 a 50 μm o de 4000 a 200 cm^{-1} , y el infrarrojo lejano de 50 a 1000 μm (Cabildo, 2008; Mondragón, 2020).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El análisis de un compuesto a través del espectro infrarrojo inicia identificando sus grupos funcionales en la zona del espectro llamada “región de frecuencia de grupo”, que abarca de los 3600 a los 1200 cm^{-1} , donde se encontrara una banda de adsorción única para cada grupo, las adsorciones de esta zona generalmente corresponden a vibraciones de estiramiento; enseguida se analiza la región conocida como “huella dactilar”, comprendida de 1200 a 600 cm^{-1} , esta zona sirve de evidencia para la identificación, sin embargo, es complicada ya que se presentan vibraciones de alargamiento y de flexión (Sierra, et al, 2009; Mondragón, 2017).

Para la caracterización de compuestos nuevos se recomienda (Mondragón, 2017):

- Leer el espectro de izquierda a derecha, analizando la zona de 3600 a 3000 cm^{-1} , ya que se encuentra las vibraciones típicas de ciertos grupos funcionales importantes como alquenos, alquinos y aromáticos.
- Examinar la zona entre 3000 y 2000 para encontrar aldehídos (C-H), alquinos ($\text{C}\equiv\text{C}$), nitrilos ($\text{C}\equiv\text{N}$), o mercaptanos (S-H).
- Para comprobar el análisis de la región 3600 a 2000 cm^{-1} , identificar vibraciones de grupos carbonílicos (C=O) o de vibraciones de deformación de $-\text{CH}_3/-\text{CH}_2$.
- Por último, reconocer la presencia de éteres y haluros, incluso de grupos inorgánicos como carbonato, fosfato, sulfato y nitrato en la zona de 1200 a 600 cm^{-1} .

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una herramienta ampliamente utilizada para la caracterización e identificación de grupos funcionales presentes en biomoléculas de extractos de plantas medicinales (Ingle, et al., 2017). Es una técnica eficiente, accesible y no destructiva que permite analizar las propiedades químicas a través de la interacción entre la radiación infrarroja y los enlaces moleculares (Barnes et al., 2023). Observa los movimientos vibracionales y rotacionales básicos de las moléculas al absorber luz dentro del rango del infrarrojo medio (4000 y 400 cm^{-1}) del espectro electromagnético (Ordoudi et al., 2023).

2.6. Purificación de polifenoles por adsorción

La cromatografía es una técnica de separación empleada para purificación de mezclas complejas y el aislamiento de sus componentes individuales. El principio fundamental de este método radica en la migración diferencial y en la retención selectiva de las moléculas de soluto durante su paso a través de un medio constituido por partículas de resina. El fluido que transporta los solutos a lo largo de la columna se denomina **fase móvil**, mientras que el material que permanece inmóvil en el interior de la columna y que facilita la separación se conoce como **fase estacionaria** (Najafpour, 2007).

Las resinas de adsorción se han empleado para la separación de compuestos fenólicos de mezclas complejas. Las resinas están compuestas por materiales poliméricos porosos que contienen grupos funcionales con alta afinidad por los compuestos fenólicos, tales como grupos hidroxilo, carboxilo y amino. La adsorción ocurre en una columna empacada con resina, a través de la cual pasa la mezcla bajo condiciones controladas de temperatura, pH y flujo, posteriormente, los compuestos fenólicos son retenidos selectivamente por la resina, mientras que los demás componentes se eluyen. Finalmente, los compuestos fenólicos adsorbidos son eluidos de la resina mediante un disolvente adecuado, como metanol o etanol (Kodjapashis et al., 2023).

Para la purificación y adsorción de fenoles a partir de soluciones acuosas, se han empleado distintas técnicas, entre ellas, las resinas poliméricas, destacando como adsorbente la resina Amberlite XAD-16 (tabla 5), un copolímero de poliestireno-divinilbenceno. La desorción o recuperación de los fenoles de la resina Amberlite XAD-16 se realiza mediante métodos de elución (fase móvil) utilizando un disolvente (metanol o etanol) como eluyente (Aranda-Ledesma et al., 2022).

Características	<ul style="list-style-type: none"> • Perlas blancas y opacas, no iónicas, insolubles e hidrofóbicas. • Polímero reticulado con estructura macroporosa, área de superficie alta y una superficie aromática.
Usos	<ul style="list-style-type: none"> • Absorbente de moléculas hidrofóbicas de solventes polares y de compuestos orgánicos volátiles de corrientes de vapor. • Adsorbente de sustancias orgánicas de peso molecular relativamente bajo a medio.
Aplicaciones	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de polifenoles. • Purificación de antibióticos. • Adsorción de esteroides solubles en agua, enzimas, aminoácidos y proteínas. • Eliminación de compuestos problemáticos no polares (fenoles o colorantes) de solventes polares (jugos o cuerpos de agua).
Propiedades	<ul style="list-style-type: none"> • Área de superficie de 800 m²/g. • Diámetro medio del poro de 150 Å. • Volumen total del poro de 0.6 ml/ml.

Tabla 5: características de la Amberlite XAD-16 (Dupont, 2022).

2.7. Actividad antioxidante

El oxígeno (O₂) es necesario para la producción de energía en los seres vivos, pero su concentración excesiva en las células es perjudicial, ya que se generan especies reactivas (ROS) durante su oxidación. Cuando existe un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema biológico de generar mecanismos de defensa llamados sistema antioxidante (AOX), se produce el estrés oxidativo (EO), reconocido por ser el responsable de la fisiopatología de diversas enfermedades (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013).

Las ROS pueden ser radicales libres, es decir entidades químicas que presentan uno o más electrones desapareados en su último orbital, capaces de reaccionar con numerosas biomoléculas a través de su oxidación. Las especies reactivas o radicales libres más frecuentes en ROS son el anión superóxido (O₂⁻) y el radical hidroxilo (OH); mientras que los no radicales son el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el ácido hipocloroso (HOCl), los cuales se generan en el metabolismo oxidativo (figura 5) (Londoño, 2012; Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013; Checa & Aran, 2020).

El metabolismo oxidativo inicia cuando el O₂ se reduce a agua (H₂O) al aceptar cuatro electrones y cuatro protones del complejo citocromo-oxidasa de la mitocondria, para así generar la energía de los procesos celulares; generalmente el 2% del oxígeno se reduce de forma incompleta por aceptar un menor número de electrones, formándose así los ROS. El anión superóxido (O₂⁻) se origina cuando el oxígeno (O₂) acepta un electrón; mientras que el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se forma cuando el superóxido (O₂⁻) acepta un electrón y se genera gracias a la catálisis por una reacción de dismutación de la enzima superóxido dismutasa (SOD); además el H₂O₂ en presencia de metales como cobre (Cu), hierro (Fe), níquel (Ni) y cobalto (Co), se transforma en el radical hidroxilo (OH), quien es más reactivo por la reacción de Haber-Weiss o Fenton (Sánchez-Valle & Méndez-Sánchez, 2013).

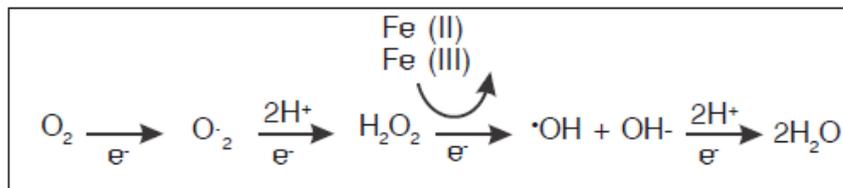


Figura 5: Metabolismo del oxígeno molecular (Sánchez y Méndez, 2013).

Como observamos las ROS se generan en el organismo por el metabolismo del oxígeno, pero también pueden originarse por fuentes exógenas como el humo del cigarrillo, las

emisiones vehiculares, la radiación solar, nutrición, la radioterapia, el uso de dispositivos cosméticos y la contaminación industrial (Checa & Aran, 2020).

Los antioxidantes son moléculas presentes en el cuerpo humano y en los alimentos, encargados de retrasar, controlar y prevenir el estrés oxidativo, neutralizando los radicales libres, que conducen a la propagación de enfermedades degenerativas en el organismo y al deterioro de la calidad de los alimentos (Mendonça et al., 2022).

Los antioxidantes pueden actuar de forma endógena o ingeridos exógenamente por vía alimenticia (Londoño, 2012; Nimse y Pal, 2015; Munteanu & Apetrei, 2021):

- a) **Antioxidantes enzimáticos:** catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px), que se encargan por remoción catalítica de los radicales libres.
- b) **Antioxidantes no enzimáticos:** vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), polifenoles vegetales, el glutatión (GSH), bilirrubina y ácido úrico, los cuales donan protones o electrones para estabilizar los radicales libres.
- c) **Proteínas** que se unen a metales prooxidantes (hierro y cobre) y proteínas de choque térmico.

La capacidad de un antioxidante puede evaluarse de acuerdo con las reacciones químicas involucradas, estas pruebas se clasifican en dos categorías. Por un lado, los métodos basados en transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), evalúan la habilidad de un antioxidante para neutralizar radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno. Algunos ejemplos representativos de este tipo de ensayo incluyen ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), TRAP (Parámetro Antioxidante Total de Atrapamiento de Radicales Peroxilo) y TOSC (Capacidad Total de Captación de Oxirradicales). Mientras que los métodos basados en transferencia de un electrón (SET), determinan la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir los iones metálicos, los grupos carbonilo y los radicales libres. Entre las pruebas más comunes de este grupo se encuentran el ensayo de Folin-Ciocalteu (FC), el poder reductor férrico (FRAP) y la capacidad antioxidante basada en reducción cúprica (CUPRAC), caracterizadas por un cambio de color del oxidante al ser reducido, lo que permite cuantificar la actividad antioxidante mediante técnicas espectroscópicas (Munteanu & Apetrei, 2021).

No obstante, las pruebas utilizadas para estimar la capacidad antioxidante total (TAC), como el ensayo ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), suelen basarse en métodos de medición no competitivos que combinan mecanismos de transferencia de electrones y de átomos de hidrógeno (Mendonça et al., 2022).

ABTS •+

ABTS•+ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) es un radical catiónico de color azul verdoso que presenta una absorción máxima a 734 nm. Este radical se genera mediante la oxidación del ABTS (figura 7) utilizando persulfato de potasio. En presencia de antioxidantes, la intensidad del color del ABTS•+ disminuye de forma proporcional a su capacidad para neutralizar radicales libres, lo que permite evaluar su actividad antioxidante. Además, el radical ABTS•+ es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos, lo que lo hace adecuado para medir la actividad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos (Londoño, 2012; Munteanu & Apetrei, 2021).

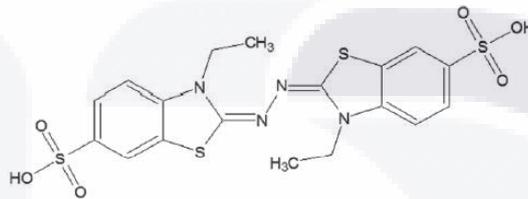


Figura 6: ABTS (Londoño, 2012).

FRAP

El poder antioxidante reductor de férrico (FRAP) evalúa la actividad de un antioxidante que es capaz de reducir el ion férrico (Fe^{3+}) al estado ferroso (Fe^{2+}). El método consiste en reducir por medio del antioxidante la forma férrica (figura 8) del compuesto hierro-tripiridyl-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), este último (Fe^{2+} -TPTZ) genera una coloración azul fuerte, con una absorbancia máxima de 593 nm (Benítez, et al., 2020; Mercado, et al., 2013). A diferencia de otros ensayos basados en transferencia de electrones (SET), FRAP se lleva a cabo en un medio ácido (pH 3,6) para garantizar la solubilidad del hierro. Estas condiciones también disminuyen el potencial de ionización responsable de la transferencia electrónica y elevan el potencial redox, lo que puede influir en el mecanismo dominante de la reacción (Munteanu & Apetrei, 2021).

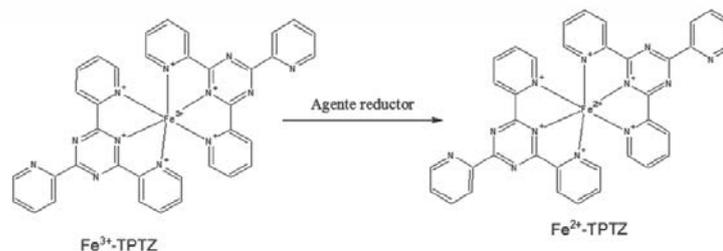


Figura 7: Fundamento de la técnica FRAP (Londoño, 2012).

Otra técnica para medir FRAP es cuando el ferricianuro de potasio (Fe^{3+}) reaccionan con la sustancia con potencial reductor (antioxidante) y generan ferricianuro de potasio

(Fe²⁺), posteriormente reaccionan con el cloruro férrico para formar el complejo férrico-ferroso con una absorbancia máxima de 700 nm (Bhalodia, et al., 2013).

Contenido de fenoles totales

Para conocer la concentración en general de fenoles totales de una muestra se emplea la técnica de Folin-Ciocalteu, este reactivo es una mezcla de ácido fosfotúngstico (H₃PW₁₂O₄₀) y ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) (Kuskoski, et al., 2005).

El mecanismo químico es una reacción de reducción-oxidación (redox) que se basa en la transferencia de electrones (figura 9) de los grupos fenólicos a la mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, en un medio alcalino y en presencia de Carbonato de Sodio (Na₂CO₃) para su correcta reacción, en seguida, se forman iones de fenolato que conducen a la reducción de los componentes ácidos (fosfotúngstico y fosfomolibdico) del reactivo de Folin, los cuales se presentan de un color azul que es cuantificable en espectrometría a 730 nm (Carmona, et al., 2021).

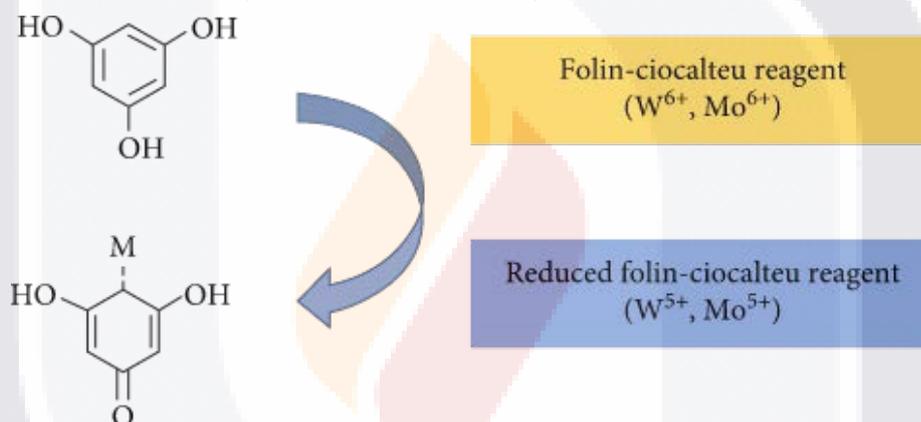


Figura 8: Reacción oxido reducción (redox) donde los elementos tungsteno (W) y molibdeno (Mo) (color amarillo) se reducen a una forma iónica de 5⁺ y el anillo fenólico se oxida (color azul) (Carmona, et al., 2021).

La desventaja de este método es que no es exclusiva de fenoles, otros compuestos fitoquímicos como carbohidratos reductores, ácido ascórbico, aminas aromáticas, ácidos orgánicos y iones inorgánicos también sufren reacción redox (Carmona, et al., 2021).

2.8. Resistencia bacteriana

Se denominan bacterias resistentes a aquellas bacterias que se replican en presencia de un antibiótico, hecho que se ha convertido en amenaza mundial debido a las altas tasas de morbilidad, mortalidad y costo del tratamiento (Zaman, et al., 2017; Alós, 2015). La resistencia a los antibióticos se debe principalmente por las modificaciones genéticas de las bacterias; pero también por vía de transmisión de la cadena alimenticia entre

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

poblaciones animales y humanas, ya que los animales reciben antibióticos en la comida, agua o vía parental; otro factor es el uso indiscriminado de antibióticos; además el uso de productos de higiene para el hogar contienen una alta concentración de ingredientes antibacterianos; por otro lado, también la falta de acceso de agua limpia, saneamiento e higiene para personas y animales; así como la prevención y control deficiente de enfermedades e infecciones en los centros de salud (OMS, 2021; Zaman, et al., 2017). La mayoría de los patógenos bacterianos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia que reducen o anulan la eficacia de los antibióticos. Entre estos mecanismos se encuentran el uso de bombas de eflujo, que expulsan el antibiótico fuera de la célula; la producción de enzimas que inactivan o degradan el fármaco; la modificación de los sitios diana del antibiótico, lo que impide su acción; y los cambios en el microambiente celular, que dificultan la penetración o actividad del agente antimicrobiano (Keita et al., 2022).

En 2024, la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó su lista de patógenos bacterianos prioritarios con el objetivo de guiar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos ante el creciente problema de la resistencia antimicrobiana. Esta lista clasifica a las bacterias en tres categorías según su nivel de amenaza para la salud pública: **prioridad crítica, alta y media**. En la categoría **crítica** se encuentran bacterias resistentes a múltiples fármacos, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas cepas de *Enterobacteriaceae* productoras de carbapenemasas, que representan una amenaza grave en entornos hospitalarios. La categoría de **prioridad alta** incluye patógenos como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.* resistentes a fluoroquinolonas. Finalmente, en la categoría de **prioridad media** se encuentran bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp.*, cuya resistencia creciente también representa un riesgo. Esta clasificación busca orientar los esfuerzos globales en el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces y en la vigilancia de la resistencia bacteriana.

2.9. Biopelículas

Se conocen como biopelículas a las comunidades de microorganismos asociados a una superficie incrustadas en una matriz extracelular de polisacáridos extracelulares, estos muestran fenotipos similares a los organismos planctónicos. La matriz extracelular les brinda a las biopelículas una resistencia alta a múltiples factores ambientales como a los antibióticos, desinfectantes y la radiación ultravioleta (Ramírez, et al., 2018; Stiefel, et al, 2016; Stepanović, et al., 2007).

Las biopelículas están compuestas principalmente por agua (97%), células microbianas (2-5%), polisacáridos (1-2%), proteínas (<1-2%) y ADN/ARN (<1-2%) (Rather et al., 2021).

Para la formación de una biopelícula se necesitan de cuatro etapas principalmente (Rabin, 2015; Cao et al., 2020; Rather et al., 2021):

1. **Adhesión inicial:** cuando los microorganismos se unen primariamente a una superficie de manera débil y reversible.
2. **Adhesión irreversible:** las bacterias producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que generan una unión irreversible a la superficie. Una molécula clave en estas dos primeras etapas es el monofosfato de guanosina diméricobis-(3'-5')- cíclico (c-di-GMP), ya que restringe la motilidad y favorece la producción de EPS.
3. **Colonización:** los microorganismos adheridos comienzan a multiplicarse y agregarse dentro de la EPS, formando microcolonias más complejas.
4. **Maduración:** la adhesión a la superficie, la estabilización de la estructura tridimensional de la biopelícula, la agrupación celular y la protección a condiciones desfavorables, se logra gracias a la presencia de EPS. En una biopelícula madura se puede reconocer 3 capas: reguladora interna, basal microbiana media y la externa habitada por bacterias planctónicas listas para emerger.
5. **Dispersión:** ocurre generalmente cuando existe una población excesiva, falta de nutrientes, intensa competencia y variación en condiciones ambientales como deficiencia de oxígeno, acumulación de metabolitos, temperatura, así como regulación de genes; provocando el desprendimiento de la biopelícula y la dispersión para comenzar una nueva formación.

2.9.1. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii pertenece al género *Acinetobacter*, dentro de la familia Moraxellaceae y la clase de Proteobacterias. Es una bacteria Gram negativa con forma de cocobacilo, inmóvil y sin capacidad fermentativa. Además, es catalasa positiva, oxidasa negativa y no muestra un metabolismo rápido (Gedefie et al., 2021). Es una bacteria oportunista de importancia clínica que genera infecciones nosocomiales como septicemias y neumonías, infecciones del tracto urinario asociados a catéter, meningitis e inclusive endocarditis; también se reporta en infecciones en la piel y tejidos blandos; sin embargo, son infecciones adquiridas en pacientes inmunodeprimidos (Harding, et al., 2018).

Actualmente es una bacteria que presenta altos porcentajes de multi-resistencia, con tasa de hasta 70% en aislados de América Latina y Oriente Medio, hecho que se asocia con prolongada hospitalización, aumento en costos y mayores tasas de mortalidad. La alta resistencia a fármacos se debe principalmente a su genoma plástico que muta velozmente cuando está en adversidad y estrés (Harding, et al., 2018).

A. baumannii muestra una notable resistencia a varios grupos de antibióticos, incluyendo carbapenémicos, penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglucósidos. Algunas cepas han evolucionado hasta convertirse en pan droga resistentes (PDR), es decir, resistentes a todos los antimicrobianos disponibles, incluyendo polimixinas y tigeciclina (Kyriakidis et al., 2021).

La capacidad de *A. baumannii* de formar biopelículas sobre una amplia variedad de superficies abióticas, incluyendo materiales presentes en entornos hospitalarios, como tubos endotraqueales, policarbonato y acero inoxidable, contribuye significativamente a una mayor tolerancia a antibióticos como ampicilina-sulbactam, amikacina, ciprofloxacina y ceftazidima, lo que dificulta significativamente su tratamiento (Gedefie et al., 2021). Esta creciente resistencia ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas y el desarrollo de antimicrobianos innovadores, así como el uso de estrategias combinadas para enfrentar infecciones causadas por este patógeno (Kyriakidis et al., 2021).

2.9.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, es una bacteria Gram negativa ubicua, perteneciente al orden *Pseudomonadaceae*. Es una bacteria en forma de bacilo, móvil, heterótrofa y aereobia facultativa (Diggle & Whiteley, 2020). Es un patógeno versátil y oportunista, puede sobrevivir a una gran variedad de ambientes debido a su potencial metabólico, adaptabilidad fisiológica y mecanismos de virulencia. Esta bacteria está asociada con infecciones nosocomiales, neumonía asociada a ventilador, infecciones de tracto urinario, bacteremias, infecciones cutáneas en pacientes quemados; además contribuye con alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, al causar una infección pulmonar, y en pacientes inmunodeprimidos (Esnard et al., 2004; Pang, et al., 2019).

P. aeruginosa es una de las bacterias más desafiantes, pues persiste en ambientes acuáticos, superficies diversas e incluso en equipos médicos, gracias a diversos factores de adhesión como flagelos, pili y la formación de biopelículas, lo que contribuye a su permanencia en entornos hospitalarios y al desarrollo de infecciones difíciles de erradicar. La creciente ineficacia de los tratamientos frente a este patógeno representa

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un problema de salud pública a nivel mundial. Además, esta bacteria presenta una elevada resistencia a diversos grupos de antibióticos, entre ellos los beta-lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Chegini et al., 2020)

2.9.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus microorganismo coco Gram positivo, descubierto por el cirujano Alexander Ogston en 1880. Se caracteriza por agruparse en forma que asemeja racimos de uva, es β hemolítico, catalasa y coagulasa positivo (Pasachova, et al., 2019).

A pesar de ser un microorganismo que forma parte de la parte del microbioma del ser humano (piel, zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axiles), genera infecciones endovasculares, neumonías, artritis sépticas, osteomielitis, infecciones en piel y estructuras asociadas, así como enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) contaminados por toxinas (Pasachova, et al., 2019; Zendejas, et al., 2014; Togneri, et al., 2017).

La ineficacia de los antibióticos en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* se debe a la acumulación de genes asociados a la resistencia antimicrobiana y su capacidad intrínseca para adaptarse mediante cambios fenotípicos flexibles. Entre estos mecanismos adaptativos destacan la formación de biopelículas y la aparición de variantes de colonias pequeñas (Guo et al., 2022).

Se emplea el termino SAMR, a la resistencia a la meticilina y a todas las penicilinas por *S. aureus*, lo cual es una preocupación global, ya que aumenta un 64% las posibilidades de morir en pacientes con infecciones fármaco-sensibles (Togneri, et al., 2017).

2.9.4. *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis bacteria Gram positiva, que pertenece al grupo de estafilococos negativos coagulasa, se encuentra en la piel y membranas mucosas de humanos y algunos mamíferos. Se aísla principalmente del epitelio humano, donde coloniza axilas, cabeza y fosas nasales (Moreno y Ruiz, 2007; Otto, 2009). Es un miembro común de la flora cutánea comensal de los humanos, mantiene la homeostasis local, además interfiere los mecanismos de colonización y formación de biopelículas de *S. aureus* (Büttner, et al., 2015).

S. epidermidis ha sido identificado con mayor frecuencia como el agente causante de diversas infecciones graves, que incluyen bacteriemia, sepsis, endocarditis, meningitis y el síndrome de choque tóxico. Además, puede provocar infecciones superficiales cutáneas y oculares (Burke et al., 2024). También se ha aislado de prótesis de articulaciones infectadas, catéteres venosos centrales o periféricos, dispositivos intracardiacos e injertos vasculares, causando infecciones graves. Es promotor de

infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo, infecciones cardiovasculares e infecciones en oídos, nariz, ojos y garganta (Vuong y Otto, 2002; Büttner, et al., 2015; Otto, 2009).

S. epidermidis ha elevado los costos de tratamiento debido al incrementado de resistencia a antibióticos como los aminoglucósidos y β -lactámicos, así como la formación de biopelículas (Otto, 2009; Pinilla, et al., 2009)

2.9.5. *Escherichia coli*

La bacteria Gram negativa *E. coli*, presenta forma de bacilo, es anaerobia facultativa y se clasifica dentro de la familia Enterobacteriaceae. Forma parte de la flora normal del inruebaino del hombre y de los animales de sangre caliente; pero ciertas cepas son patógenas, responsables de diferentes cuadros clínicos (Rodríguez, 2002; Jang, et al., 2017).

E. coli ocasiona anualmente 2 millones de muertes, y los principales patotipos responsables de enfermedades diarreogénicas y extrainruebainales son *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroemorrágica (EHEC), *E. coli* entero invasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC) y, un nuevo tipo *E. coli* adherente-invasivo (AIEC) (Jang, et al., 2017; Pakbin et al., 2021).

El nombre de toxina Shiga proviene de una toxina semejante a la producida por *Shigella dysenteriae*. STEC se transmite al hombre por consumir alimentos contaminados, como carne, leche, hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas, ocasionado calambres abdominales y diarrea, pero en un porcentaje pequeño de casos puede ocasionar el síndrome hemolítico urémico (SHU), enfermedad potencialmente mortal que produce insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica (OMS, 2018).

EPEC fue la primera en ser identificada en casos de diarrea en infantes, su factor de patogenicidad de debe a la adherencia de la bacteria a la membrana de las células del epitelio inruebainal. Se caracteriza por invadir la mucosa del inruebaino delgado principalmente en menores de dos años, se presenta como la diarrea del viajero, pero se puede convertir en un cuadro clínico grave; la principal fuente de infección son los alimentos y la contaminación fecal de agua. EAEC su fenotipo de adherencia se caracteriza, a diferencia EPEC, porque las bacterias se aglutinan en una fina película en el epitelio inruebainal, provocando brotes de diarrea persistente. La DAEC se ha asociado con casos de diarrea en niños de entre 1.5 y 5 años, infecciones del tracto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

urinario (ITU) en adultos, complicaciones durante el embarazo, y también forma parte del microbioma inpruebainal comensal tanto en adultos como en niños. La AIEC se considera uno de los principales agentes implicados en los trastornos inflamatorios idiopáticos, como la enfermedad inflamatoria inpruebainal (EII) y la enfermedad de Crohn (CD), afectando principalmente al inpruebaino delgado. No obstante, este patotipo también puede encontrarse en personas sanas como parte del microbioma inpruebainal normal, sin provocar síntomas ni enfermedad aparente (Rodríguez, 2002; Pakbin et al., 2021).

La alarmante resistencia de *E. coli* a los antibióticos se puede deber a su encuentro con antibióticos consumidos por los huéspedes, a la adquisición de genes de resistencia y a que son difíciles de erradicar debido a la formación de biopelículas (Jang, et al., 2017). Actualmente la OMS la clasificó dentro de las bacterias que necesitan nuevos antibióticos, por su resistencia a antimicrobianos carbapenémicos (Expósito, 2019).

3. Antecedentes

3.1. Generalidades de *Bougainvillea* spp.

3.1.1. Origen y distribución

Bougainvillea spp., es una planta ornamental perteneciente al género *Buganvillea* de la familia Nyctaginaceae (Saleem, et al., 2021). Fue descubierta por primera vez por el navegante francés Louis Antonio de Bougainville en el siglo XVIII en Brasil (López, 2008). La distribución de la familia Nyctaginaceae es en regiones cálidas del mundo, como el suroeste de Norteamérica. Esta familia alberga alrededor de 31 géneros y 405 especies, de las cuales México reporta 18 géneros y aproximadamente 110 especies, para el caso del estado de Aguascalientes alberga a dos tribus, seis géneros y 15 especies, en el cual no se incluye el género *Bougainvillea*, ya que son especies ornamentales introducidas a México que no han sido naturalizadas (Sandoval-Ortega, et al., 2020). Dentro del género *Bougainvillea* se encuentran tres especies de importancia hortícola *Bougainvillea spectabilis*, *B. glabra* y *B. peruviana* (Gupta, et al., 2009).

3.1.2. Descripción morfológica de *Bougainvillea* spp.

Las buganvillas son plantas trepadoras leñosas, que también pueden cultivarse como arbusto, se caracterizan por mantener presente la hoja todo el año y pueden alcanzar los 10 metros o más de altura. Presenta tallos con espinas; hojas simples, dispuestas de manera alterna, enteras, con forma ovadas a elípticas o laceoladas, presenta ápice agudo a acuminado de color verde claro, pecíolo desarrollado; sus flores son pequeñas,

tubulares, se presentan en grupos de 3, de color blanca o amarilla, se generan en gran número y florecen en primavera y verano e inclusive a principios de otoño; las flores son rodeadas por 3 brácteas muy coloridas, las cuales presentan consistencia de papel, tamaño y apariencia de hojas, la cual es confundida con la verdadera flor; su fruto es alargado de no más de 1 cm de largo (González, 2008; López, 2008; Napoleón, et al., 2013).

3.1.3. Hábitat

Las buganvillas habitan en zonas cálidas, semicálidas, semisecos, secos y templados. Crecen en condiciones donde el sol es directo, esto ayuda a su floración, se encuentran desde el nivel del mar hasta los 1110 msnm; y de los 2240 hasta los 2700 msnm, en suelos ricos, ácidos y bien drenados, pH de 5.5 a 6 son los adecuados para esta planta (Cáceres, 1996; Napoleón, et al., 2013).

3.2. *Bougainvillea glabra*

En 1850 el botánico suizo Jacques Denys Choisy identificó por primera vez a *Bougainvillea glabra*. En México *B. glabra* es conocida simplemente como buganvilia, flor de papel o Santa Rita, es un arbusto trepador de 1 a 7 m de altura, tallo grueso con ramas colgantes que presentan espinas curvas de 15 mm de largo, además presenta (tabla 6) las siguientes características morfológicas (López, 2008; Napoleón, et al., 2013; Saleem, et al., 2021):

Hojas	Simple, de borde entero, alargadas, elípticas, de color verde claro algo lustroso en el haz, residen en un pecíolo de 1 cm de largo, son glabras adaxialmente y pubescentes abaxialmente, miden 10 cm de largo aproximadamente.
Flores	0.4 cm de diámetro, bisexuales, inflorescencia cimosa de 3 flores, color blanco a crema
Brácteas	Ovadas de 5 cm de largo y 1.54 cm de ancho, se adhieren a las flores en la región terminal de la costilla media, puntas puntiagudas, de color moradas, pero también rojas, blancas, naranjas y rosadas.

Tabla 6: Características morfológicas de *B. glabra*.

3.2.1. Clasificación taxonómica de *B. glabra*

La clasificación taxonómica de *B. glabra* se presenta en la tabla 7 (Saleem, et al., 2021):

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Nyctaginaceae
Género	Bougainvillea
Especie	<i>Bougainvillea glabra</i> Choisy

Tabla 7: Clasificación taxonómica.

3.2.2. Usos tradicionales

B. glabra es una planta empleada en la medicina tradicional en tratamientos antiinflamatorios, antidiarreico, antiulceroso, antidiabético, como insecticida y antimicrobiano (Saleem, et al., 2021). En 2018, Abarca y Petricevich, describen que *B. glabra* se recomienda para tratar el asma, la bronquitis, la disentería, y en algunas ocasiones para el dolor de estómago, espinillas y puntos negros. De manera similar, Escamilla y Moreno (2015), señalan que las flores de la buganvilia morada hervidas en un litro de agua, combinadas con naranja, canela, orégano y tomillo funcionan como tratamiento para la tos. Osuna y colaboradores (2005) explican que las hojas y las flores de *B. glabra* en infusiones se emplean para combatir la diarrea y la disentería, esto junto con las hojas y el endocarpio de la granada (*Punica granatum*), las hojas de guayaba (*Psidium guajava*) y del limón (*Citrus aurantifolia*); para su efecto se necesita tomar una taza tres veces al día, durante tres o cuatro días.

3.3. Fitoquímica del género Bouganvillea

En 1970 se empezaron a estudiar los componentes químicos del género Bouganvillea, empleando extractos de diferentes órganos de la planta (Abarca y Petricevich, 2018). En la tabla 8 se muestra la fitoquímica aislada de las brácteas de *Bunganbilia glabra* y otras especies:

Principio activo	Nombre del compuesto	Parte de la planta utilizada	Especie
Alcanos, alquenos y cicloalcanos	Pentacosano Heptacosano Nonacosano 9-octilhexacosano 1-Nonadeceno 1-hexacoseno Ciclooctacosano	Bráctea con flores	<i>Bougainvillea x buttiana</i>
Ácidos grasos y alcoholes grasos	Ácido tetradecanoico Ácido hexadecanoico Ácido octadecanoico Ácido 9-octadecenoico (E) – Ácido 9,12-octadecadienoico (Z, Z) 1-triacontanol	Bráctea con flores	<i>Bougainvillea x buttiana</i>
Compuestos volátiles	Palmitato de isopropilo Ácido 9,12-octadecadienoico, éster etílico Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster etílico, (Z, Z, Z) Maleato de diisooctilo Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, éster diisooctílico 4H-Piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil 2- (fenil-piperidin-1-il-metil) - ciclohexanol	Bráctea con flores	<i>Bougainvillea x buttiana</i>
Compuestos fenólicos	Etanona, 1- (2-hidroxi-5-metilfenil) Ácido 2-propenoico, 3- (2-hidrofenil) - (E) – 2,4-di-terc-butilfenol Naftaleno, 3,4-dihidro-1,8-bis (trimetilsililoxi)	Bráctea con flores	<i>Bougainvillea x buttiana</i>

<p>Flavonoides</p>	<p>Quercetina 3- O - α -L- (ramnopiranosil) (1 \rightarrow 6) - [α -L- ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)] - β -D- galactopiranosido</p> <p>Quercetina 3- O - α -L- (4- cafeoilrhamnopiranosil) (1 \rightarrow 6) - [α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)] - β - D-galactopiranosido</p> <p>Luteolin-7- O - [2'' - O - (5''' - O - feruloil) - β -D- apiofuranosil] - β -D- glucopiranosido</p>	<p>Bráctea</p>	<p><i>Bougainvillea glabra</i></p>
<p>Fitosterol, terpenos y carbohidratos</p>	<p>Condriilasterol Estigmasta-5,22-dien-3-ol Stigmast-7-en-3-ol, (3 β, 5 α) Escualeno α- tocoferol 3-O-Metil-D-glucosa</p>	<p>Brácteas con flores</p>	<p><i>Bougainvillea x buttiana</i></p>
	<p>Momordin IIc</p>	<p>Brácteas</p>	<p><i>Bougainvillea glabra</i></p>
<p>Betalainas</p>	<p>15S-Betanidin 6- O - β glucósido 6'' - O-Rhamnosil-buganvilina-V Bougainvillein-V 15S-betanidina 6- O (6' - O -E- cafeoil) - β -soforósido 15S-betanidina 6- O (6'' - O -E-4- cumaroílo) - β - sulfósido 15S-Betanidina 6- O (6' - O -E-4- cumaroílo) - β -soforósido 15S-betanidina 6- O'' - O - β - esforosil [(6' - O -E-cafeoil) - (6'' - O -E-4-coumaroil) - β - soforoside{2}]</p>	<p>Brácteas</p>	<p><i>Bougainvillea glabra</i></p>

<p>15S-Betanidina 6- O - ' ' - O - β - glucosil) [6'- O -E-caffeoyl) - (6 ' ' - O -E-4-cumaroyl) - β - sophoroside{2}}</p> <p>15S-betanidina 6- O - [2 ' ' - O - β - glucosil) (6 ' , 6 ' ' - di-4-cumaroil)] - β -soforósido</p> <p>15S-betanidina 6- O (6 ' , 6 ' ' - di- O -E-4-cumaroilo) - β -soforósido</p> <p>Betanidin-6-O - [(2 ' ' - O-beta-soforosil) - (6'-O-trans-feruloil-6 ' ' - O-trans-cumaroil)] - beta-soforosido</p> <p>Betanidin-6-O- (6'-O-trans-4-cumaroil) - β -soforósido</p> <p>Betanidin-6-O - [(2 ' ' - O- β -esforosil) - (6 ' , 6 ' ' - di-O-trans-cumaroil)] - β -soforoside</p> <p>Betanidin-6-O - [(2 ' ' - O- β -glucosil) - (6'-O-trans-cafeoil-6 ' ' - O- trans-cumaroil)] - β -soforósido</p> <p>Betanidin-6-O - [(2 ' ' - O- β -glucosil) - (6'-O-trans-cumaroil-6 ' ' - O-trans-feruloil)] - β- soforósido</p> <p>Betanidin-6-O - [(2-O- β -glucosil) - (6 ' , 6 ' ' - di-O-trans-cumaroil)] - β -soforósido</p>		
---	--	--

Tabla 8: Fitoquímica aislada de las brácteas de buganvilia (Abarca y Petricevich, 2018; Saleem, et al., 2021).

3.4. Estudios antimicrobianos con extractos de *B. glabra*

En la tabla 9 se muestran resultados obtenidos de la efectividad de extractos de *B. glabra* como antimicrobiano:

Parte de la planta	Principio activo	Propiedad	Actividad antimicrobiana	Método	Referencia
Bráctea de <i>B. glabra</i>	Betacianina (pigmento)	Antioxidante Anticancerígeno Antibacteriano Antiinflamatorio Colorante	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>	Nitrógeno líquido Extracto de metanol	(Napoleón, et al., 2013).
Hojas de <i>B. glabra</i> Choysé	Análisis fitoquímico (alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides)	Antidiarreico Antiulceroso Antimicrobiano	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus vulgaris</i>	Extracto acuoso, etanólico, acetónico con Soxhlet	(Edwin, et al., 2007).
Hojas, tallos, flores, raíces de <i>B. glabra</i> de planta madura	Análisis fitoquímico (alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, azúcar reductor, terpenoides, antraquinonas, glucósidos cardíacos)	Antimicrobiano	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Extracto etanólico con evaporador rotatorio	Perales y Leysa, 2012
Hoja de <i>B. glabra</i> 'Snow White' y <i>B. glabra</i> Choicy	Alcaloides, glucósidos, flavonoides, taninos, esteroides, proteínas y saponinas.	Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>M. luteus</i> <i>E. coli</i> <i>S. typhii</i> <i>Klebsiella P. vulgaris</i> <i>V. cholerae</i>	Extracto hidroalcohólico con Soxhlet. Método de difusión en disco	Gupta, et al., 2009

Hoja y flor de <i>B. glabra</i>		Antimicrobiano	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	infusiones de hojas y flores con solvente alcohol etílico (96%)	Cardona, et al., 2017
Parte aérea de <i>B. glabra</i>		Antimicrobiano	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> <i>S. agalactiae</i>	Maceración etanol	Enciso, et al., 2012
Parte aérea de <i>B. glabra</i>		Antifúngico	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i>	Mezcla etanol:agua (90:10)	(Alanís, et al., 2007)

Tabla 9: Estudios sobre el efecto antimicrobiano de *B. glabra*.

4. Hipótesis

Los extractos de las brácteas de buganvilia (*Bougainvillea glabra*) presentan acción sobre el crecimiento y la formación de biopelículas microbianas.

5. Justificación

Las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos representan uno de los principales desafíos para la salud pública a nivel mundial, siendo responsables de una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Este problema se ha agravado por la resistencia microbiana a los antibióticos comerciales, debido a su uso indiscriminado. Además, el aumento de la población ocasiona una demanda creciente de medicamentos, dificultando su distribución y elevando sus costos (Napoleón, et al., 2013; Edwin, et al., 2007; Perales y Leysa, 2012). Un factor adicional que complica el tratamiento de estas infecciones es la formación de biopelículas, las cuales actúan como una barrera

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

protectora, permitiendo a los microorganismos resistir concentraciones de antimicrobianos hasta mil veces superiores a las requeridas para eliminar su forma planctónica (Hathroubi et al., 2016; Silva et al., 2023; Asma et al., 2022).

Dada la creciente problemática que representa la resistencia antimicrobiana, se ha recurrido al estudio científico de la extracción con plantas medicinales como fuente de nuevos agentes terapéuticos más seguros y económicos (Elisha, et al., 2017). Entre estas plantas destaca la *Bougainvillea glabra*, planta ornamental ampliamente distribuida en las regiones cálidas del mundo, que tradicionalmente ha sido empleada por sus propiedades antibacterianas (Saleem, et al., 2021). El interés en esta planta radica especialmente en el involucro (brácteas y las flores) de *B. glabra*, ya que diversos estudios han identificado la presencia de fitoquímicos como betacianinas, fenoles, alcaloides, taninos, saponinas, entre otros posibles responsables de su actividad antimicrobiana (Napoleón, et al., 2013; Jaramillo, et al., 2021).

6. Objetivo

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los extractos de las brácteas de la buganvilia (*Bougainvillea glabra*) sobre el crecimiento microbiano y en biopelículas.

6.2. Objetivos específicos

- Obtener los principios activos de las brácteas de buganvilia por medio de tres técnicas de extracción (Soxhlet, sonicación, maceración) y diferentes solventes (agua, metanol, etanol, acetona)
- Evaluar la actividad antioxidante de los diferentes extractos.
- Identificar el perfil fitoquímico de los extractos con mayor actividad.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula in vitro de los extractos.

7. Metodología

7.1. Diagrama experimental

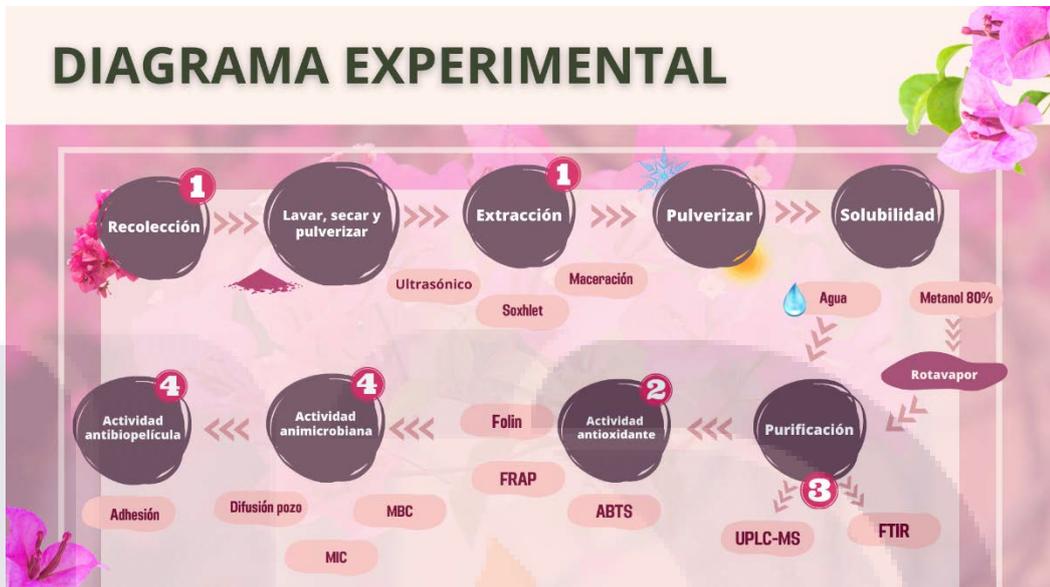


Figura 9: Diagrama experimental.

7.2. Recolección de *B. glabra*

Se recolectaron manualmente brácteas color magenta de una planta sana y madura de *Bougainvillea glabra*, del Centro Ecológico “Los Cuartos”, ubicado a una latitud de 21° 59.101' N, y una longitud de -102° 19.88' W, en Jesús María, Aguascalientes. En el laboratorio, se procedió a retirar la flor para obtener solo las brácteas (figura 11), se lavaron con agua de grifo y posteriormente con agua destilada para eliminar polvo o alguna suciedad. Se secaron durante 48 horas a 40°C en estufa universal, y se pulverizaron las muestras con ayuda de un procesador de alimentos. Finalmente se almacenaron en un recipiente hermético, sin exposición a la luz (Robles, et al., 2017; Oluwaseun, 2018).

Flor

Bráctea

Figura 10: Flor y bráctea de buganvilia.

7.3. Extracción con Soxhlet

Se colocaron 5 g de brácteas pulverizadas en la cámara de extracción de Soxhlet, junto con 100 ml de disolvente (agua, metanol, etanol y acetona) en un matraz balón. La parrilla se mantuvo a temperatura de ebullición de cada solvente. Los principios activos de la buganvilla se extrajeron durante 6 horas. Al término de la extracción se conservaron en un recipiente sin exposición a la luz para evitar alteraciones de los metabolitos y se almacenaron a 4° C hasta su uso (Dhankhar, 2013; Gómez, et al., 2016; Borges, et al., 2020).

7.4. Extracción por maceración

Se pesaron 5 g de brácteas pulverizadas para su maceración y se mezclaron con 100 ml del disolvente metanol, etanol, acetona y agua en un frasco sin exposición a la luz y cubierto herméticamente con tapa de polietileno para evitar la evaporación del disolvente (Kumar, et al., 2013). Se mantuvieron los extractos en agitación periódica a 4°C, 23°C y 37°C (Román, et al., 2014) durante 2 meses, sin exposición a la luz (Cardona, et al., 2017). Pasado el tiempo, se centrifugó a 2 880×g durante 5 minutos; se filtraron a través de un filtro de nylon de 0,45 µm, y se almacenaron a 4°C hasta su empleo (Gómez, et al., 2016; Robles, et al., 2017).

7.5. Extracción por sonicación

Se pesó 1g de brácteas pulverizadas y se mezclaron con 90 ml del disolvente (metanol, etanol, acetona y agua). La muestra colocó en un baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5,7 L, Fischer Scientific) a temperatura de 40°C y 40 kHz, durante 1 hora (Borges, et al., 2020). Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm, durante 15 minutos (Shahinuzzaman, et al., 2021), se filtraron y almacenaron a 4°C sin exposición a la luz (Jaramillo, et al., 2021; Wagdy, et al., 2016; Linares, et al., 2018).

7.6. Pulverizado de los extractos

La eliminación del solvente y obtención del polvo de los extractos se realizó evaporando el solvente en una parrilla a 50°C (Bautista-Hernández et al., 2021).

7.7. Prueba de solubilidad

Para determinar una de las propiedades fisicoquímicas clave de las sustancias (Birch et al., 2019) se pesó 1 mg de muestra en polvo y se añadió 1 ml de metanol al 80% o 1 ml de agua. Posteriormente las muestras se llevaron a baño de ultrasonido.

7.8. Purificación de compuestos polifenólicos

La obtención de polifenoles se realizó empleando como fase estacionaria Amberlita XAD-16N empaquetada en una columna cromatográfica (figura 12) y como fase móvil etanol. El extracto se agregó a la fase estacionaria y como eluyente se empleó agua bidestilada para descartar compuestos co-extraídos. Posteriormente, se adicionó etanol absoluto como eluyente para liberar los polifenoles retenidos en la fase estacionaria (Bautista-Hernández et al., 2021).



Figura 11: Columna cromatográfica.

7.9. Evaluación de la actividad antioxidante

Las muestras se utilizaron a 500 ppm, los análisis se realizaron por triplicado y las absorbancias se obtuvieron con espectrofotómetro lector de microplacas (BioTek, Instruments, Inc.) controlado con una interfaz de software de análisis de datos Gen5.

7.9.1. Inhibición del radical ABTS^{•+}

La inhibición del radical ABTS se evaluó siguiendo la metodología propuesta por Bautista- Hernández y colaboradores (2021). Se mezcló una solución stock de 7 mM de ABTS con Persulfato de Potasio al 2.45 mM, en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 horas antes de ser empleada. La mezcla se ajustó con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.002 nm. En la microplaca se mezclaron 5 μ l de extracto con 95 μ l de la solución ABTS, posteriormente se leyó la absorbancia a 734 nm. La capacidad de inhibición del radical se calculó con la siguiente fórmula (Cuapio et al., 2024):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia blanco} - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}} * 100$$

Los resultados se registraron como μ g de Trolox equivalente por mililitro de acuerdo con una curva de calibración preparada con el mismo estándar.

7.9.2. Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

El poder antioxidante reductor férrico se determinó siguiendo la metodología propuesta por Bautista- Hernández y colaboradores (2021), con ligeras modificaciones. 5 µl de la muestra se mezclaron con 12 µl de amortiguador de fosfatos (61,5 mL al 1 M fosfato de potasio dibásico + 38,1 mL al 1 M fosfato de potasio monobásico), se mezclaron con 22 µl de ferrocianuro de potasio y se dejó incubar durante 20 minutos a 50°C. Posteriormente se añadieron 12 µl de ácido tricloroacético, 45 µl de agua destilada y 10 µl de cloruro férrico. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 700 nm. Finalmente, los resultados se registraron como µg de ácido gálico equivalente por mililitro (EAG µg/ml) de acuerdo con una curva de calibración preparada con el mismo estándar.

7.9.3. Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

El contenido de fenoles totales se analizó mediante el método tradicional de Folin-Ciocalteu, en base a la metodología de Castro-López y colaboradores (2016) con algunas modificaciones. Se mezclaron 25 µl de extracto con 25 µl de reactivo Folin-Ciocalteu en cada pozo de la microplaca, posteriormente se agregaron 25 µl de Carbonato de Sodio y se llevaron a incubar en obscuridad durante 30 minutos a 40°C; transcurrido el tiempo se añadieron 200 µl de agua destilada y se registró la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm. Los resultados se registraron como µg de ácido gálico equivalente por mililitro, de acuerdo con una curva de calibración preparada con el mismo estándar.

7.10. Rendimiento

Para determinar el rendimiento del extracto, el disolvente del extracto se eliminó mediante calentamiento controlado a 50 °C en una mufla hasta obtener un residuo seco (Fletes-Vargas et al., 2023). El rendimiento se cuantificó utilizando la fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto seco}}{\text{peso inicial del material vegetal pulverizado}}$$

7.11. Espectrofotómetros de transformada de Fourier (FTIR)

El estudio se realizó mediante FTIR (Agilent Technologies,USA), siguiendo la metodología de Bautista- Hernández (2021), con ciertas modificaciones. En la superficie del lector se depositaron los extractos. La lectura se realizó en el rango espectral de 4000 a 600 cm⁻¹, con un ciclo de 32 escaneos con una resolución de 4 cm⁻¹. El análisis del espectro y de los grupos funcionales detectados se realizó mediante tablas de

asignación de bandas de diferente bibliografía y la gráfica se construyó con el programa GraphPAD 8.

7.12. Sólidos Totales

Para determinar los sólidos totales se siguió la metodología propuesta por Ochoa Pacheco y colaboradores (2013) con ligeras modificaciones. El extracto metanólico de brácteas de *B. glabra* se transfirió a una cápsula de porcelana previamente limpia, seca y con peso conocido (P0). La cápsula se colocó en un baño María hasta evaporar el extracto, dejando un residuo aparentemente seco. Luego, se trasladó a una estufa a 103 °C ± 2 °C durante una hora. Tras ese tiempo, se retiró y se dejó enfriar en una desecadora hasta alcanzar una temperatura ambiente, y se pesó nuevamente (P1). El contenido de sólidos totales (ST) se expresó en mg/ml y se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$ST = [(P1 - P0) / V] \times 1000$$

Donde: P1 es el peso de la cápsula con el extracto, P0 es el peso de la cápsula vacía, V corresponde al volumen de muestra analizado (ml), 1000 es un factor de conversión para expresar el resultado en mg/ml.

Para la determinación de sólidos totales volátiles (STV), siguiendo lo descrito por la Norma Mexicana (2015). La cápsula con el residuo seco anterior se introdujo en una mufla precalentada a 550 °C durante 15 minutos para la calcinación del material volátil. Enseguida, se transfirió la cápsula a un horno a 100°C para estabilizar la temperatura y eliminar humedad residual. Luego, se colocó en un desecador para su enfriamiento; y finalmente, se registró el peso (P2) para calcular el contenido de volátiles.

$$STV = [(P1 - P2) / V] \times 1000$$

Donde: P1 es la masa de la cápsula con el residuo, después de la evaporación, P2 es el peso de la cápsula masa de la cápsula con el residuo, después de la calcinación, V corresponde al volumen de muestra analizado (ml), 1000 es un factor de conversión para expresar el resultado en mg/ml.

Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos, analizado por triplicado.

7.13. Cuantificación de betalainas

Basado en el método descrito por Li y colaboradores (2022), adaptado con ligeras modificaciones, se cuantificó el contenido de betalainas: betacianinas y betaxantinas, del extracto metanólico de *Bougainvillea glabra*, con espectrofotometría UV-VIS. El extracto fue diluido en una proporción 1:5 con agua destilada, y la absorbancia se registró a 540 nm para las betacianinas (BC) y a 480 nm para las betaxantinas (BX),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

utilizando un espectrofotómetro UV-VIS modelo HACH DR/4000. Las lecturas se realizaron por triplicado para asegurar la precisión de los datos. La concentración de cada tipo de betalaína se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Concentración de betalaínas ((mg/L) de BC o BX)} = (A \times DF \times PM \times 1000) / (\epsilon \times L)$$

Donde: A es la absorbancia medida a 540 nm (BC) o 480 nm (BX), DF es el factor de dilución, PM representa el peso molecular (550 g/mol para las betacianinas y 308 g/mol para las betaxantinas), ϵ corresponde al coeficiente de extinción molar (60,000 L/mol·cm para BC y 48,000 L/mol·cm para BX), L es la longitud del trayecto óptico de la cubeta de 1 cm.

7.14. Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC)

Los compuestos presentes en el extracto metanólico purificado obtenido por Soxhlet, que mostraron mayor actividad biológica, fueron analizados mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC) utilizando un sistema Acquity de la marca Waters (Milford, MA, EE. UU.). Este equipo incluye un muestreador automático y una bomba binaria con un lazo de inyección parcial de 10 μ L. La separación se llevó a cabo en una columna WATERS BEH PHENYL (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m; Waxford, Irlanda), con una temperatura constante de 40 °C. La fase móvil consistió en dos solventes: (A) agua con 0.1 % de ácido fórmico y (B) acetonitrilo también con 0.1 % de ácido fórmico, empleando un flujo constante de 0.3 mL/min. La detección se realizó con un espectrómetro de masas tipo Q-ToF (Waters), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), operando en modo de ionización negativa, con sensibilidad estándar y en un rango dinámico de masas entre 50 y 1200 Da. La identificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo mediante el análisis de espectros de masas completos y sus respectivos fragmentos, contrastándolos con datos disponibles en la literatura científica y bases de datos especializadas (Aranda-Ledesma et al., 2022).

7.15. Actividad antimicrobiana

7.15.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En el presente estudio se utilizaron cepas de la American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* 23923, *S. epidermidis* 12228, *E. coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 y *Acinetobacter baumannii* BAA-747. Las cepas se cultivaron en agar de infusión cerebro-corazón (BHI) (BD Bioxon, Estado de México, México) a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, se inocularon colonias en caldo BHI y se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

7.15.2. Difusión en pozo

Para demostrar que la actividad antimicrobiana de los extractos de metanol no se debe a la presencia del solvente, los extractos de Soxhlet de metanol y maceración con metanol a 23° y 37° C se re-suspendieron al 80%, posteriormente el solvente de metanol se evaporó a 50°C y se recuperó la porción de agua, la cual se filtró en esterilidad y se conservaron a 4°C.

Para determinar la susceptibilidad de diferentes cepas bacterianas Gram positivas (*S. aureus* y *S. epidermidis*) y Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) ante el extracto de *B. glabra* se empleó el método modificado de difusión por pozo. Las bacterias se inocularon en medio BHI durante 24 horas; transcurrido el tiempo se empleó el método directo para la preparación del inóculo, donde se seleccionaron colonias aisladas y se suspendieron en solución salina al 0.85%, la turbidez se ajustó al 0.5 de la escala de McFarland, equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml, para ello la densidad de la turbidez se midió con un espectrofotómetro con una longitud de onda de 625 nm y una absorbancia de 0.08-0.100 nm (EUCAST, 2022; CLSI, 2023).

Posteriormente, se agregó un inóculo de la suspensión bacteriana previamente ajustada a 30 ml de agar Muller-Hinton, se homogenizó y se esperó a que solidificara (Torres, 2014). A continuación, se perforó el medio de cultivo para obtener pozos de 6 mm de diámetro, donde se agregaron tres diferentes concentraciones (57 mg/ml, 28.5 mg/ml, 5.7 mg/ml) de los extractos Soxhlet metanol y agua, maceración con metanol a 23° y 37° C. También se contaba con un pozo como control positivo con el antibiótico gentamicina a 0.1 mg/ml (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) y 0.05 mg/ml (*E. coli*); y un control negativo con agua destilada estéril (CLSI, 2023). Las cajas se dejaron reposar por 30 minutos para que el extracto se difundiera y se incubaron a 37°C por 24 horas (Patel et al., 2022). Finalmente, después de la incubación se midió la zona de inhibición en milímetro (mm). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada extracto y cada bacteria.

7.15.3. Concentración Mínima Inhibidora (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC)

Para determinar la concentración más baja (MIC) del extracto de bráctea necesaria para evitar el crecimiento visible de un microorganismo, se empleó el método por microdilución en caldo en microplacas de 96 pozos. Primeramente, se agregó la concentración más alta del extracto, y se realizaron diluciones seriadas en caldo Müller-Hinton con concentraciones que oscilaban entre 5.7 mg/ml hasta 28.5 mg/ml, enseguida se inocularon con el microorganismo prueba, de un cultivo de 24 h en caldo ajustado a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una escala de 0.5 McFarland. La placa contaba con pozos que servían como control de esterilidad de cada concentración del extracto, así como de medio de cultivo; un control negativo con el solvente agua; un control de crecimiento del microorganismo y un control positivo con el antibiótico gentamicina a 0.1 mg/ml. Posterior a la incubación por 24 horas, el crecimiento se registró por absorbancia a 595 nm con el lector de microplacas. Además, para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) la cual determina una eliminación $\geq 99.9\%$ del inóculo; se subcultivaron 5 μl de los pocillos que no mostraban crecimiento aparente en agar Muller-Hinton (Güllüce et al., 2007; Lagha et al., 2019; CLSI, 2023). Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes que se analizaron por triplicado.

7.16. Actividad anti-adherencia de biopelículas

7.16.1. Porcentaje de inhibición de biopelículas

Los microorganismos se sembraron en placa durante 24 horas a 37°C en medio BHI (*A. baumannii* medio LB). Transcurrido el tiempo se tomaron colonias distintas de la cepa, y se colocaron en caldo, se dejaron crecer a 45° de inclinación a 37°C toda la noche con una agitación de 120 rpm. Los cultivos se diluyeron en 1:100 con glicerol (0,8%), y para *A. baumannii* se empleó dextrosa al 20%. Se añadió en una placa de microtitulación estéril de 96 pozos (Costar® 3599, Corning, NY, EE. UU.) concentraciones seriadas del extracto que oscilaban entre 1.1 mg/ml hasta 28.5 mg/ml, enseguida de la suspensión bacteriana. Se incluyó un control de esterilidad para cada concentración del extracto y para el medio de cultivo; un control negativo con solvente agua; un control de formación de biopelícula; y un control positivo con gentamicina a una concentración de 0.1 mg/ml. Después de la incubación a 37 °C por 24 horas, se retiraron los cultivos y se procedió a lavar la placa con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con el fin de eliminar las células no adheridas. Posteriormente, las placas se dejaron secar. Las células que permanecieron adheridas fueron teñidas con 100 μL de cristal violeta al 0.1 % durante quince minutos y el exceso de colorante se eliminó mediante un enjuague con PBS. Finalmente, para cuantificar la biopelícula formada, se añadió ácido acético al 30% y la absorbancia de cada pozo se determinó a una longitud de onda de 595 nm (densidad óptica OD) utilizando un lector de microplacas (Bio-Rad Benchmark Microplate Reader) (Ramírez, et al., 2018; Saeloh & Visutthi, 2021; Hernández, et al., 2022).

El porcentaje de inhibición de la biopelícula se determinó a partir de la siguiente fórmula (Vajrabhaya et al., 2022):

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Absorbancia control formación de biopelícula} - \text{Absorbancia Extracto}}{\text{Absorbancia control formación de biopelícula}} * 100$$

Los resultados se expresan como el promedio de tres experimentos independientes que se analizaron por triplicado.

7.16.2. Evaluación anti-adherencia de biopelículas mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM)

La formación de biopelículas se llevó a cabo siguiendo metodologías previamente descritas (Loera-Muro et al., 2013; Ramírez, et al., 2018), con algunas modificaciones. Para el control, se generó una biopelícula sobre un portaobjetos de vidrio estéril colocado dentro de una placa de Petri, añadiendo 2 mL de un cultivo bacteriano de 24 horas y 18 mL de medio BHI. Con el fin de evaluar el efecto antiadherente del extracto de *Bougainvillea glabra*, se incorporó al cultivo una concentración de 11.4 mg/ml del extracto, y fue incubado durante 24 horas a 37 °C.

Tras la incubación, la biopelícula se fijó con un flameado suave del portaobjetos. La matriz extracelular se marcó con FilmTracer™ FM 1-43 (Invitrogen, EE. UU.) durante 30 minutos. Luego, los portaobjetos fueron lavados con agua destilada y montados con el reactivo antidecoloración ProLong™ Gold (Invitrogen, Eugene, OR).

La formación de biopelículas y el efecto antiadherente del extracto fueron analizados mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM; LSM 700, ZEISS; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemania), y las imágenes se capturaron utilizando el software Zen Black 2012 (versión Black Edition, ZEISS).

7.17. Ensayo de citotoxicidad por tinción de fluorescencia de las células NPTr

Para determinar la citotoxicidad del extracto metanólico de *B. glabra* se determinó la integridad celular a través del marcaje inmunofluorescente del núcleo y el citoesqueleto de actina de células de tráquea de cerdo recién nacido (NPTr), siguiendo la metodología descrita de Plasencia-Muñoz y colaboradores (2020), con algunas modificaciones. Las células NPTr se sembraron en portaobjetos con medio Eagle modificado de Dulbecco, bajo en glucosa (DMEM) (Gibco, BRL, Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Gibco, BRL, Grand Island, NY), 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfotericina a 37 °C en un ambiente humidificado con 5 % de CO₂ y 95 % de aire. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se realizaron dos lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X, y se añadió una concentración de 5.7 mg/ml de extracto.

Tras 24 horas de incubación a 37 °C, se retiró el extracto, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después la membrana de las células endoteliales fue permeabilizada con

Triton X-100 al 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de dos lavados con PBS. Posteriormente, las células se bloquearon con BSA al 1% en PBS. Luego, se realizaron dos lavados con PBS y el citoesqueleto de actina fue marcado utilizando faloidina Alexa Fluor 488 [1:200] (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EE. UU.) durante 30 minutos a 37 °C. Tras la incubación, las células se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS y los núcleos se marcaron con Hoetch (2 µM) durante 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces y, finalmente, las células se montaron con Prolong Gold.

7.18. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPAD, versión 8, donde se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA), para determinar la existencia de diferencias entre múltiples variables ($P < 0.05$). Posteriormente se realizó la Prueba de Tukey, para determinar la diferencia de medias.

De igual forma para las diferencias significativas entre medias se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). Todos los experimentos se realizaron de forma independiente por triplicado.

Además, se empleó la prueba T-Student para determinar las diferencias entre medias de la misma variable en diferente tipo de extracto.

8. Resultados

8.1. Prueba de solubilidad

Las únicas muestras que resultaron ser solubles en agua fueron Soxhlet y sonicación 40° con solvente agua (tabla 10), mientras que los solventes de metanol, etanol y acetona fueron solubles en metanol.

Muestras solubles en metanol	Muestras solubles en Agua
Soxhlet metanol	Sonicación agua 40°
Soxhlet etanol	Soxhlet agua
Soxhlet acetona	
Sonicación metanol	
Sonicación etanol	
Sonicación acetona	
Maceración metanol 4°C	
Maceración metanol 23°C	

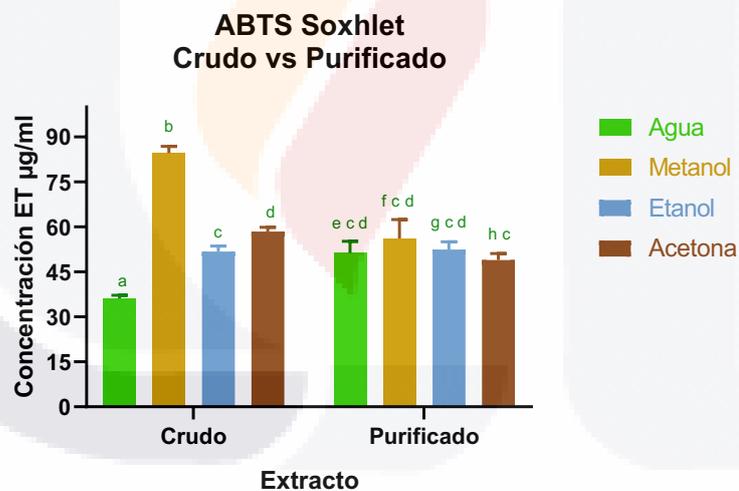
Tabla 10: Prueba de solubilidad realizada en los diferentes extractos para su posterior purificación.

8.2. Evaluación de actividad antioxidante

8.2.1. Inhibición del radical ABTS^{•+}

8.2.1.1. Soxhlet crudo vs purificado

La comparación entre el extracto Soxhlet crudo y purificado de las brácteas de la buganvilia demuestra que el extracto crudo de metanol presentó la mayor capacidad de secuestro del radical ABTS con un valor de 84.64 ET µg/ml, seguido del solvente acetona (58.43 ET µg/ml), el etanol (51.76 ET µg/ml) y por último el agua (36.13 ET µg/ml). Mientras que los extractos purificados de agua (51.28 ET µg/ml), metanol (56.16 ET µg/ml), etanol (52.48 ET µg/ml) y acetona (48.96 ET µg/ml), presentan mostraron una capacidad antioxidante más homogénea, con valores similares a los observados en los extractos crudos de etanol y acetona.

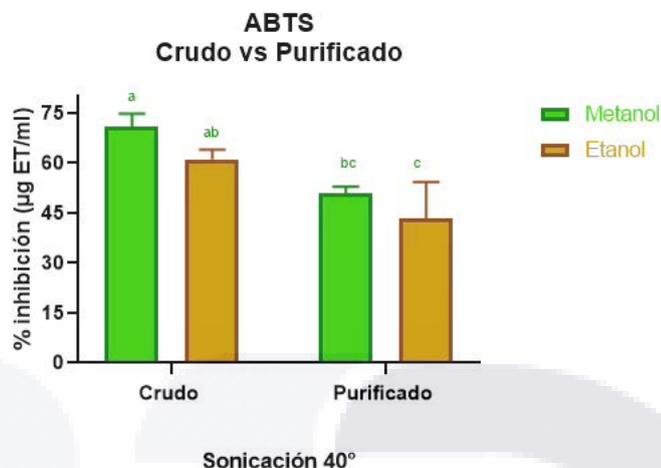


Gráfica 1. Comparación de la capacidad ABTS entre extracto crudo y purificado extraído mediante Soxhlet con solventes de diferentes polaridades. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-h) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías, seguido del Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.2.1.2. Sonicación crudo vs purificado

El extracto crudo obtenido por sonicación a 40°C comparado con el purificado muestra una ventaja en la capacidad de captación del radical libre ABTS, destacando el extracto crudo de metanol (72.22 ET µg/ml). En comparación, los extractos crudos de etanol (62.

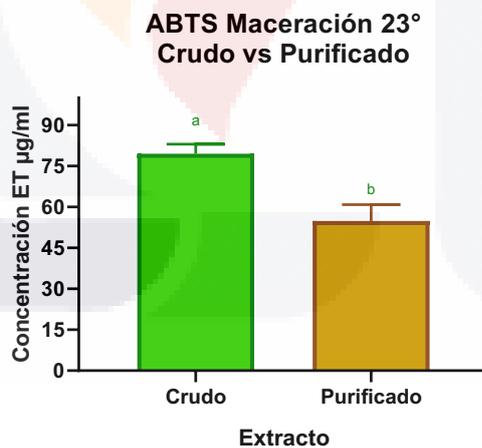
ET $\mu\text{g/ml}$), metanol purificado (52.46 ET $\mu\text{g/ml}$) y etanol purificado (44.86 ET $\mu\text{g/ml}$) presentaron capacidades antioxidantes similares y menores al metanol crudo.



Gráfica 2: Actividad de ABTS entre extracto crudo y purificado extraído mediante sonicación con metanol y etanol. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías y Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.2.1.3. Maceración crudo vs purificado

La analogía de la capacidad de secuestrar del radical libre ABTS entre el extracto crudo y purificado obtenido con metanol a 23°C , demuestra que el extracto crudo tiene una mayor capacidad con 79.58 ET $\mu\text{g/ml}$, a diferencia del purificado con 54.87 ET $\mu\text{g/ml}$.

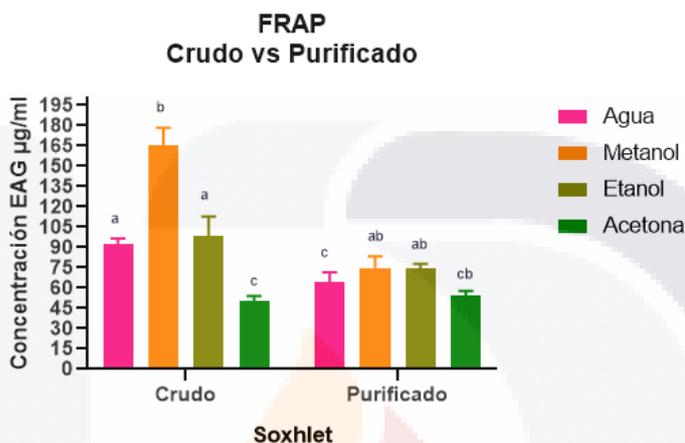


Gráfica 3: Comparación de la actividad antioxidante por ABTS entre el extracto por maceración a 23°C crudo y purificado. Al evaluar la misma variable en diferente tipo de extracto, diferente literal (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba T de Student).

8.2.2. Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

8.2.2.1. Soxhlet crudo vs purificado

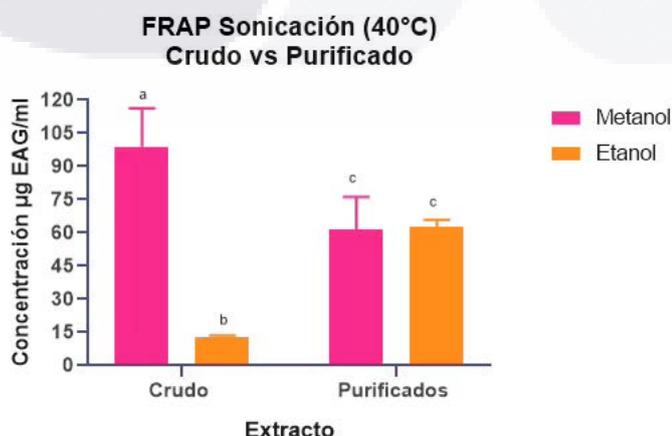
La comparación entre la actividad de FRAP entre extractos crudos y purificados obtenidos mediante Soxhlet, demuestra que el extracto crudo de metanol (165.57 EAG µg/ml) muestra la mayor concentración, respecto al resto de los solventes tanto crudos como purificados.



Gráfica 4: Analogía de la actividad de FRAP entre los extractos de Soxhlet crudos y purificados. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías y Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.2.2.2. Sonicación de extracto crudo vs purificado

La comparación del extracto de crudo y purificado mediante sonicación a 40°C, demuestra que existe una diferencia significativa entre ambos extractos (gráfica 5). Siendo el extracto de metanol crudo el que presenta mayor poder reductor con 98.99 EAG µg/ml, mientras que el extracto purificado obtuvo 61.54 EAG µg/ml.

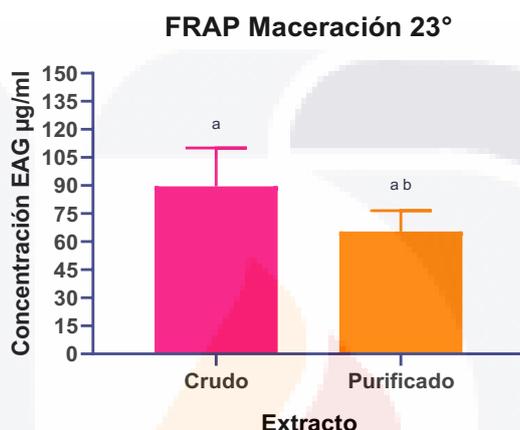


Gráfica 5: Efecto de FRAP entre el extracto de sonicación a 40°C crudo y purificado. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente

literales (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías y Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.2.2.3. Maceración del extracto crudo vs purificado

Se realizó una comparación para valorar si existía una diferencia del poder antioxidante reductor férrico (FRAP) del extracto de maceración con metanol a 23° crudo (89.6 EAG $\mu\text{g/ml}$) y purificado (65.4 EAG $\mu\text{g/ml}$), observando que ambos extractos presentan la misma actividad (gráfica 6).

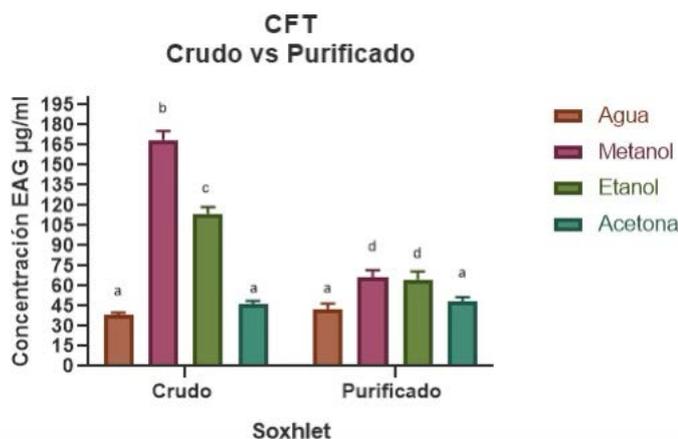


Gráfica 6: Evaluación de FRAP entre el extracto de maceración (23°C) crudo y purificado. Al evaluar la misma variable en diferente tipo de extracto, (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba T de Student).

8.2.3. Compuestos Fenólicos Totales (CFT)

8.2.3.1. Soxhlet crudo vs purificado

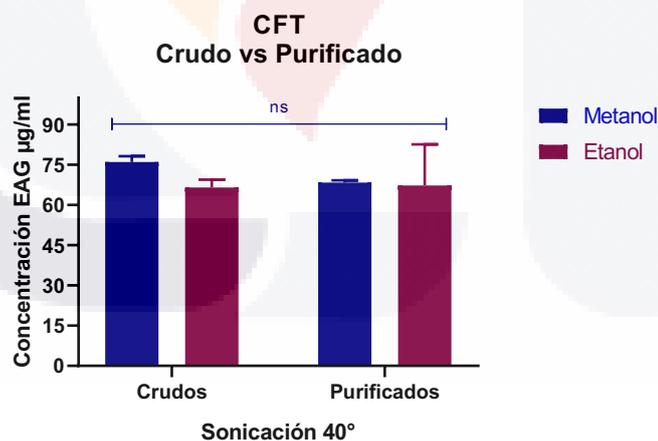
Contenido fenólico total comparativo del extracto crudo y purificado obtenido mediante la técnica Soxhlet con diferentes solventes. La gráfica 7 demuestra que el extracto crudo de metanol presenta la mayor concentración (168.98 EAG $\mu\text{g/ml}$), seguido de etanol crudo (113.95 EAG $\mu\text{g/ml}$). Mientras que el extracto de agua crudo (38.04 EAG $\mu\text{g/ml}$) y de acetona crudo (46.50 EAG $\mu\text{g/ml}$) obtuvieron valores similares a los extractos purificados.



Gráfica 7: Comparación de la cantidad de fenoles totales entre extractos crudo y purificado extraído mediante Soxhlet con solventes de diferentes polaridades. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), diferente literal (a-d) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías, seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.2.3.2. Sonicación de extracto crudo vs purificado

El análisis del contenido de fenoles totales entre el extracto crudo y purificado obtenido mediante sonicación a 40°C demuestra que no existe diferencia estadística entre solventes y extracto. El extracto crudo de metanol obtuvo una concentración de 76.06 EAG µg/ml y el purificado de 68.37 EAG µg/ml, mientras que el etanol crudo fue de 66.53 EAG µg/ml y el purificado de EAG 67.29 µg/ml.

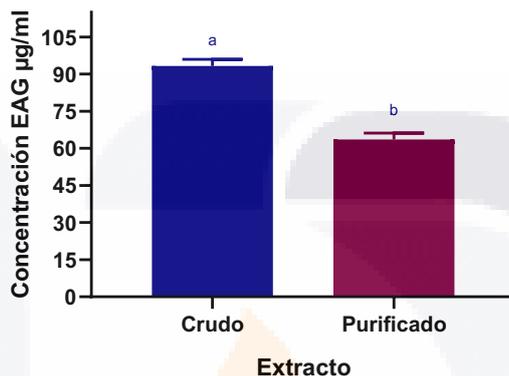


Gráfica 8: Cantidad de fenoles totales comparado entre extracto crudo y purificado extraído mediante sonicación a 40°C. Al evaluar la misma variable con dos fuentes de variación (crudo y purificado), "ns" indica que no hay diferencia estadística ($P < 0.05$), calculado con ANOVA de dos vías para promedio \pm DS ($n=3$), seguido de un Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.2.3.3. Maceración de extracto crudo vs purificado

El análisis entre la cantidad de compuestos fenólicos totales entre el extracto crudo y purificado obtenido mediante maceración con metanol a 23°C difiere; siendo el extracto crudo el de mayor concentración con 106.97 EAG µg/ml, mientras que el extracto purificado solo obtuvo una cantidad de fenoles de 63.58 EAG µg/ml.

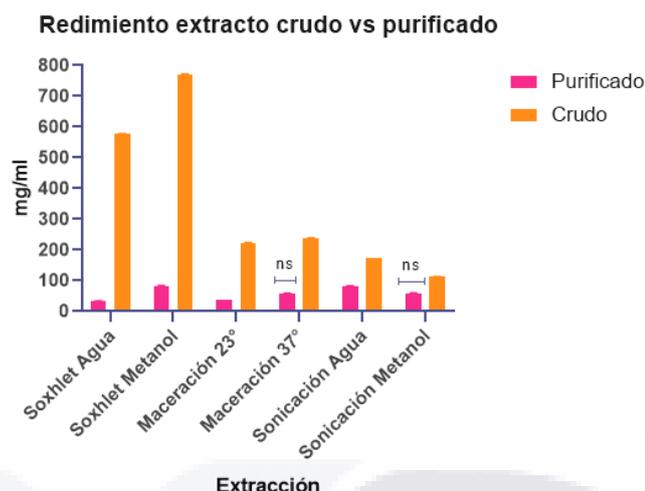
CFT Maceración 23°



Gráfica 9: Comparación del contenido de compuestos fenólicos totales entre el extracto por maceración a 23°C crudo y purificado. Al evaluar la misma variable en diferente tipo de extracto, (a-b) indican diferencia estadística ($P < 0.05$) (Prueba T de Student).

8.3. Rendimiento de extracto crudo vs purificado

El mejor rendimiento de extracto de brácteas de *B. glabra* tanto en su forma cruda como purificada (gráfica 1), se obtuvo mediante la técnica de Soxhlet empleando metanol como solvente. En general, los extractos crudos presentaron un rendimiento superior en comparación con los extractos purificados. El extracto crudo obtenido con Soxhlet metanol fue el de mayor rendimiento, con un valor de 770.5 mg/ml, seguido del extracto Soxhlet agua con 576.5 mg/ml. Por otro lado, la técnica de sonicación fue la que presentó el menor rendimiento de extracción entre los métodos evaluados.



Gráfica 10: Comparación del rendimiento de extractos crudos y purificados. Al evaluar la misma variable con dos factores (crudo y purificado), “ns” indica que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$), mediante ANOVA de dos vías seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey’s.

8.4. Espectrofotómetro de transformada de Fourier (FTIR)

8.4.1. FTIR extractos purificados

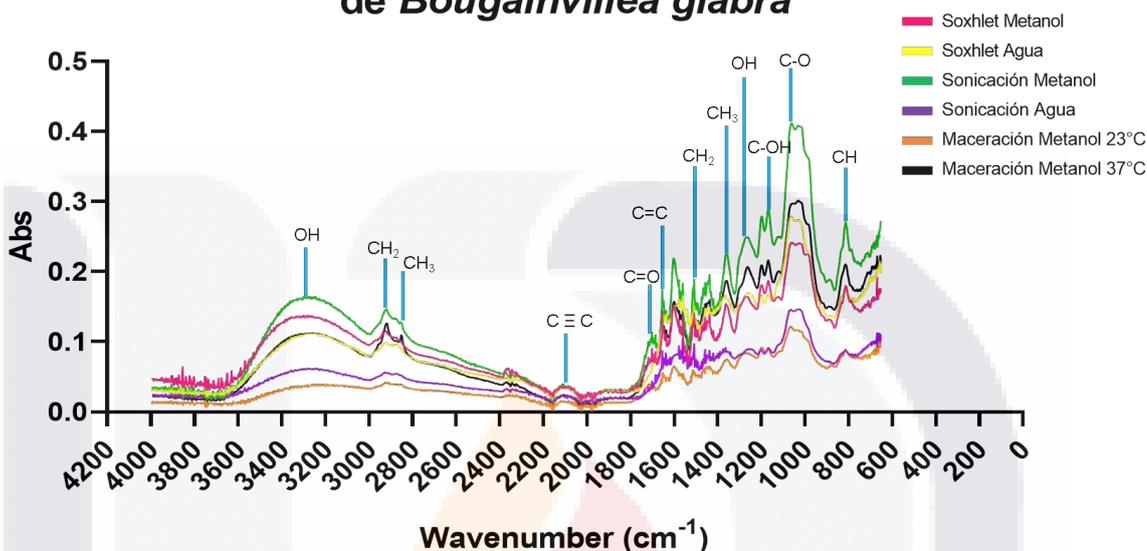
En la gráfica 11 se pueden observar los espectros FTIR de los extractos purificados que presentaron mejor actividad antioxidante: Soxhlet metanol y agua, sonicación a 40°C de metanol y agua; así como maceración a 23°C y 37°C. La banda en forma de lengua ancha que abarca de los 3000 a las 3500 cm^{-1} aproximadamente corresponde a la vibración de estiramiento del grupo OH; este grupo funcional (hidroxilo) es característico de compuestos alcohólicos, aromáticos, alifáticos y fenólicos hidrogenados; además este grupo está presente en los extractos que fueron extraídos con metanol. En la región de aproximadamente 1200 cm^{-1} encontraríamos una vibración de flexión del OH, que podría corresponder a la deformación de polifenoles, mientras que en la zona de 1150 cm^{-1} podría corresponder al grupo C-O-H de los alcoholes (Bautista-Hernández et al., 2021; Oliveira, et al., 2016).

En la región de 2850 a 2920 cm^{-1} observamos la vibración de estiramiento C-H, la cual presenta una elongación, la cual no deja apreciar la presencia total del metileno (CH_2) y metilo (CH_3), característico de compuestos aromáticos (Bautista-Hernández et al., 2021); la flexión de estos los encontramos en 1410 y 1390 cm^{-1} aproximadamente.

En la región de los 2100 cm^{-1} observamos un enlace $\text{C}\equiv\text{C}$, el cual puede demostrar la presencia de un alquino o la resonancia de los aromáticos (Kumar, 2013; Pickering, 1980).

En la región de 1700 y 1610 cm^{-1} aproximadamente, podemos encontrar $\text{C}=\text{O}$, correspondiente a vibración de estiramiento de grupo carboxilo, de flavonoides y lípidos (Oliveira, et al., 2016). Aunque según Bautista, et al., 2021, podía corresponder al grupo N-H de los anillos aromáticos de amidas o aminas aromáticas.

Análisis FTIR de extractos purificados de *Bougainvillea glabra*

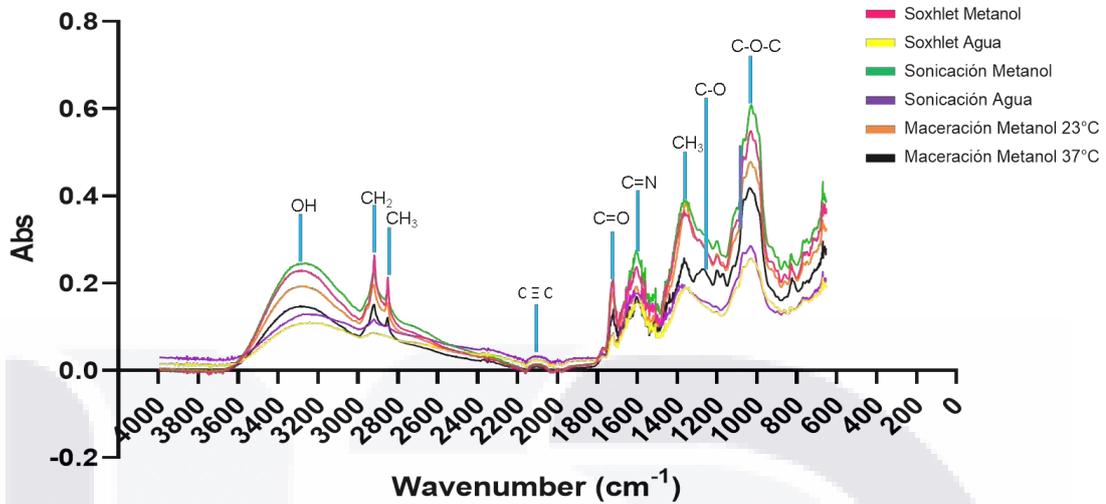


Gráfica 11: Espectros FTIR de los extractos purificados de brácteas de buganvilia por medio de diferentes técnicas de extracción y solventes: Soxhlet (metanol y agua), sonicación 40°C (metanol y agua) y maceración 23°C y 37° (metanol).

8.4.2. FTIR extractos crudos

Los grupos funcionales que podemos encontrar en los extractos crudos de *B. glabra* se representan en la gráfica 12. Donde se observan vibraciones de estiramiento correspondiente a $\text{C}=\text{O}$ en la región de $1716\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$, las cuales pertenecen al grupo carbonilo de las estructuras cetónicas (Barkociová, et al., 2021). En la región cercana a 2148 cm^{-1} se aprecia una vibración de estiramiento correspondiente a $\text{C}\equiv\text{C}$, característico de los alquinos (Kumar, et al., 2013; Liu, 2021). Cerca de los 1624 cm^{-1} se encuentra la región característica de la vibración de estiramiento de $\text{C}=\text{N}$, correspondiente al grupo funcional de la imina (Devadiga y Ahipa, 2020; Barkociová, et al., 2021). En la región de $2850\text{ a }2950\text{ cm}^{-1}$ observamos la vibración de estiramiento C-H , correspondiente a los alcanos, además se distingue al metileno (CH_2) y metilo (CH_3), mientras que a los 1378 cm^{-1} corresponde a la flexión de C-H (Devadiga y Ahipa, 2020; Liu, 2021). Mientras el ácido carboxílico se presenta en la región de $1255\text{-}1259\text{ cm}^{-1}$ que representa la vibración del C-O (Barkociová, et al., 2021). Finalmente, en la región de 1073 cm^{-1} pertenece al estiramiento simétrico de C-O-C (Devadiga y Ahipa, 2020).

Análisis FTIR de extractos crudos de *Bougainvillea glabra*



Gráfica 12: Espectros FTIR de los extractos crudos de brácteas de buganvilla por medio de diferentes técnicas de extracción Soxhlet de metanol y agua, sonicación 40°C de metanol y agua; así como maceración metanol 23°C y 37°C.

8.5. Sólidos Totales y Cuantificación de betalaínas

El contenido de sólidos totales y la cuantificación de betalaínas obtenidos del extracto Soxhlet metanol, el cual presento mayor actividad antioxidante y rendimiento, se muestran en la tabla 11. Se cuantificaron 57 mg/ml de sólidos totales, de los cuales 45 mg/ml corresponden a sólidos volátiles.

La cuantificación de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) del extracto metanólico de brácteas de *B. glabra* mediante espectrofotometría UV-VIS exhibio una mayor cantidad de betaxantinas con 15.3 mg/g a diferencia del contenido de betacianinas que fue de 13.1 mg/g.

Extracto	Sólidos totales	Sólidos volátiles	Concentración betacianinas	Concentración betaxantinas
Soxhlet metanol	57 mg/ml	45 mg/ml	13.12 mg/ml	15.3 mg/ml

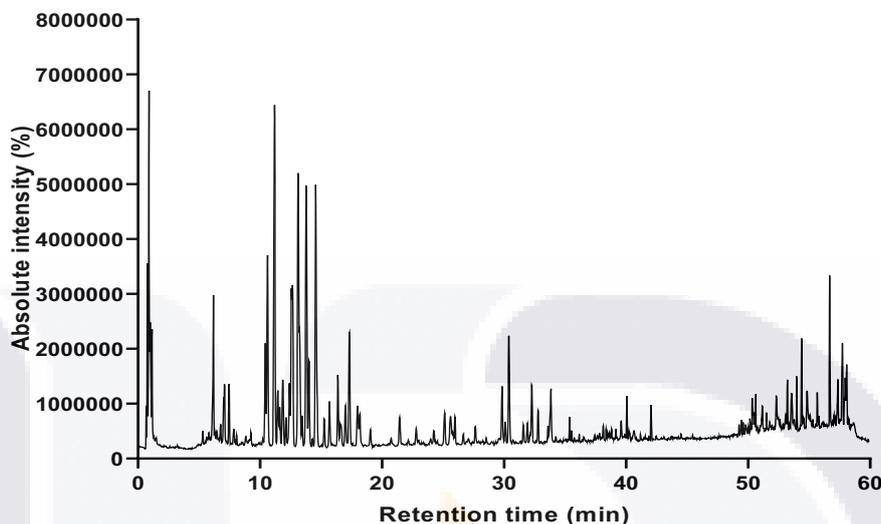
Tabla 11: sólidos totales y la cuantificación de betalaínas.

8.6. Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC)

La identificación de compuestos polifenólicos presentes en el extracto de brácteas de *B. glabra* mediante análisis por UPLC-MS permitió detectar un total de 64 posibles compuestos (gráfica 13). En la tabla 12 se presentan los datos correspondientes a cada compuesto, incluyendo el tiempo de retención (RT), el ion molecular ([M+H]⁺), los iones

de fragmentación (MS/MS), la fórmula molecular estimada y su identificación tentativa basada en bibliografía.

Cromatograma de extracto soxhlet purificado de bráctea de *Bougainvillea glabra*



Gráfica 13: Compuestos presentes en el extracto purificado de brácteas de *Bougainvillea glabra* identificados mediante UPLC.

Pico	RT	M/Z	Compuesto tentativo	Fórmula molecular	Fragmentos	Referencia
1	6.18	341.0857	Sacarosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	339.0681, 281.0637, 207.0282, 179.0329, 161.0231, 133.0283, 116.9276	El-Sayed et al., 2020
5	7.85	355.0993	Ácido chebulínico	$C_{14}H_{12}O_{11}$	292.0780, 235.9227, 174.9535, 116.9272, 99.9245	El-Sayed et al., 2020
6	9.25	801.1989	Quercetin 3-(2''-feruloylsophoroside)	$C_{37}H_{38}O_{20}$	771.1906, 673.2612, 639.1466, 547.0578, 493.0547,	Saleem et al., 2019.

					479.0767, 477.0579, 377.0437, 256.9534, 235.9233, 174.9538, 116.9273, 99.9248	
7	10.44	755.1969	Kaempferol 3-(2G- glucosilrutin ósido)	$C_{33}H_{40}O_{20}$	753.1791, 741.1763, 509.2152, 377.1758, 301.1163, 235.9227, 174.9545, 116.9274, 99.9250	Saleem et al., 2019
9	11.19	785.2068	Isorhamneti na 3- glucosil-(1- >2)- [ramnosil-(1- >6)- galactósido]	$C_{34}H_{42}O_{21}$	783.1095, 771.1857, 655.1442, 431.1818, 409.1107, 387.0417, 235.9335, 174.9537, 116.9274, 99.9247	
10	11.46	163.0388	Ácido p- cumárico	$C_9H_8O_3$	119.0492, 116.9274	Kaisoon, et al., 2012.
11	11.62	609.1395	Robinetina 3-rutinósido	$C_{27}H_{30}O_{16}$	607.1223, 595.1122, 497.0768, 463.0792, 369.0151, 279.0470,	Saleem, et al., 2019.

						235.9226,
						174.9536,
						163.0380,
						116.9273,
						99.9240

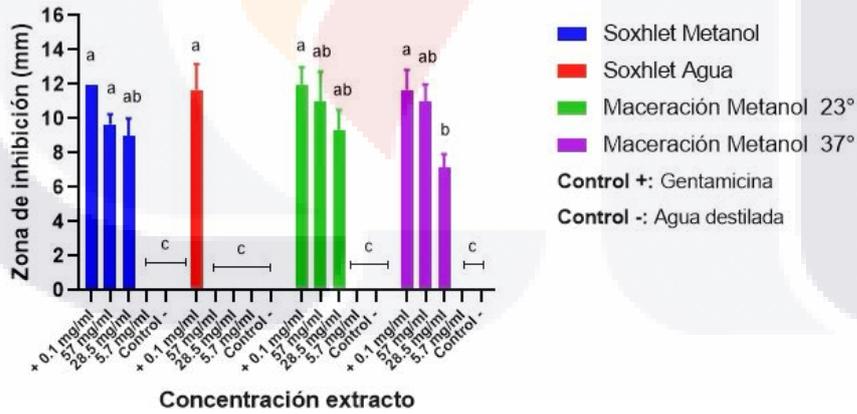
Tabla 12: Identificación tentativa de compuestos presentes en el extracto purificado de brácteas de *Bougainvillea glabra*.

8.7. Actividad antimicrobiana por difusión en pozo

8.7.1. *Staphylococcus aureus*

Las diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de buganvilla con las técnicas Soxhlet y maceración demostraron tener la misma capacidad que el antibiótico gentamicina para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. El extracto de Soxhlet a 57 mg/ml inhibió una zona de 9.6 mm, mientras que a la misma concentración de maceración a 23° y 37° inhibieron 11 mm. El extracto de Soxhlet agua y grupo control no mostraron zona de inhibición.

Actividad antimicrobiana del extracto de *B. glabra* contra *Staphylococcus aureus*

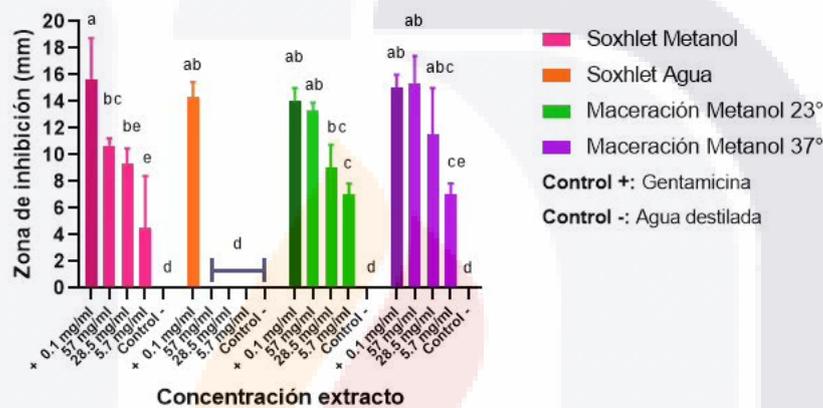


Gráfica 14: Evaluación de la actividad antimicrobiana con diferentes concentraciones (57, 28.5, 5.7 mg/ml) de extracto de bráctea contra *Staphylococcus aureus*. Calculado mediante ANOVA de dos vías, al evaluar la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-c) indican diferencia estadística ($P < 0.05$), (Prueba de comparación múltiple Tukey's).

8.7.2. *Staphylococcus epidermidis*

Se evaluó el potencial de los extractos de Soxhlet metanol y agua, así como maceración metanol a 23° y 37°C de brácteas de *B. glabra* contra la bacteria Gram positiva *S. epidermidis*, demostrando que los extractos de Soxhlet metanol y maceración a 23° y 37°C detienen el crecimiento bacteriano empleando diferentes concentraciones; siendo esta inhibición parecida a la que produce el antibiótico gentamicina a una concentración de 0.1 mg/ml. Por otro lado, el extracto de Soxhlet agua y el grupo control no mostraron actividad.

Actividad antimicrobiana del extracto de *B. glabra* contra *Staphylococcus epidermidis*

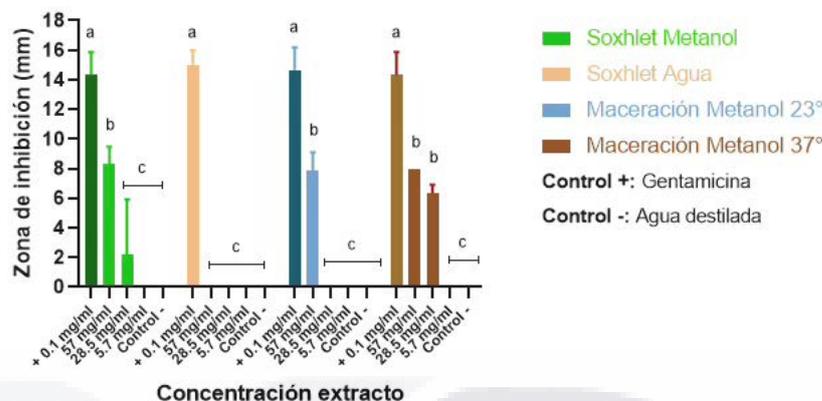


Gráfica 15: Evaluación de la actividad antimicrobiana con las concentraciones a 57, 28.5, 5.7 mg/ml de extracto de brácteas contra *Staphylococcus epidermidis*. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio± DS (n=3) la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-d) indican diferencia estadística (P<0.05), y Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.7.3. *Acinetobacter baumannii*

La bacteria Gram negativa *A. baumannii* fue más sensible a la concentración de 57 mg/ml de los extractos de metanol, revelando que no existe diferencia significativa entre la zona de inhibición de 8.3 mm con Soxhlet, 7.8 mm con maceración a 23° y de 8 mm con maceración a 37°. El agua destilada del grupo control negativo, así como la extracción de Soxhlet con agua no mostraron actividad antimicrobiana.

Actividad antimicrobiana del extracto de *B. glabra* contra *Acinetobacter baumannii*

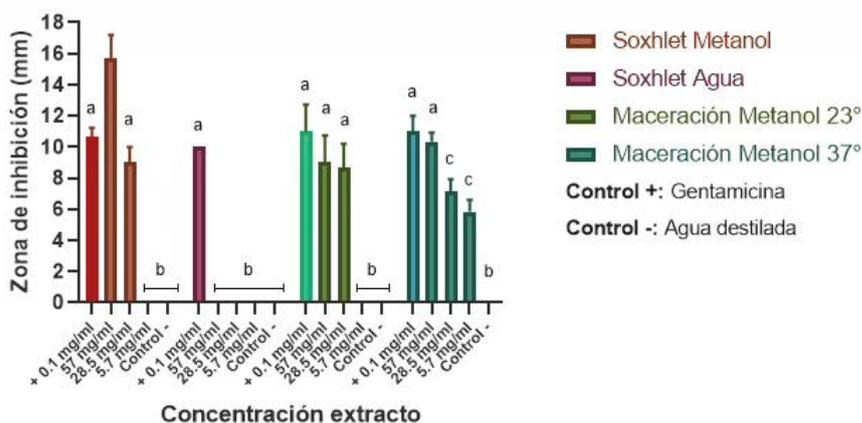


Gráfica 16: Evaluación de la actividad antimicrobiana con diferentes concentraciones (57, 28.5, 5.7 mg/ml) de extracto de bráctea contra *Acinetobacter baumannii*. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio± DS (n=3), seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's, la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-c) indican diferencia estadística (P<0.05).

8.7.4. *Pseudomonas aeruginosa*

La actividad antimicrobiana que presentaron los extractos metanólicos a una concentración de 57 mg/ml contra *P.aeruginosa* resulto ser igual de efectiva que la concentración de 0.1 mg/ml de la gentamicina. La zona de inhibición producida por Soxhlet metanol a 57 mg/ml fue de 15.6 mm incluso mayor a la producida por el antibiótico (10.6 mm). Con maceración a 23° C observamos una inhibición de 9 mm empleando 57 mg/ml, mientras que solo 3 mm con 28.5 mg/ml. En el caso de maceración a 37° se observan una zona de 10.3 mm usando 57 mg/ml, de 7.1 mm con 28.5 mg/ml y solo 2.1 mm con extracto a 5.7 mg/ml. El extracto de Soxhlet agua y el control negativo no presentaron halos de inhibición.

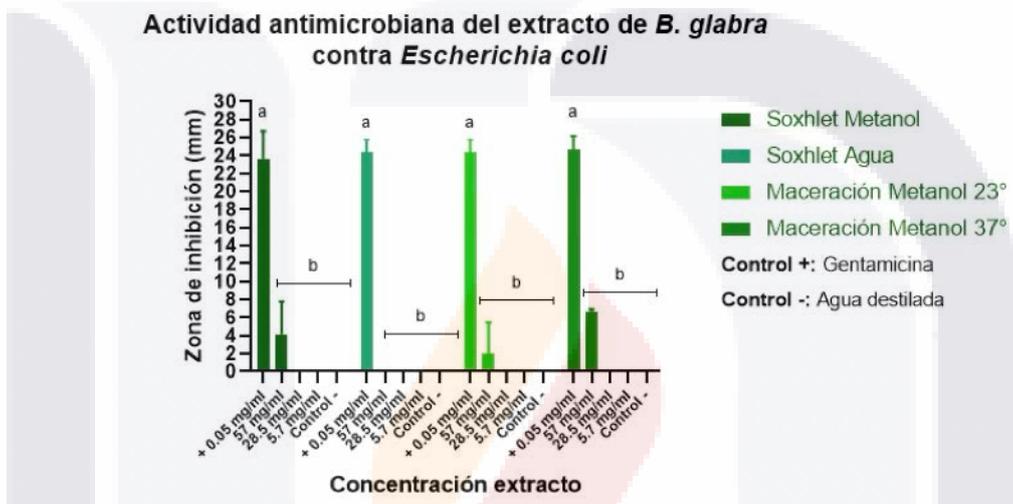
Actividad antimicrobiana del extracto de *B. glabra* contra *Pseudomonas aeruginosa*



Gráfica 17: Evaluación de la actividad antimicrobiana con diferentes concentraciones de extracto de brácteas contra *Pseudomonas aeruginosa*. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio \pm DS (n=3) la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-c) indican diferencia estadística (P<0.05) y Prueba de comparación múltiple Tukey's.

8.7.5. Escherichia coli

Observamos que el extracto de Soxhlet con metanol contra *E. coli* tuvo solo una zona de inhibición de 4.1 mm a una concentración de 57mg/ml, con maceración a 23° solo 2 mm y a 37° de 6.6 mm a la misma concentración. Respecto a Soxhlet agua y control negativo no se observó zona de inhibición.

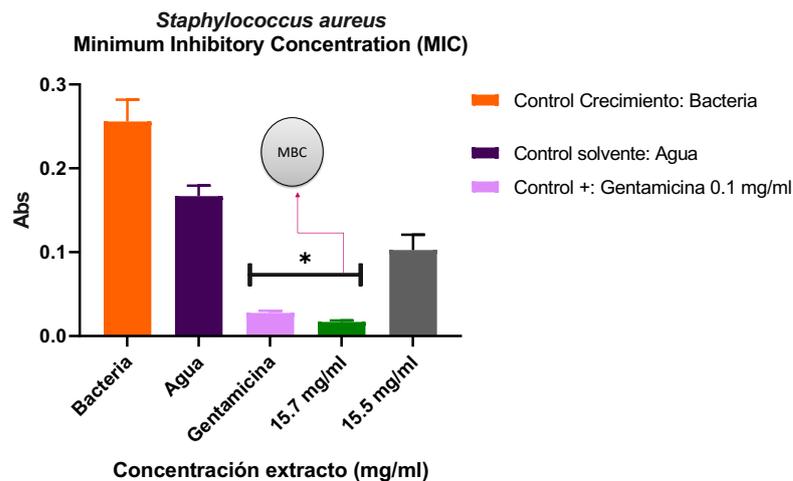


Gráfica 18: Gráfica 18. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* con diferentes concentraciones de extracto de bráctea. Al evaluar mediante ANOVA de dos vías para promedio \pm DS (n=3), seguido de Prueba de comparación múltiple Tukey's, la misma variable con diferente técnica de extracción, diferente literal (a-b) indican diferencia estadística (P<0.05).

8.8. Concentración Mínima Inhibidora (MIC) y Concentración Mínima Bactericida

8.8.1. MIC y MBC de Staphylococcus aureus

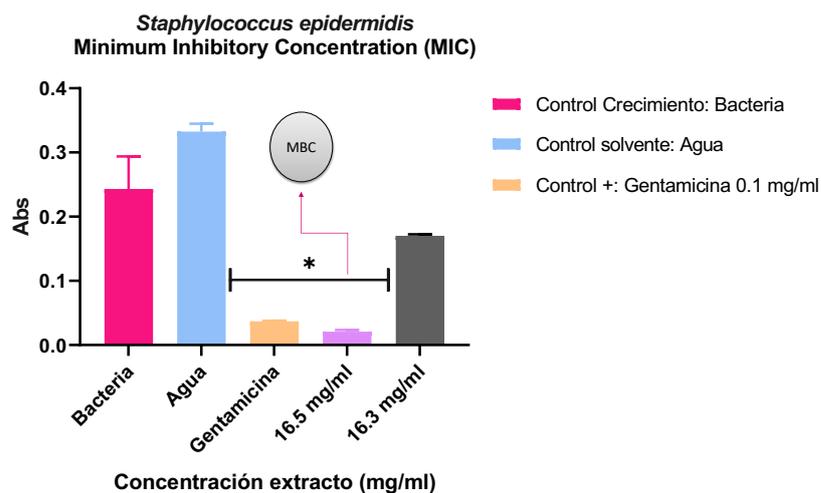
Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de brácteas de *B. glabra* contra la cepa *S. aureus* se evaluó un rango de 28.5 mg/ml hasta 5.7 mg/ml, descubriendo que la menor cantidad de extracto necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano es de 15.7 mg/ml. Para considerar la MBC, el extracto eliminó al 99.9% de las bacterias a una la concentración de 15.7 mg/ml, mientras que a concentraciones menores el crecimiento era incontable.



Gráfica 19: Evaluación de MIC y MBC a diferentes concentraciones del extracto contra *Staphylococcus aureus*. Observamos la media de tres repeticiones de la absorbancia a 595 nm. Al evaluar mediante ANOVA de una vía (n=3) la absorbancia de crecimiento a diferente concentración del extracto, “*” indica que no existe diferencia estadística (P<0.05), y Prueba de comparación múltiple Tukey’s.

8.8.2. MIC y MBC de *Staphylococcus epidermidis*

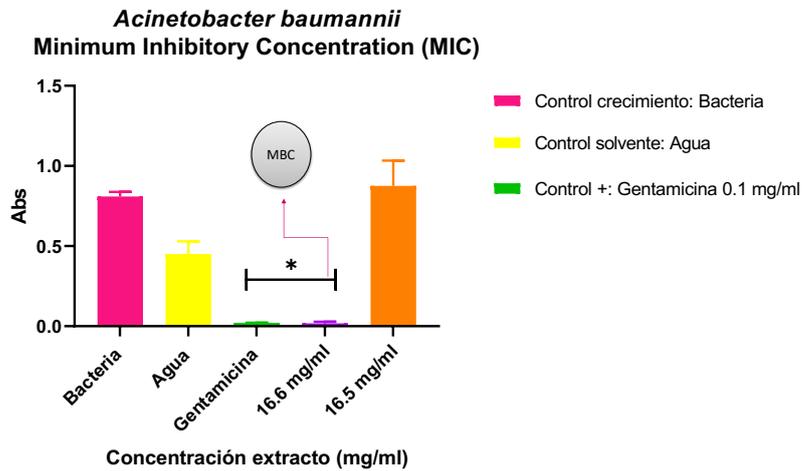
Para determinar la MIC del extracto de metanol de brácteas de *B. glabra* contra la bacteria *S. epidermidis* se evaluaron concentraciones que oscilaban entre 17.6 mg/ml y 15 mg/ml, observando que a 16.5 mg/ml no mostraba crecimiento bacteriano. La concentración del extracto de *B. glabra* que impidió el crecimiento de alguna colonia (MBC) de *S. epidermidis* fue a 16.5, por otro lado, a 16.3 mg/ml el crecimiento de la bacteria fue incontable.



Gráfica 20: MIC y MBC de *Staphylococcus epidermidis*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía (n=3) la absorbancia de crecimiento a diferente concentración del extracto, “*” indica que no existe diferencia estadística (P<0.05) (Prueba de comparación múltiple Tukey’s).

8.8.3. MIC y MBC de *Acinetobacter baumannii*

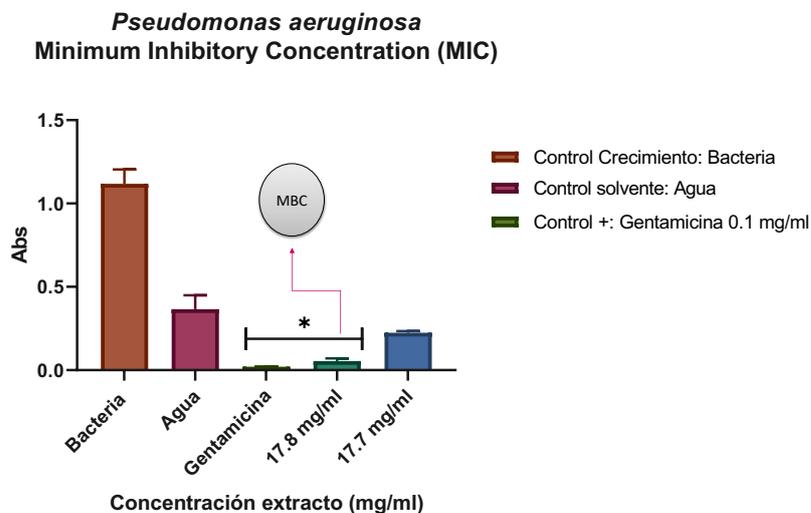
Para conocer la cantidad de extracto metanólico de brácteas de *B. glabra* necesaria para impedir y eliminar (MIC y MBC) el crecimiento de *A. baumannii*, se evaluaron concentraciones de 28.5 a 11.4 mg/ml, observando que a 16.6 mg/ml existe actividad antibacteriana.



Gráfica 21: MIC y MBC de *Acinetobacter baumannii*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, * significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de comparación múltiple Tukey's).

8.8.4. MIC y MBC *Pseudomonas aeruginosa*

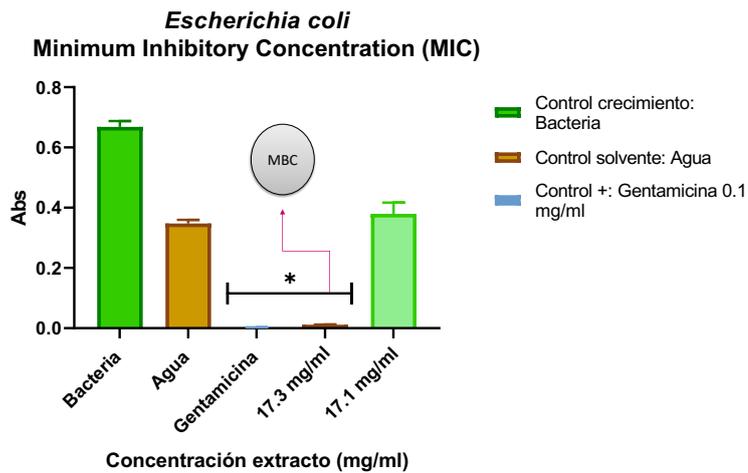
La concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC) del extracto de brácteas de *B. glabra* contra la cepa *P. aeruginosa* se evaluó en un rango de 28.5 mg/ml hasta 5.7 mg/ml, siendo la concentración de 17.8 mg/ml la necesaria para impedir el crecimiento bacteriano.



Gráfica 22: MIC y MBC *Pseudomonas aeruginosa*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia del crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, * revelan que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de comparación múltiple Tukey's).

8.8.5. MIC y MBC de *Escherichia coli*

Se evaluaron concentraciones de 28.5 a 14.8 mg/ml para determinar la actividad del extracto de brácteas de buganbilia contra *E. coli*, siendo la concentración de 17.3 mg/ml la mínima inhibitoria y bactericida.



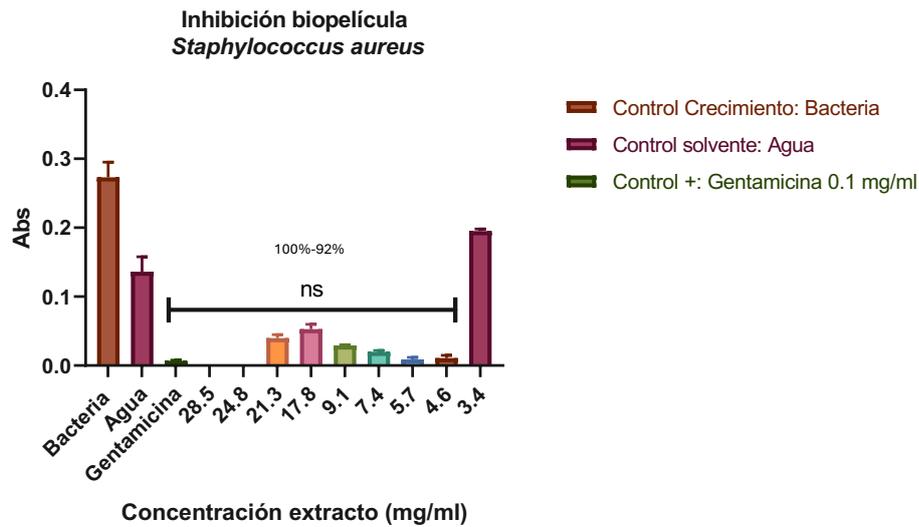
Gráfica 23: Gráfica 23. MIC y MBC de *Escherichia coli*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, * significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de comparación múltiple Tukey's).

8.9. Actividad anti-adherencia de biopelículas

8.9.1. Porcentaje de inhibición de biopelículas

8.9.1.1. *Staphylococcus aureus*

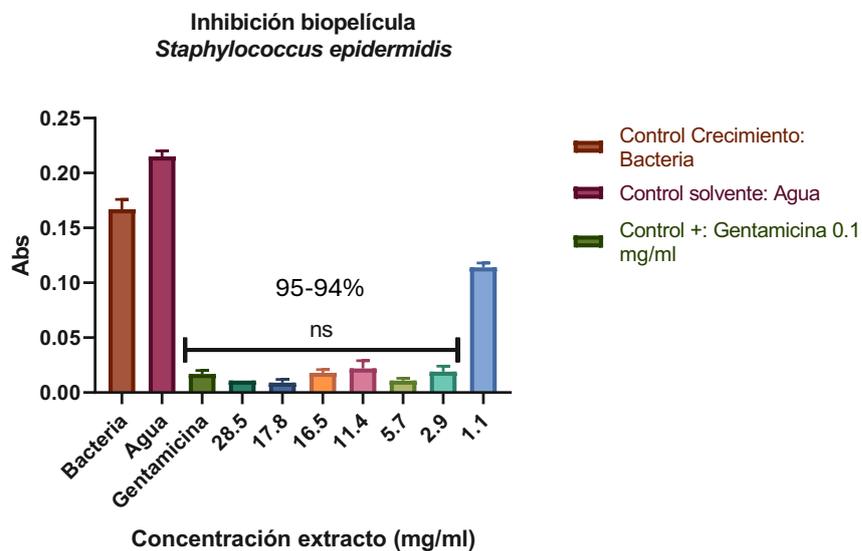
Para poder determinar si el extracto de bráctea de *B. glabra* presenta acción sobre la inhibición de biopelículas de *S. aureus* se evaluaron concentraciones entre 28.5 mg/ml a 3.4 mg/ml. Observando que a 4.6 mg/ml impide hasta un 85% la unión de la biopelícula.



Gráfica 24: Gráfica 24. Inhibición de la biopelícula de *Staphylococcus aureus* empleando extracto de bráctea de *B. glabra*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's).

8.9.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

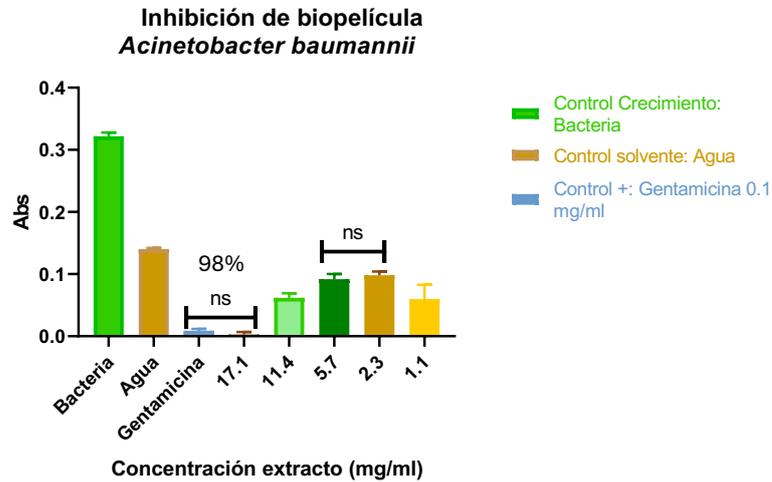
La inhibición de la biopelícula de *S. epidermidis* se logró hasta un 94% a una concentración de 2.9 mg/ml del extracto, mientras que a concentraciones menores la absorbancia de crecimiento aumentaba.



Gráfica 25: Gráfica 25. Inhibición de la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis* con extracto de *B. glabra*. Al evaluar mediante ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's).

8.9.1.3. *Acinetobacter baumannii*

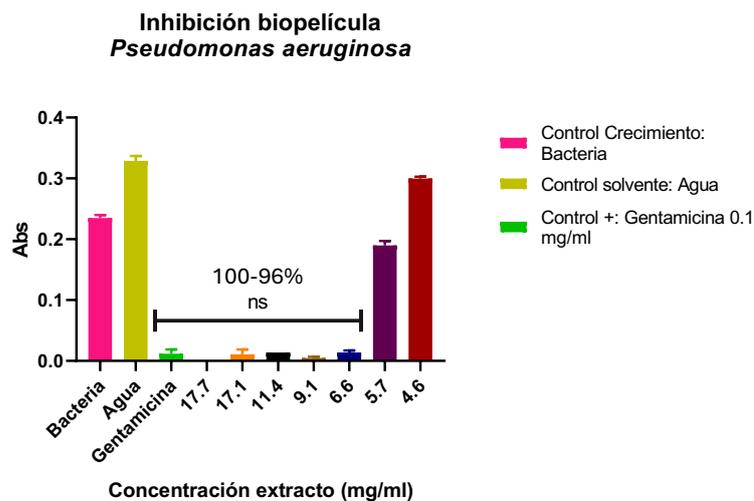
La concentración del extracto de buganvilla necesaria para inhibir el 98% la formación de la biopelícula de *A. baumannii* es de 17.1 mg/ml, mientras que concentraciones de 11.4 a 1.1 mg/ml inhiben un 60-40%, respectivamente.



Gráfica 26: Acción inhibitoria del extracto metanólico de brácteas de *Bougainvillea glabra* contra *Acinetobacter baumannii* (n=3). ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's).

8.9.1.4. *Pseudomonas aeruginosa*

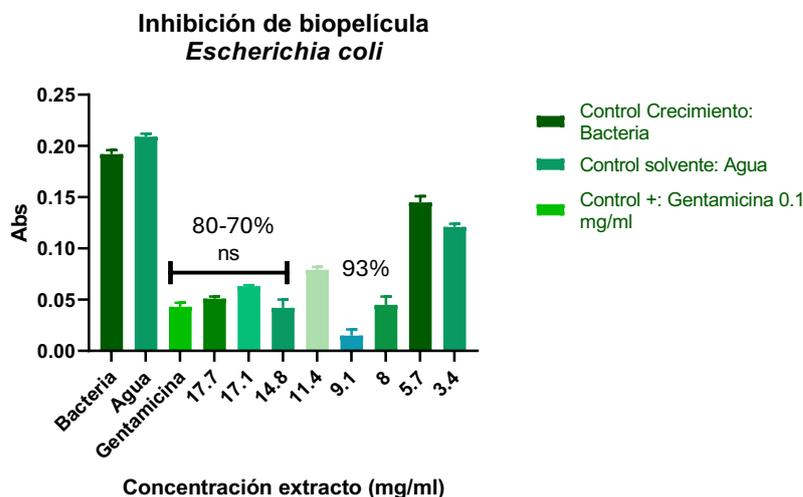
La capacidad del extracto metanólico de *B. glabra* para inhibir el 100% la formación de biopelículas de *P. aureginosa* se encuentra en la concentración de 17.7 mg/ml y hasta un 80% a 6.6 mg/ml.



Gráfica 27: . Efecto del extracto de bráctea de *Bougainvillea glabra* sobre la inhibición de la biopelícula de *P. aureginosa*. ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's).

8.9.1.5. *Escherichia coli*

Una concentración de 8 mg/ml de extracto de *B. glabra* inhibe el 93% de la formación de biopelícula de *E. coli*, mientras que concentraciones menores inhiben hasta un 80-40%.



Gráfica 28: Efecto inhibitor de *Bougainvillea glabra* contra biopelícula de *Escherichia coli*. ANOVA de una vía la absorbancia de crecimiento bacteriano a diferente concentración del extracto, ns significa que no existe diferencia estadística ($P < 0.05$) entre las concentraciones (Prueba de Tukey's).

8.9.2. Evaluación anti-adherencia de biopelículas mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM)

8.9.2.1. *Staphylococcus aureus*

Para evaluar el efecto del extracto metanólico de *B. glabra* sobre biopelículas de *S. aureus*, se formó una biopelícula en portaobjetos, y luego marcada con FilmTracer y posteriormente observada con microscopía confocal. En la figura 12 se puede apreciar la morfología de la biopelícula de *S. aureus* (A, B) sin ningún tratamiento, se puede observar que el espesor de la biopelícula es de aproximadamente 30 micras (μm), en tanto que la biopelícula tratada con 11.4 mg/ml de extracto (C, D) disminuyó su espesor a 5 μm .

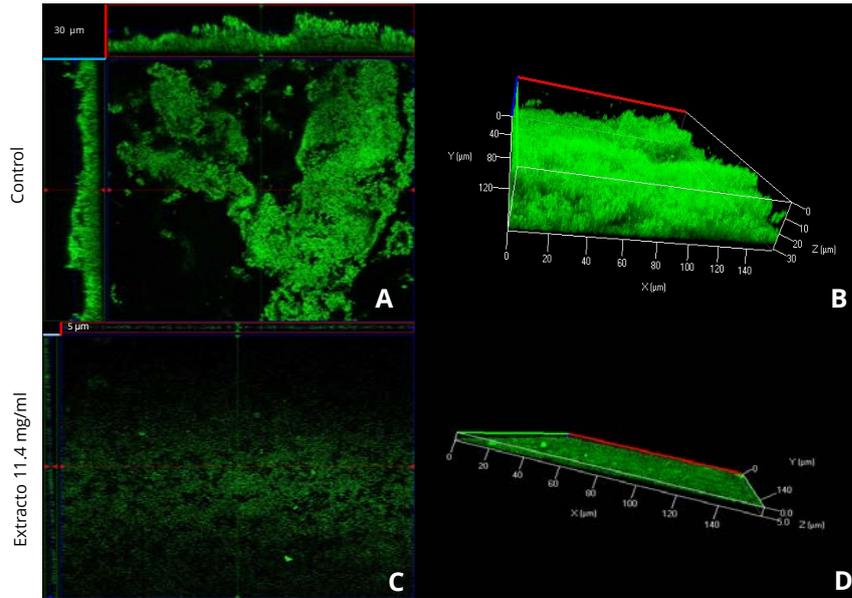


Figura 12. A-B biopelícula *Staphylococcus aureus*. C-D tratamiento con 11.4 mg/ml de extracto de bráctea de *Bougainvillea glabra*.

8.9.2.2. *Staphylococcus epidermidis*

En la figura 13 se detecta una ligera reducción del grosor de 8 μm la biopelícula de *S. epidermidis* a 6 μm con la muestra tratada con 10 mg/ml de extracto.

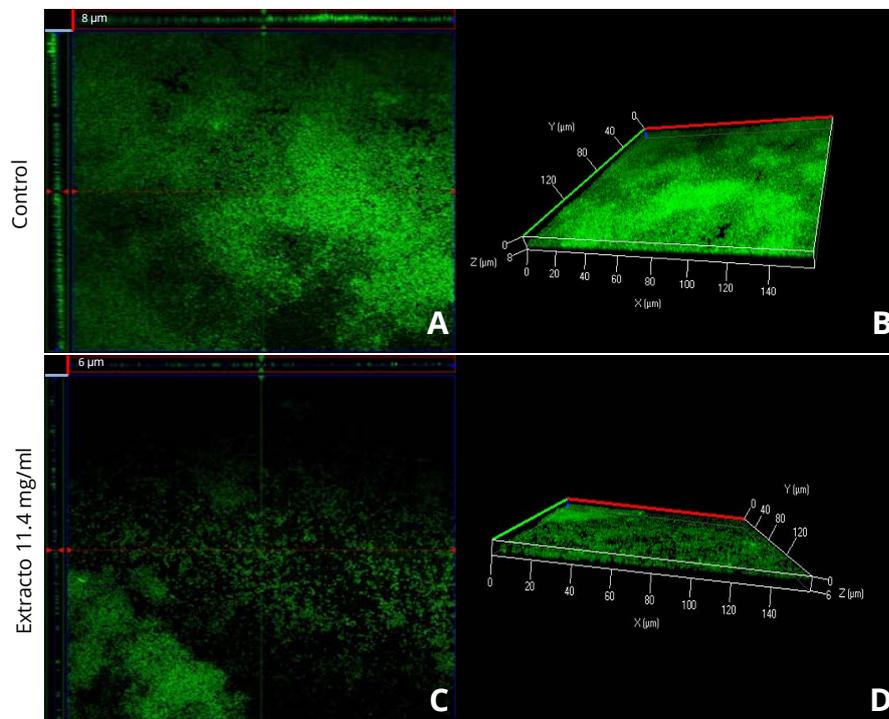


Figura 13. A-B formación biopelícula *Staphylococcus epidermidis*. C-D inhibición de biopelícula con 11.4 mg/ml de extracto de bráctea de *Bougainvillea glabra*.

8.9.2.3. *Acinetobacter baumannii*

El extracto de bráctea de *B. glabra* a una concentración de 11.4 mg/ml logró reducir el espesor de la biopelícula control de *A.baumannii* de 30 μm a 9 μm (figura 14).

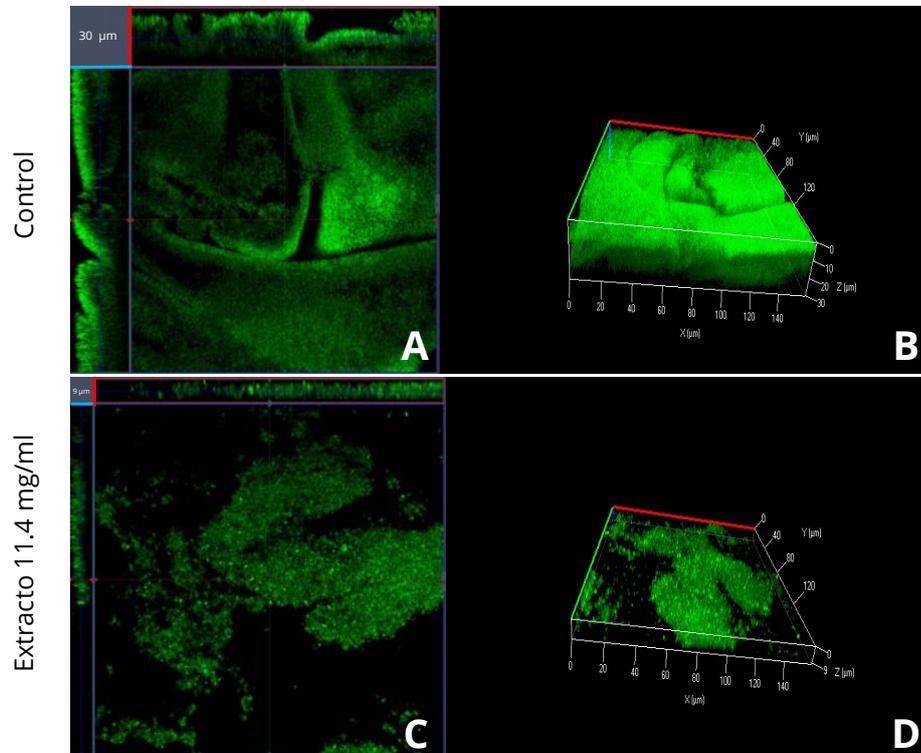


Figura 14. Formación biopelícula de *Acinetobacter baumannii* (A, B). Efecto del extracto de *Bougainvillea glabra* (C, D) en la generación de biopelícula.

8.9.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

La biopelícula formada por *P. aeruginosa* muestra un grosor de 20 μm , mientras que el grosor de la biopelícula disminuyó en presencia de 11.4 mg/ml de extracto metanólico de *B. glabra* (figura 15).

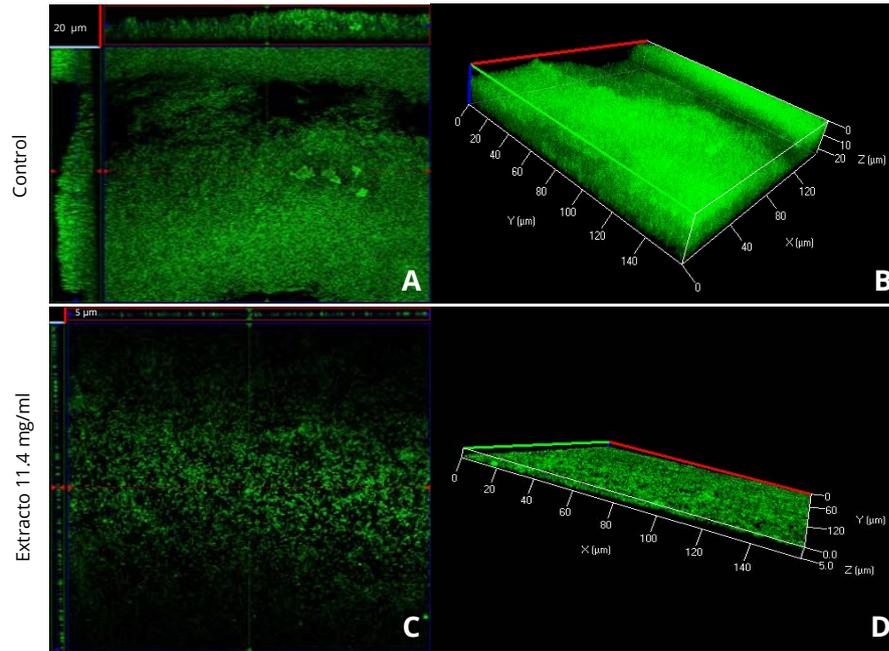


Figura 15: Biopelícula *Pseudomonas aeruginosa* (A, B). Acción del extracto de bráctea *Bougainvillea glabra* sobre la formación de *P. aeruginosa* (C, D).

8.9.2.5. *Escherichia coli*

La producción de biopelícula de la bacteria *E. coli* se vio afectada por la presencia de 11.4 mg/ml de extracto de bráctea, ya que el grosor de la biopelícula control fue de 20 µm, al contrario de la tratada con *B. glabra* que se redujo a 5.5 µm.

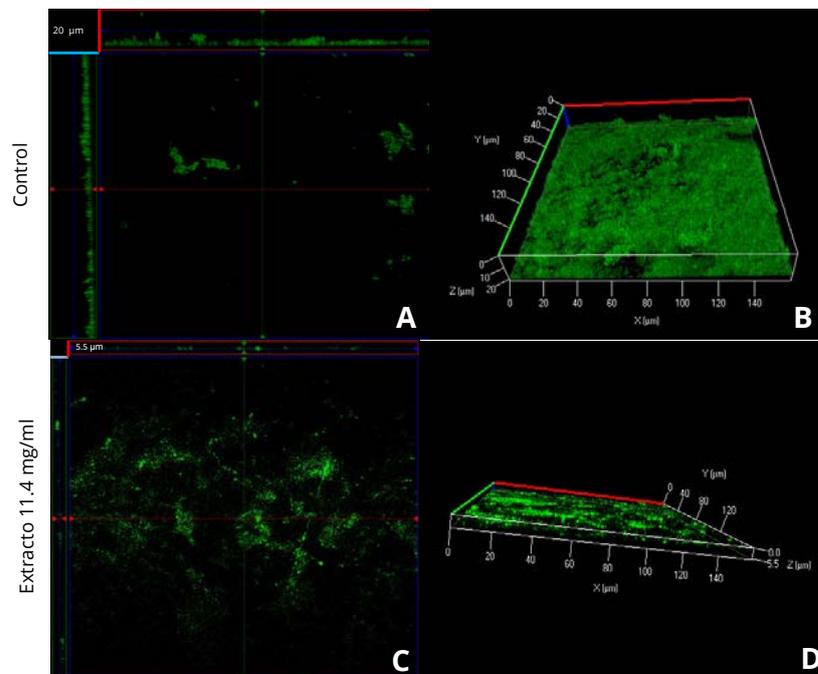


Figura 16. Actividad del extracto metanólico de bugambilia contra la biopelícula de *Escherichia coli*.

8.10. Ensayo de citotoxicidad por tinción de fluorescencia de las células NPTr

Las células epiteliales traqueales de cerdo (NPTr) se expusieron a una concentración de 5.7 mg/ml del extracto metanólico de brácteas de *B. glabra* durante 24 horas, con el objetivo de evaluar, mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM), si el extracto causaba daño en el núcleo o en el citoesqueleto de actina. En la figura 17-A, se muestra los microfilamentos de actina y el núcleo las células NPTr sin ningún tratamiento (control). Mientras que en la figura 17-B se observa que la exposición al extracto no provocó alteraciones visibles en la morfología del núcleo ni en la organización del citoesqueleto de actina de las células.

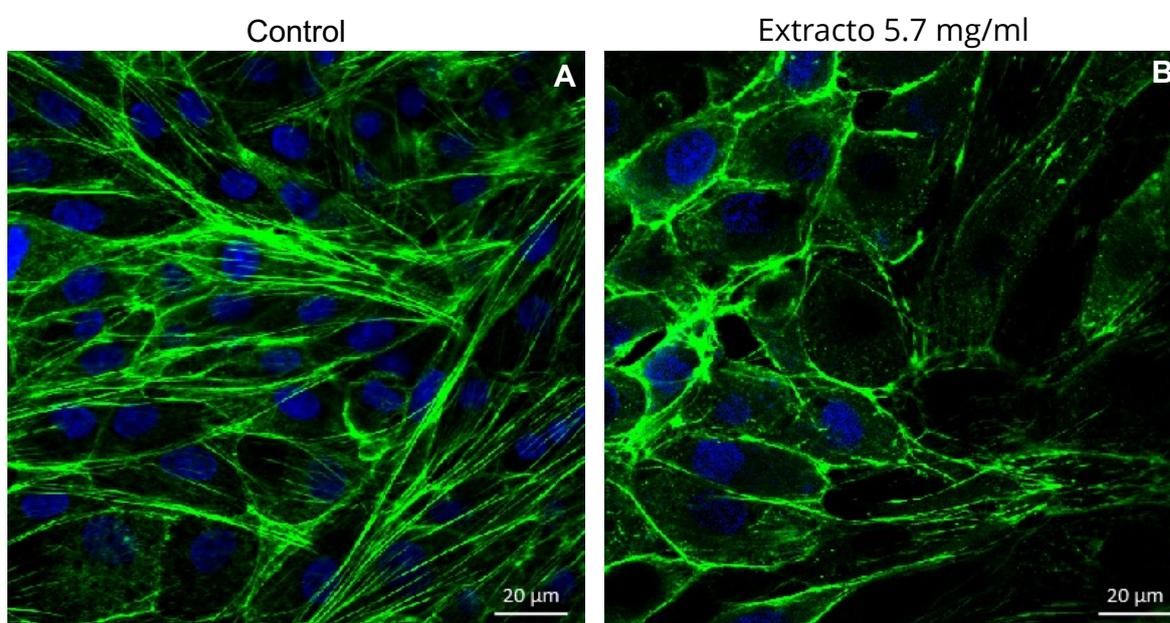


Figura 17. Citoesqueleto de actina de células NPTr marcadas con faloidina Alexa Fluor 488 (verde). Los núcleos se marcaron con Hoetch (azul). (A) Células control. (B) Células tratadas con 5.7 mg/ml de extracto de buganvilia.

9. Discusión

Diversos extractos vegetales que contienen antioxidantes naturales con capacidad para neutralizar radicales libres han demostrado ser prometedores en el tratamiento de múltiples enfermedades. Los compuestos bioactivos provenientes del metabolismo secundario de las plantas juegan un papel esencial frente al estrés oxidativo. Estas sustancias antioxidantes tienen la capacidad de ceder electrones o átomos de hidrógeno, formando radicales intermedios estables (Amrane-Abider et al., 2023).

Bougainvillea glabra se ha reconocido por una variedad de propiedades medicinales, entre las que se incluyen efectos antioxidantes, antivirales, antidiabéticos, antifertilidad, antiinflamatorios, antimicrobianos e incluso como larvicida (Saleem et al., 2019; El-Sayed et al., 2020). Muchas de estas actividades biológicas se atribuyen a la presencia de diversos compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, pero principalmente al pigmento betalaína. Las betalaínas son compuestos nitrogenados, vacuolares e hidrosolubles que se derivan de la tirosina, son característicos del orden Caryophyllales y responsables del color de las brácteas. Estas se dividen en dos grupos principales: las betacianinas, que producen tonalidades de rojo a violeta, y las betaxantinas, que generan colores de amarillo a naranja (Kuhn et al., 2022; Wu et al., 2022). A pesar de su relevancia en la medicina tradicional, las investigaciones orientadas a caracterizar sus propiedades químicas y terapéuticas de *B. glabra* siguen siendo limitadas. En el presente estudio, se evaluaron inicialmente los efectos de distintas variables de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de las brácteas de *B. glabra*.

La extracción constituye una etapa crucial en la obtención y análisis de compuestos con actividad biológica presentes en plantas medicinales. La eficacia de este proceso depende de la polaridad del disolvente empleado, así como el método de extracción seleccionado, ya que influyen en el rendimiento y la calidad de los compuestos extraídos. Según el principio de solubilidad, los fitoquímicos con distintas polaridades, pueden ser extraídos de manera eficiente mediante el uso de disolventes compatibles con sus características químicas (Abarca et al., 2016).

Los disolventes comúnmente utilizados para la extracción son: etanol, metanol, agua y acetona (Lee, 2024), los cuales fueron empleados en este estudio. Al comparar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de las brácteas mediante los diferentes disolventes, se observó que el metanol presentó el mejor rendimiento (gráfica 10) y la mayor capacidad antioxidante (gráfica 1 a 9). La efectividad del metanol puede atribuirse a su alta polaridad, superior a la del etanol, lo que le permite establecer enlaces de hidrógeno más fuertes, tanto como donante y como aceptor. Gracias a esta propiedad, el metanol facilita una extracción más eficiente de compuestos polares. Además, posee una mayor capacidad de disolución que el agua, lo que contribuye a una extracción rápida y eficaz. Por otro lado, la acetona, que presenta una polaridad menor y una volatilidad más alta en comparación con el etanol y el metanol, actúa preferentemente como disolvente de compuestos no polares (Lee et al., 2024). Esta característica limita su eficacia para extraer sustancias polares presentes en las brácteas.

Diversos estudios han demostrado que el metanol es uno de los disolventes más eficaces para la extracción de compuestos bioactivos en distintas especies vegetales,

superando en rendimiento a otros disolventes orgánicos (Mannino et al., 2023). Hecho que se presentó en una investigación realizada con *Bougainvillea × buttiana*, donde se evaluó el rendimiento de extracción utilizando distintos disolventes: agua destilada, metanol, acetona, etanol, acetato de etilo, diclorometano y hexano, todos con un grado de pureza al 100%, y extraídos a una temperatura constante de 26 °C. Los resultados indicaron que el rendimiento de extracción aumentó conforme lo hacía la polaridad del disolvente. Obteniendo los mayores rendimientos con agua destilada y metanol (Abarca, et al., 2016). Asimismo, Shalini (2016) evaluó extractos de *B. glabra* utilizando metanol en tres concentraciones (50 %, 70 % y 100 %). Los resultados mostraron que el metanol al 100 % presentó la mayor eficiencia de extracción, lo que confirma la relevancia de utilizar disolventes con alta pureza y polaridad para obtener una mayor cantidad de compuestos bioactivos.

El método de extracción es otro factor clave para maximizar la obtención de compuestos bioactivos a partir de tejidos vegetales, ya que influye directamente tanto en el rendimiento como en la calidad de los extractos (Mannino et al., 2023). En el presente trabajo evaluamos dos técnicas de extracción convencionales: Soxhlet y maceración, así como una técnica no convencional: sonicación. Los resultados mostraron que la técnica Soxhlet no solo alcanzó un mayor rendimiento de extracción, sino que también generó extractos con mayor actividad biológica en comparación con los otros métodos evaluados. Estos hallazgos concuerdan con las investigaciones previas de Mannino y colaboradores (2023), donde se reporta una mayor eficacia del método Soxhlet frente a la maceración. La ventaja del Soxhlet puede atribuirse a sus condiciones operativas, que incluyen temperaturas elevadas y una recirculación continua del disolvente caliente, lo que facilita una extracción completa y eficiente de compuestos bioactivos. Por otro lado, aunque la extracción asistida por ultrasonido también mostró resultados favorables, su eficacia puede verse limitada por parámetros como la duración y la intensidad de la sonicación. Estudios indican que exposiciones prolongadas, donde se superan los 40 minutos, junto con frecuencias elevadas, mayores a 20 kHz, pueden provocar la formación de radicales libres o causar la degradación de compuestos sensibles (Valasi et al., 2023). En general, aunque tanto la sonicación como el Soxhlet requieren el uso de equipos de calentamiento y disolventes orgánicos, la técnica Soxhlet se posiciona como la opción más efectiva en términos de rendimiento y estabilidad del extracto, lo que la convierte en una herramienta valiosa en estudios fitoquímicos orientados a la obtención de antioxidantes y metabolitos bioactivos.

Los flavonoides, fenoles, saponinas y taninos son los metabolitos secundarios clasificados como esenciales en las plantas (Abarca et al., 2016). La obtención de estos

compuestos también puede verse influenciada por las condiciones de temperatura y el tiempo de extracción. Diversos estudios mencionan que se pueden obtener compuestos bioactivos estables a temperaturas elevadas cuando se aplican durante períodos breves de tiempo, pero esta condición no es universal. En el caso de metabolitos sensibles al calor, como algunos flavonoides, temperaturas altas pueden favorecer su degradación o pérdida, especialmente cuando se superan los 100 °C. Esto ocurre porque el calor excesivo puede alterar la estructura química de los compuestos, reduciendo su biodisponibilidad y actividad antioxidante (Lee et al., 2024). Por lo tanto, es fundamental ajustar cuidadosamente las condiciones térmicas para evitar comprometer la integridad de los metabolitos de interés. En el presente estudio, se evaluaron temperaturas moderadas que no excedieron los puntos de ebullición de los disolventes utilizados, como es el caso de la acetona (56 °C), metanol (65 °C), etanol (78 °C) y agua (100 °C), además de ensayos realizados a temperatura ambiente (23 °C) y temperaturas ligeramente elevadas (37 °C y 40 °C). Además, se ha observado que el aumento de la temperatura puede facilitar la ruptura parcial de las paredes celulares vegetales, mejorando la difusión del solvente y liberando compuestos bioactivos al medio de extracción (Lee et al., 2024). Por lo tanto, encontrar un equilibrio adecuado entre temperatura, tipo de disolvente y tiempo de contacto es esencial para optimizar la recuperación de compuestos sin comprometer su funcionalidad.

Los compuestos antioxidantes cumplen la función de proteger al organismo contra el estrés oxidativo, que se ha asociado con el desarrollo de enfermedades degenerativas y procesos de envejecimiento acelerado. En los últimos años, los antioxidantes naturales derivados de plantas han despertado un gran interés debido a su bajo riesgo para la salud humana (Markandan et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, los compuestos fitoquímicos con capacidad antioxidante actúan mediante dos mecanismos principales: la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y la transferencia de un electrón (SET), procesos que resultan en la neutralización de especies reactivas y en la estabilización de los compuestos antioxidantes. Dado que estos mecanismos pueden activarse de manera distinta según la estructura química del compuesto, evaluar la actividad antioxidante a través de un solo método puede resultar insuficiente para caracterizar completamente su potencial. Por ello, es necesario emplear múltiples ensayos que permitan medir la capacidad antioxidante desde diferentes enfoques, tanto en función del tipo de radical involucrado como del mecanismo predominante (Mannino et al., 2023). En este contexto, *B. glabra* ha surgido como una fuente prometedora de antioxidantes naturales, principalmente por su riqueza en compuestos fenólicos y betalainas. En el presente estudio, se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos

obtenidos con distintos solventes y técnicas de extracción, observándose que el extracto crudo metanólico presentó la mayor actividad antioxidante en los ensayos ABTS, FRAP y en el contenido total de fenoles. Estos resultados coinciden con investigaciones previas que también destacan al metanol como el solvente más eficaz para la obtención de compuestos bioactivos con alto potencial antioxidante. Por ejemplo, Saleem et al. (2019) compararon la eficacia del metanol y el diclorometano, encontrando que el extracto metanólico no solo presentó mayor capacidad para eliminar radicales ABTS (IC50=111.32 mg TE/g), sino que también mostró valores superiores en FRAP (73.95 mg GAE/g) y en contenido de fenoles totales (26.04 mg GAE/g).

Por otro lado, Markandan et al. (2016) evaluaron proporciones de metanol al 50%, 70% y 100 %, reportando que metanol al 100 % resultó con los mejores valores de actividad antioxidante: 77.37 mg TE/g en ABTS, 127.47 mg TE/g en FRAP y 63.92 mg GAE/g en contenido fenólico. Estos resultados confirman que la pureza del disolvente también influye significativamente en la eficiencia de extracción.

En el presente estudio, se obtuvo que el extracto crudo metanólico de brácteas de *B. glabra* presentó los valores más altos tanto en capacidad de eliminación de radicales (ABTS) con 84.64 ET μ g/ml, el potencial del extracto para reducir los iones férrico (FRAP) de 165.57 EAG μ g/ml. y el contenido fenólico más alto con 168.98 EAG μ g/ml, lo que refuerza la efectividad del metanol como disolvente en comparación con otros utilizados. Diversos estudios respaldan que los compuestos fenólicos son reconocidos como los principales responsables de la actividad antioxidante en los extractos vegetales (Markandan et al., 2016). Sin embargo, nuestros resultados señalan que al purificar los extractos y aislar únicamente la fracción fenólica, se observó una disminución significativa en la actividad antioxidante. Esta reducción puede estar relacionada con la pérdida de otros compuestos bioactivos presentes en el extracto crudo durante el proceso de purificación (Vázquez-Nuñez et al., 2025). Lo que sugiere que la eficacia antioxidante no depende exclusivamente de los fenoles aislados, sino del efecto sinérgico de todos los metabolitos presentes en el extracto crudo.

Se ha resaltado la capacidad antioxidante de las brácteas de buganvilia, principalmente a la presencia de betalainas, pigmentos naturales que han despertado interés por su potencial quimioprotector frente al estrés oxidativo (Wu et al., 2022). Las betalainas poseen como grupos funcionales a las aminas fenólicas y estructuras cíclicas, que las convierten en excelentes donadoras de electrones, contribuyendo a su capacidad antioxidante. Estudios sobre la betanina, uno de los compuestos más representativos del grupo, indican que su actividad redox se relaciona con propiedades como la energía de disociación de enlace y el potencial de ionización molecular. Otro factor que influye

en la actividad antioxidante de las betalaínas es que varía según el pH del entorno. Las formas desprotonadas, que predominan en medios neutros o básicos, muestran una mayor capacidad para neutralizar radicales libres, en comparación con aquellas presentes en condiciones ácidas (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021). La actividad también parece depender del tipo de betalaína, siendo las betaxantinas, las que suelen mostrar mayor capacidad antioxidante que las betacianinas (Robles et al., 2017). Este último contexto fue confirmado por Jaramillo y colaboradores en 2020, quienes compararon extractos de brácteas naranjas y moradas obtenidos por sonicación. Los resultados mostraron una mayor concentración de compuestos fenólicos en las brácteas naranjas (129.6 mg EAG/g), en contraste con las moradas (79.9 mg EAG/g), lo que respalda la hipótesis de que las betaxantinas tienen una mayor contribución a la actividad antioxidante. Por otro lado, Wu et al. (2022) reportaron que, entre los extractos de diferentes colores de buganvilia, los de tonos púrpura presentaron la actividad más baja en el ensayo ABTS, mientras que los extractos rojos y naranjas fueron más efectivos. Esto se asocia a un mayor contenido de betaxantinas en estos últimos.

En el presente estudio se identificó que el extracto metanólico de las brácteas color magenta de *B. glabra* contenía un mayor nivel de betaxantinas (15.3 mg/mL) en comparación con las betacianinas (13.12 mg/mL). Este resultado difiere de lo reportado por Robles et al. (2017), donde se observó un predominio de betacianinas en brácteas de color magenta. Esta diferencia podría explicarse por el efecto del tratamiento térmico. Se ha reportado que al exponer material vegetal rico en betalaínas a temperaturas de ebullición, ocurre una degradación de las betalaínas, lo que provoca un aumento en la contribución porcentual de los derivados deshidrogenados y descarboxilados, así como la alteración del color. Curiosamente, algunos de estos productos degradados pueden exhibir una actividad antioxidante superior a la del compuesto original, como se ha observado en extractos de remolacha tratados térmicamente (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

Con el fin de identificar los compuestos fitoquímicos responsables de la actividad biológica observada en los extractos de brácteas de *B. glabra*, se empleó al análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), técnica utilizada para la detección de grupos funcionales presentes en compuestos orgánicos (Hajji et al., 2023). El análisis espectral del extracto purificado reveló señales características del grupo hidroxilo (OH), típico de los compuestos fenólicos, así como bandas correspondientes a la vibración de estiramiento C–H, asociada a estructuras aromáticas. También se identificaron enlaces triple carbono-carbono (C≡C) propios de alquinos, y señales atribuidas al grupo carbonilo (C=O), lo cual puede indicar la presencia de flavonoides.

Por otro lado, el espectro del extracto crudo mostró, además de estos grupos, la presencia de una posible banda atribuida a un grupo imina (C=N), lo que sugiere una mayor diversidad de compuestos funcionales.

Estos hallazgos coinciden con los reportados en estudios previos. Por ejemplo, Mahendran y colaboradores (2020) identificaron a través de análisis FTIR en extracto de flor de *B. glabra* la presencia de fenoles, alcanos, aldehídos, ácidos carboxílicos y aminas aromáticas. Asimismo, Napoleón et al. (2013) aislaron betacianinas a partir de brácteas y, mediante esta misma técnica, confirmaron la presencia de grupos funcionales como –OH, C=N, C=O, CO, así como deformaciones en enlaces C–H pertenecientes al anillo bencénico. Además, Kumar et al. (2013) también utilizaron FTIR para caracterizar pigmentos rojos y púrpuras extraídos de *B. glabra*, y detectaron grupos amina (N–H) y carbonilo (C=O), confirmando que estas moléculas corresponden al grupo de las betacianinas dentro de las betalainas.

La caracterización de los compuestos polifenólicos presentes en el extracto de brácteas de *B. glabra* mediante Cromatografía Líquida de Ultra Rendimiento (UPLC-MS), reveló la presencia de dos ácidos fenólicos (ácido chebulínico y ácido p-cumárico), así como cuatro flavonoides (quercetina 3-(2''-feruloylsophoroside), kaempferol 3-(2G-glucosilrutinosido), isorhamnetina 3-glucosil-(1→2)-[ramnosil-(1→6)-galactósido] y robinetina 3-rutinosido) y un carbohidrato (sacarosa). En el estudio realizado por El-Sayed et al. (2020), donde se analizó la fracción de acetato de etilo del extracto de la parte aérea de una variedad de buganvilla ('Scarlett O'Hara') a través de cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-ESI-MS/MS), se identificaron aproximadamente 39 compuestos en modo negativo, predominando los ácidos orgánicos libres, derivados de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas, antocianinas y otros metabolitos secundarios.

En conjunto, estos resultados demuestran la riqueza estructural de los compuestos presentes en las brácteas de *B. glabra* y su posible relación con la actividad antioxidante observada, especialmente por la presencia de compuestos fenólicos y pigmentos naturales como las betalainas.

La creciente aparición de bacterias multirresistentes (MDR) representa una amenaza para los sistemas de salud a nivel mundial, dificultando cada vez más el tratamiento efectivo de infecciones (Song et al., 2021). Esta situación es particularmente preocupante en países en desarrollo, donde la necesidad de medicamentos antimicrobianos eficaces, seguros y accesibles es urgente (Wasihun et al., 2023). La resistencia bacteriana ha aumentado significativamente debido al uso indiscriminado de antimicrobianos, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas,

entre ellas compuestos derivados de fuentes naturales, como las plantas medicinales (Hamdi Abdulkareem et al., 2022).

En este contexto, se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de brácteas de *B. glabra* obtenidos por distintas técnicas de extracción, mediante el método de difusión en pozo. El extracto obtenido por Soxhlet con metanol fue el más eficaz, mostrando las mayores zonas de inhibición. En particular, *Pseudomonas aeruginosa* fue la cepa más sensible con un halo de inhibición de 15.6 mm, seguida por *Staphylococcus epidermidis* (10.6 mm), *S. aureus* (9.6 mm), *Acinetobacter baumannii* (8.3 mm) y, por último, *Escherichia coli*, con menor sensibilidad (4.1 mm).

Estos resultados superan los reportados por Perales y Leysa (2012), quienes observaron una zona de inhibición de solo 7 mm contra *E. coli* y *P. aeruginosa* utilizando extractos etanólicos de flores. Asimismo, Napoleón y colaboradores (2013) evaluaron las betacianinas aisladas de brácteas mediante extracción con metanol acuoso, logrando zonas de inhibición de 5.3 mm contra *P. aeruginosa* y 3.7 mm para *E. coli*. Por su parte, Zahidul et al. (2016) mostraron que los extractos florales de fracciones de n-hexano, tetracloruro de carbono y agua de *B. glabra* eran más activos contra *S. aureus* (17–22 mm) y *E. coli* (15–16 mm), mientras que *P. aeruginosa* presentó menor sensibilidad (0–6 mm). En otro estudio, Cardona et al. (2017) informaron que infusiones etanólicas de flores inhibieron a *S. aureus* (9.4 mm) y *P. aeruginosa* (9.8 mm), resultados más bajos que los obtenidos en este trabajo.

Para una evaluación cuantitativa más precisa, se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) del extracto metanólico de Soxhlet, ya que fue el que mostró mayor actividad en los ensayos previos. Las bacterias Gram negativas presentaron valores más altos de MIC y MBC: *P. aeruginosa* (17.8 mg/ml), *E. coli* (17.3 mg/ml) y *A. baumannii* (16.6 mg/ml). En comparación con las bacterias Gram positivas que mostraron una susceptibilidad ligeramente mayor, con valores de 16.5 mg/ml para *S. epidermidis* y 15.7 mg/ml para *S. aureus*.

Los resultados de los ensayos antibacterianos revelaron que las bacterias Gram negativas fueron menos susceptibles al extracto, probablemente debido a la estructura compleja de su membrana externa, compuesta por una capa de lipopolisacáridos que limita la penetración de compuestos bioactivos. Además, el espacio periplásmico de estas bacterias alberga enzimas capaces de degradar sustancias externas, lo que incrementa su resistencia (Dharmaratne et al., 2018).

Por otro lado, la efectividad del extracto metanólico podría atribuirse a la solubilización de compuestos polares bioactivos, tales como flavonoides, ácidos fenólicos y betalaínas, los cuales han sido previamente asociados con mecanismos antibacterianos. Estos

mecanismos incluyen la desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana celular, alteraciones en la composición de ácidos grasos, inhibición de la captación de nutrientes como la glucosa, aumento en la permeabilidad de la membrana que provoca fugas iónicas (potasio y protones), y la interferencia con funciones enzimáticas esenciales, lo que puede inducir la lisis celular o detener su replicación (Lee et al., 2024).

En particular, algunos flavonoides como la quercetina tienen la capacidad de unirse a enzimas bacterianas clave, como la ADN girasa en *E. coli*, interfiriendo en la replicación del ADN bacteriano y limitando su proliferación. Además, estudios han señalado que la actividad biológica de los extractos vegetales depende de múltiples factores como el tipo de planta, el lugar y época de cosecha, lo cual influye en su composición fitoquímica (Yazdanian et al., 2022).

Hasta la fecha, los valores de MIC y MBC para extractos de *B. glabra* no han sido reportados en la literatura, con la excepción del estudio de Ahmar Rauf et al. (2019), en donde se sintetizaron nanopartículas de óxido de zinc (ZnO-NMs) de un extracto de flor de buganvilia, observando una actividad significativa contra *S. aureus* y *E. coli* con una concentración de 16 µg.

En comparación con otras especies del mismo género, un estudio del extracto floral de *Bougainvillea spectabilis* reportó valores considerablemente más altos de MIC y MBC frente a *E. coli* con 750 y 875 mg/ml, respectivamente y de 625 y 750 mg/ml contra *S. aureus* (Kenari & Razavi, 2022), lo que resalta la mayor potencia del extracto de *B. glabra* obtenido por Soxhlet en este trabajo. Asimismo, resulta pertinente contrastar estos resultados con los de *Beta vulgaris* (betabel), ya que ambas especies pertenecen al orden Caryophyllales y contienen betalainas como metabolitos bioactivos. Spórna-Kucab y colaboradores (2023) evaluaron diferentes variedades de *B. vulgaris*, observando que la cáscara de la variedad Ceryl presentó mayor actividad antimicrobiana, con MIC y MBC de 0.06 a 4 mg/ml para *S. aureus*, 4 mg/ml para *S. epidermidis* y entre 4 y 8 mg/ml para *E. coli*. Estos valores son significativamente menores que los obtenidos para *B. glabra*, lo cual puede atribuirse a la mayor concentración y diversidad de betalainas en *B. vulgaris*. Las betalainas ejercen su acción antimicrobiana alterando la estructura, permeabilidad y funciones celulares de los microorganismos, lo que conduce eventualmente a la muerte celular (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

Estos resultados refuerzan el potencial de *B. glabra* como fuente de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas, especialmente frente a cepas multirresistentes, y justifican futuras investigaciones orientadas a su aislamiento, caracterización y aplicación farmacológica.

Las biopelículas son estructuras complejas formadas por comunidades bacterianas que se adhieren a superficies y se protegen mediante una matriz compuesta por exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular. Esta arquitectura les confiere una resistencia mayor frente a los antibióticos en comparación con las bacterias libres (Song et al., 2019). De hecho, se estima que más del 65 % de las infecciones hospitalarias y hasta el 80 % de las infecciones microbianas en general están relacionadas con la formación de biopelículas (Lagha et al., 2019). Por ello, se han realizado nuevos estudios para encontrar nuevos compuestos de origen natural capaces de interferir con la formación de biopelículas.

Aunque la actividad antibiopelícula de *B. glabra* no ha sido reportada previamente, en este estudio se evaluó por primera vez su potencial para inhibir la formación de biopelículas en diversas bacterias patógenas. El extracto metanólico de *B. glabra* mostró una potente inhibición frente a *S. epidermidis*, logrando impedir hasta el 94% la formación de biopelícula con solo 2.9 mg/ml, mientras que *S.aureus* inhibió el 85 % a 4.6 mg/ml. En el caso de *E. coli*, una concentración de 8 mg/ml logró reducir la formación de biopelícula en un 93 %. Para *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, las concentraciones efectivas fueron de 17.1 y 17.7 mg/ml, respectivamente, logrando inhibiciones del 98 % y 100 %.

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal (CLSM) confirmaron estos resultados, mostrando una reducción significativa en la densidad y espesor de las biopelículas tras el tratamiento con el extracto. A una concentración de 11.4 mg/ml, se observó una desorganización evidente de la estructura tridimensional, con una matriz exopolisacárida mucho más dispersa y delgada, lo que sugiere una alteración efectiva en la formación de la biopelícula y su integridad.

Además del efecto inhibitorio observado, es importante considerar los posibles mecanismos a través de los cuales los compuestos presentes en este extracto ejercen su acción. Uno de los mecanismos más relevantes es la capacidad del extracto para interferir con la fase inicial de adhesión bacteriana a superficies abióticas. Esto podría explicarse por la formación de una película desfavorable sobre la superficie que impide la unión estable de las células bacterianas, promoviendo su desprendimiento. Algunos componentes del extracto podrían alterar las proteínas de superficie de las bacterias, dificultando la fijación y posterior formación de la biopelícula (Lagha et al., 2019).

Además, compuestos fitoquímicos como flavonoides, glicósidos, ácidos fenólicos y ácidos tánicos pueden actuar rompiendo la matriz de exopolisacáridos (EPS), afectando la integridad estructural de la biopelícula madura. Estos compuestos también pueden desestabilizar las membranas bacterianas, inhibir enzimas clave en la formación de la

biopelícula, interrumpir la función de estructuras de adhesión como las fimbrias, o incluso alterar la expresión génica relacionada con la formación de biopelículas y la comunicación bacteriana por detección de quórum (Hou et al., 2022).

El extracto de *B. glabra* mostró la capacidad para reducir la masa y densidad de las biopelículas, por microscopía confocal. Esta acción podría estar relacionada con mecanismos combinados como la inhibición de la unión bacteriana inicial, la interrupción del sistema de señalización por quórum y la alteración de las interacciones fisicoquímicas entre las bacterias y la superficie (Gemmell et al., 2022).

Un mecanismo adicional reportado para los flavonoides es su capacidad de neutralizar radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta acción antioxidante no solo protege a las células huésped, sino que también modifica el microambiente bacteriano, incluido su pH, dificultando la estabilidad de las biopelículas. Este cambio ambiental puede desestabilizar la adhesión y la integridad de la matriz de la biopelícula (Miao et al., 2020).

Los resultados obtenidos en este estudio pueden compararse con los hallazgos de Yong y colaboradores (2019), quienes evaluaron el efecto antibiopelícula de betacianinas extraídas de pitahaya roja (*Hylocereus polyrhizus*) y espinaca roja (*Amaranthus dubius*). En ese trabajo, las fracciones de betacianinas mostraron su capacidad para inhibir la formación de biopelículas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. La fracción de espinaca roja fue más eficaz contra las biopelículas de *S. aureus*, con concentraciones inhibitorias mínimas (MBIC) entre 0.313 y 1.25 mg/ml. En cambio, la pitahaya roja mostró mejor actividad contra *P. aeruginosa*, con MBIC de 0.313 a 0.625 mg/ml, siendo más efectivas que las de *B. glabra*. Esta diferencia podría estar relacionada con la estructura específica de las betacianinas presentes en cada planta, que influye en su capacidad de interferir con la adhesión bacteriana y el desarrollo de la biopelícula. Además, en dicho estudio se observó que las betacianinas modificaban la interacción entre la superficie celular bacteriana y sustratos como poliestireno y vidrio. Estas fracciones, especialmente las hidrofílicas, redujeron la hidrofobicidad de las células bacterianas, disminuyendo su adhesión a superficies más hidrófobas como el poliestireno. Este mecanismo sugiere que las betacianinas no solo afectan la matriz de la biopelícula, sino que también interfieren con la fase inicial de fijación bacteriana.

En comparación, aunque el extracto metanólico de *B. glabra* no alcanzó los bajos niveles de MBIC reportados en el estudio de Yong et al., sí demostró una alta eficacia en la inhibición de biopelículas formadas por varias cepas patógenas, lo que respalda su potencial como agente terapéutico natural. Es posible que su efecto esté mediado por mecanismos similares, como la alteración de la superficie celular, la interferencia en la

adhesión inicial, o la disrupción directa de la matriz de exopolisacáridos de la biopelícula. Esta comparación resalta la relevancia de las sustancias polares vegetales, como las betacianinas y los flavonoides, en la prevención y control de infecciones bacterianas asociadas a biopelículas.

Los extractos vegetales ricos en fitoquímicos pueden tener efectos benéficos como adversos, por lo que es fundamental evaluar su seguridad. Para este propósito, los ensayos in vitro con líneas celulares son herramientas comunes, que permiten detectar citotoxicidad de forma eficiente y a bajo costo (Bunyakitcharoen et al., 2024).

En este estudio, se utilizó la línea celular epitelial de tráquea de cerdo recién nacido (NPT_r) para investigar si el extracto de *B. glabra* afectaba la viabilidad celular. Esta línea ha demostrado ser útil en investigaciones sobre mecanismos de infección bacteriana (Delgado-Ortega et al., 2014). Para evaluar posibles efectos apoptóticos, se aplicaron marcadores específicos. Para el reconocimiento de núcleos se empleó Hoechst y Alexa Fluor 488 para visualizar el citoesqueleto de actina. Tras 24 horas de exposición a 5.7 mg/ml del extracto, las células no mostraron alteraciones morfológicas evidentes, presentando núcleos uniformes y un citoesqueleto bien definido, lo que sugiere la ausencia de toxicidad celular. Esto contrasta con otro estudio en el que se sintetizaron nanopartículas de plata (AgNPs) a partir de extractos de flor de *B. glabra*. En ese caso, las células tratadas con 25 y 50 µg/mL mostraron signos claros de apoptosis, como condensación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos (Oves et al., 2023).

Otros trabajos también han evaluado la seguridad del extracto de *B. glabra* y en general han concluido que no presenta toxicidad significativa. En un estudio con células humanas hepáticas (WRL-68) y renales (Vero), el extracto etanólico mostró valores de IC₅₀ superiores a los del control negativo, lo que indica baja citotoxicidad (Shalini et al., 2018). En estudios con embriones de pez cebra, se observaron algunos efectos leves, como edemas y alteraciones en la pigmentación, tras la exposición a extractos de brácteas de distintos colores. Sin embargo, no se detectaron malformaciones importantes, por lo que el extracto no fue clasificado como tóxico (Teh et al., 2019). Adicionalmente, extractos de flores de *B. glabra* han mostrado actividad selectiva frente a células cancerosas, como las de cuello uterino y colon, sin dañar células sanas, probablemente debido a la acción proapoptótica de ciertos compuestos fenólicos (Saleem et al., 2019; Yerlikaya et al., 2017). Por último, ensayos de toxicidad en ratas Wistar expuestas a extractos metanólicos durante 90 días no revelaron alteraciones significativas a nivel hematológico, bioquímico ni histológico. (Krishna y Sundararajan, 2020).

En conjunto, estos hallazgos respaldan que *B. glabra* no presenta toxicidad relevante en modelos celulares ni animales, lo que refuerza su potencial como fuente segura de compuestos bioactivos.

10. Conclusión

Entre los diferentes métodos de extracción evaluados, el sistema Soxhlet, utilizando como disolvente metanol, demostró ser el más eficaz. Este método proporcionó el mayor rendimiento del extracto, así como el contenido más alto de compuestos fenólicos totales y una actividad antioxidante significativamente superior en los ensayos ABTS y FRAP, en comparación con la maceración y la sonicación. El análisis FTIR confirmó la presencia de grupos funcionales característicos de compuestos fenólicos, flavonoides, betalainas, así como otros compuestos. Mientras que la caracterización por UPLC reveló compuestos de relevancia farmacológica como quercetina, kaempferol, isorhamnetina y robinetina, además de ácidos fenólicos como el ácido *p*-cumárico y ácido chebulínico, lo que sustenta el potencial terapéutico de las brácteas de *B. glabra*.

El extracto demostró una actividad antimicrobiana efectiva contra diferentes bacterias patógenas de importancia médica. Reportando la mayor zona de inhibición contra *P. aeruginosa* (15.6 mm). Los valores de MIC y MBC confirmaron la eficacia bactericida del extracto, frente a cepas Gram positivas y negativas. Este efecto puede atribuirse a la acción sinérgica de los compuestos presentes en el extracto.

El extracto inhibió de forma significativa la formación de biopelículas bacterianas. Registrando una inhibición del 100 % contra *P. aeruginosa* a 17.7 mg/ml y del 94 % en *S. epidermidis* a 2.9 mg/ml. Estas cifras indican una capacidad notable del extracto para impedir la adhesión bacteriana y alterar la matriz de la biopelícula, hecho que se demostró también mediante microscopía confocal, donde se observó una biopelícula más delgada y fragmentada tras el tratamiento con el extracto.

También se confirmó la baja citotoxicidad del extracto en células epiteliales de tráquea de cerdo (NPT_r), donde no se observaron alteraciones morfológicas relevantes en los núcleos y el citoesqueleto de actina se mantuvo intacto tras la exposición a 5.7 mg/ml del extracto. Lo que sugiere que el extracto no induce apoptosis ni afecta la integridad celular.

En general, los resultados respaldan el uso de *Bougainvillea glabra* como nueva fuente de compuestos bioactivos naturales. Su aplicación podría extenderse a áreas como la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria, así como su uso como desinfectante, principalmente como antioxidante, antimicrobiano o agente antibiopelícula de origen vegetal. No obstante, se recomienda continuar con estudios de aislamiento y purificación de compuestos específicos, así como con ensayos in vivo para validar su eficacia y seguridad en modelos biológicos más complejos.

11. Bibliografía

1. Abarca-Vargas, R., & Petricevich, V. L. (2018). Bougainvillea genus: A review on phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2018, 9070927. <https://doi.org/10.1155/2018/9070927>
2. Abarca-Vargas, R., Peña Malacara, C. F., & Petricevich, V. L. (2016). Characterization of Chemical Compounds with Antioxidant and Cytotoxic Activities in *Bougainvillea x buttiana* Holttum and Standl, (var. Rose) Extracts. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 5(4), 45. <https://doi.org/10.3390/antiox5040045>
3. Abubakar, AR y Haque, M. (2020). Preparación de plantas medicinales: procedimientos básicos de extracción y fraccionamiento con fines experimentales. *Revista de farmacia y ciencias biológicas*, 12 (1), 1-10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19.
4. Ahmar Rauf, M., Oves, M., Ur Rehman, F., Rauf Khan, A., & Husain, N. (2019). Bougainvillea flower extract mediated zinc oxide's nanomaterials for antimicrobial and anticancer activity. *Biomedecine & Pharmacotherapie [Biomedicine & Pharmacotherapy]*, 116(108983), 108983. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108983>
5. Alanís-Garza, B., González-González, G., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N., Rivas-Galindo, V. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 114 (3) 468–471
6. Ali, M. S., Ibrahim, S. A., Ahmed, F., & Pervez, M. K. (2003). Color versus bioactivity in the flowers of *Bougainvillea spectabilis* (Nyctaginaceae). *Natural Product Research*, 19(1), 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786410310001630609>
7. Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
8. Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants (Basel, Switzerland)*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
9. Amrane-Abider, M., Imre, M., Herman, V., Debbou-louknane, N., Zemouri-Alioui, S., Khaled, S., Bouiche, C., Nerín, C., Acaroz, U., & Ayad, A. (2023). Bioactive compounds and in vitro antioxidant and anticoccidial activities of *Opuntia ficus-indica* flower extracts. *Biomedicines*, 11(8), 2173.
10. Aranda-Ledesma, N. E., González-Hernández, M. D., Rojas, R., Paz-González, A. D., Rivera, G., Luna-Sosa, B., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2022). Essential oil and polyphenolic compounds of *Flourensia cernua* leaves: Chemical profiling and functional properties. *Agronomy (Basel, Switzerland)*, 12(10), 2274. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102274>
11. Asma, S. T., Imre, K., Morar, A., Imre, M., Acaroz, U., Shah, S. R. A., Hussain, S. Z., Arslan-Acaroz, D., Istanbulgil, F. R., Madani, K., Athanassiou, C., Atanasoff, A., Morar, D., Herman, V., & Zhu, K. (2022). Natural strategies as potential weapons against bacterial biofilms. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(10), 1618. <https://doi.org/10.3390/life12101618>.
12. Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal (2a. ed.). Madrid, Spain: McGraw-Hill España. Recuperado de <https://elibro.net/es/ereader/uaa/50269?page=341>.
13. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013).: *Techniques for extraction of bioactive*

- compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01
14. Barkociová, M., Tóth, J., Sutor, K., Drobnicka, N., Wybraniec, S., Dudík, B., Bilková, A., and Czigle S. (2021). Betalains in Edible Fruits of Three Cactaceae Taxa—Epiphyllum, Hylocereus, and Opuntia—Their LC-MS/MS and FTIR Identification and Biological Activities Evaluation. *Plants*, 10(12), 2669. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/plants10122669>.
 15. Barnes, M., Sulé-Suso, J., Millett, J., & Roach, P. (2023). Fourier transform infrared spectroscopy as a non-destructive method for analysing herbarium specimens. *Biology Letters*, 19(3), 20220546. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0546>
 16. Bautista-Hernández, I., Aranda-Ledesma, N. E., Rojas, R., Tafolla-Arellano, J. C., & Martínez-Ávila, G. C. G. (2021). Antioxidant activity of polyphenolic compounds obtained from Euphorbia antisiphilitica by-products. *Heliyon*, 7(4), e06734. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06734>
 17. Bhalodia, N. R., Nariya, P. B., Acharya, R. N., & Shukla, V. J. (2013). In vitro antioxidant activity of hydro alcoholic extract from the fruit pulp of Cassia fistula Linn. *Ayu*, 34(2), 209–214. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.119684>
 18. Birch, H., Redman, A. D., Letinski, D. J., Lyon, D. Y., & Mayer, P. (2019). Determining the water solubility of difficult-to-prueba substances: A tutorial review. *Analytica Chimica Acta*, 1086, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.034>
 19. Borges, A., José, H., Homem, V., & Simões, M. (2020). Comparison of Techniques and Solvents on the Antimicrobial and Antioxidant Potential of Extracts from Acacia dealbata and Olea europaea. *Antibiotics*, 9(2), 48. doi:10.3390/antibiotics9020048
 20. Bunyakitcharoen, A., Taychaworaditsakul, W., Sireeratawong, S., & Chansakaow, S. (2024). Anti-hyperglycemic effects of Thai herbal medicines. *Plants*, 13(20). <https://doi.org/10.3390/plants13202862>
 21. Burke, Ó., Zeden, M. S., & O’Gara, J. P. (2024). The pathogenicity and virulence of the opportunistic pathogen *Staphylococcus epidermidis*. *Virulence*, 15(1), 2359483. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2359483>
 22. Büttner, H., Mack, D., & Rohde, H. (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00014>
 23. Cabildo Miranda, M. D. P. (2008). Química orgánica. Madrid, Spain, UNED - Universidad Nacional de Educación a Distancia.
 24. Cáceres A. 1996. Plantas de Uso Medicinal de Guatemala. Primera Edición. Editorial Universitaria, USAC.
 25. Cao, Y., Naseri, M., He, Y., Xu, C., Walsh, L. J., & Ziora, Z. M. (2020). Non-antibiotic antimicrobial agents to combat biofilm-forming bacteria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 445–451. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.11.012>
 26. Cardona, L., Rodríguez, C., Clavijo, A. (2017). Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *Bougainvillea glabra* Choisy (veranera). *Revista Nova*, 3, 39-46.
 27. Carmona-Hernández, J. C., Taborda-Ocampo, G., & González-Correa, C. H. (2021). Folin-Ciocalteu reaction alternatives for higher polyphenol quantitation in Colombian passion fruits. *International Journal of Food Science*, 2021, 8871301. <https://doi.org/10.1155/2021/8871301>
 28. Castro-López, C., Sánchez-Alejo, E. J., Saucedo-Pompa, S., Rojas, R., Aranda-Ruiz, J., & Martínez-Avila, G. C. G. (2016). Fluctuations in phenolic

- content, ascorbic acid and total carotenoids and antioxidant activity of fruit beverages during storage. *Heliyon*, 2(9), e00152. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2016.e00152>
29. Checa, J., & Aran, J. M. (2020). Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes. *Journal of Inflammation Research*, 13, 1057–1073. <https://doi.org/10.2147/JIR.S275595>
 30. Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00389-5>
 31. Chiocchio, I., Mandrone, M., Tomasi, P., Marincich, L., & Poli, F. (2021). Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 495. <https://doi.org/10.3390/molecules26020495>
 32. Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI (2023). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Pruebaing. Recuperado de: www.clsi.org
 33. Cuapio-Rodriguez, M. Á., Domínguez, Y. L., Hernández, J. A. M., Minutti, L. S., García-Barrientos, R., Juárez, E. S., & Santiago-Santiago, y. L. A. (2024). Determinación de la actividad antioxidantes por el método DPPH y ABTS en hongos comestibles. *Revista Politécnica de Aguascalientes*, 3 (3).
 34. Delgado-Ortega, M., Melo, S., Punyadarsaniya, D., Ramé, C., Olivier, M., Soubieux, D., Marc, D., Simon, G., Herrler, G., Berri, M., Dupont, J., & Meurens, F. (2014). Innate immune response to a H3N2 subtype swine influenza virus in newborn porcine trachea cells, alveolar macrophages, and precision-cut lung slices. *Veterinary Research*, 45(1), 42. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-42>
 35. Devadiga, D., and Ahipa, T. (2020). Betanin: A Red-Violet Pigment - Chemistry and Applications. Chemistry and Technology of Natural and Synthetic Dyes and Pigments. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.88939
 36. Dhankhar, S., Sharma, M., Ruhil, S., Balhara, M., Kumar, M., Chhillar, A. (2013). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of *Bougainvillea spectabilis*. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 5 (3), 178-182.
 37. Dharmaratne, M. P. J., Manoraj, A., Thevanesam, V., Ekanayake, A., Kumar, N. S., Liyanapathirana, V., Abeyratne, E., & Bandara, B. M. R. (2018). Terminalia bellirica fruit extracts: in-vitro antibacterial activity against selected multidrug-resistant bacteria, radical scavenging activity and cytotoxicity study on BHK-21 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 325. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2382-7>
 38. Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat: This article is part of the Microbe Profiles collection. *Microbiology (Reading, England)*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
 39. Dupont (2022). DuPont™ AmberLite™ XAD™ 16N Polymeric Adsorbent Resins. Recuperado de: <https://www.dupont.com/products/amberlitexad16n.html>
 40. Edwin, E., Sheeja, E., Toppo, E., Tiwari, V., Dutt, KR. (2007). Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy). *Ars Pharm*, 48 (2), 135-144
 41. El-sayed, M., Abbas, F., Refaat, S., El-Shafae, A., & Fikry, E. (2020). UPLC-ESI-MS/MS profile of the ethyl acetate fraction of aerial parts of bougainvillea “Scarlett O’Hara” cultivated in Egypt. *Egyptian Journal of Chemistry*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2020.45694.2933>

42. Elisha, I. L., Botha, F. S., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. (2017). The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1645-z>
43. Enciso-Díaz, O. J., Méndez-Gutiérrez, A., Jesús, L. H. D., Sharma, A., Villarreal, M. L., & Taketa, A. C. (2012). Antibacterial Activity of *Bougainvillea Glabra*, *Eucalyptus Globulus*, *Gnaphalium Attenuatum*, and Propolis Collected in Mexico. *Pharmacology & pharmacy*, 03(04), 433–438. <https://doi.org/10.4236/pp.2012.34058>
44. Esnard, S. C., Moya, A., Cedré, B., Valmaseda, T., Navarro, Y., González, G. (2004). *Pseudomonas aeruginosa vacunas: un reto a la investigación*. *VacciMonitor* 13(1): 1-13. Instituto Finlay.
45. Expósito Boue, Lourdes Margarita, Bermellón Sánchez, Sixto, Lescaille Garbey, Laritza, Delgado Rondón, Nuria, & Aliaga Castellanos, Iliagne. (2019). Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en pacientes con infección del tracto urinario. *Revista Información Científica*, 98(6), 755-764
46. Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., Iranshahy, M., 2018 Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship, *Phytotherapy Research*, 33, p 13-40.
47. Fletes-Vargas, G., Rodríguez-Rodríguez, R., Pacheco, N., Pérez-Larios, A., & Espinosa-Andrews, H. (2023). Evaluation of the biological properties of an optimized extract of *Polygonum cuspidatum* using ultrasonic-assisted extraction. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(10), 4079. <https://doi.org/10.3390/molecules28104079>
48. Flores-Villa, Emmanuel, Sáenz-Galindo, Aidé, Castañeda-Facio, Adali Oliva, & Narro-Céspedes, Rosa Idalia. (2020). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23, e20200266. Epub 05 de marzo de 2021. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>
49. Fotsing Yannick Stéphane, F., Kezetas Jean Jules, B., El-Saber Batiha, G., Ali, I., & Ndjakou Bruno, L. (2022). Extraction of bioactive compounds from medicinal plants and herbs. En H. A. El-Shemy (Ed.), *Natural Medicinal Plants*. IntechOpen.
50. Gedefie, A., Demsis, W., Ashagrie, M., Kassa, Y., Tesfaye, M., Tilahun, M., Bisetegn, H., & Sahle, Z. (2021). *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: A review. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3711–3719. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332051>
51. Gemmell, C. T., Parreira, V. R., & Farber, J. M. (2022). Controlling *Listeria monocytogenes* growth and biofilm formation using flavonoids. *Journal of Food Protection*, 85(4), 639–646. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-135>
52. Gómez, U., Barbosa, L., Petricevich, V. (2016). Estudio preliminar del efecto hipoglucémico del extracto de *Bougainvillea xbutiana* (variedad naranja) en modelo murino. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47 (3), 60-66.
53. González, M. (2008). Árboles y arbustos de los parques y jardines del norte-centro de México. México, México: Instituto Politécnico Nacional. Pág. 97.
54. Güllüce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., & Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103(4), 1449–1456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061>
55. Guo, H., Tong, Y., Cheng, J., Abbas, Z., Li, Z., Wang, J., Zhou, Y., Si, D., & Zhang, R. (2022). Biofilm and small colony variants-an update on *Staphylococcus aureus* strategies toward drug resistance. *International*

56. Gupta, V., George, M., Joseph, L., Singhal, M., Singh, H.P. (2009). Evaluation of antibacterial activity of *Bougainvillea glabra* 'snow white' and *Bougainvillea glabra* 'choicy'. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 1(1): 233-237.
57. Hajji Nabih, M., Boulika, H., El Hajam, M., Alghonaim, M. I., Kandri, N. I., Alsalamah, S. A., & Boufahja, F. (2023). Successive solvent extraction, characterization and antioxidant activities of cardoon waste (leaves and stems) extracts: Comparative study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(3), 1129. <https://doi.org/10.3390/molecules28031129>
58. Hamdi Abdulkareem, M., Abbas Abood, I., & Munis Dakheel, M. (2022). Antimicrobial resistance of tannin extract against *E. coli* isolates from sheep. *Archives of Razi Institute*, 77(2), 697–701. <https://doi.org/10.22092/ARI.2022.356982.1955>
59. Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nature Reviews. Microbiology*, 16(2), 91–102. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>
60. Hathroubi, S., Beaudry, F., Provost, C., Martelet, L., Segura, M., Gagnon, C. A., & Jacques, M. (2016). Impact of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilm mode of growth on the lipid A structures and stimulation of immune cells. *Innate Immunity*, 22(5), 353–362. <https://doi.org/10.1177/1753425916649676>
61. Hernández-Cuellar, E., Guerrero-Barrera, A. L., Avelar-Gonzalez, F. J., Díaz, J. M., Santiago, A. S. de, Chávez-Reyes, J., & Poblano-Sánchez, E. (2022). Characterization of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilm on different surfaces. *Revista Iberoamericana de Micología*, 39(2), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2022.04.001>
62. Hou, S., Guo, J., Liu, L., Qiu, F., & Liu, X. (2022). Antibacterial and antibiofilm activity of *Lagotis brachystachya* extract against extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* from broiler chickens. *Poultry Science*, 101(1), 101555. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101555>
63. Ingle, K., Deshmukh, A., Padole, D., Dudhare, M., Moharil, M., and Khelurkar, V. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts, 6 (1), 32-36. <https://www.phytojournal.com/archives?year=2017&vol=6&issue=1&ArticleId=1058>
64. Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
65. Jaramillo J., C., Armijos A., J. C., Cedeño S., R., Campo F., M., & Rojas, L. (2021). Comparación de la relación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante en brácteas de dos variedades de *Bougainvillea glabra* Choisy. *Infoanalítica (Quito - Impresa)*, 9(1), 167–179. <https://doi.org/10.26807/ia.v9i1.203>
66. Kaisoon, O., Konczak, I., & Siriamornpun, S. (2012). Potential health enhancing properties of edible flowers from Thailand. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 46(2), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.016>
67. Keita, K., Darkoh, C., & Okafor, F. (2022). Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. *SN Applied Sciences*, 4(8), 209. <https://doi.org/10.1007/s42452-022-05084-y>

68. Kenari, R. E., & Razavi, R. (2022). Encapsulation of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*) flower extract in *Urtica dioica* L. seed gum: Characterization, antioxidant/antimicrobial properties, and in vitro digestion. *Food Science & Nutrition*, 10(10), 3436–3443. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2944>
69. Kodjapashis, M. P., Zentelis, A. D., Zagklis, D. P., Sygouni, V., & Paraskeva, C. A. (2023). Resin adsorption of phenolic compounds from Olive leaf and coffee residue extracts: Batch and packed column adsorption experimental investigation and mathematical modeling. *Separations*, 10(5), 313. <https://doi.org/10.3390/separations10050313>.
70. Kuhn, F., Santos Dorneles, M., & Pelayo Zapata Noreña, C. (2022). Accelerated stability pruebaing and simulated gastroinpruebainal release of encapsulated betacyanins and phenolic compounds from *Bougainvillea glabra* bracts extract. *Food Chemistry*, 393(133391), 133391. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133391>
71. Kumar, S., Kumar, S., Sharmila, G., Muthukumaran, C. (2013). Extraction optimization and characterization of water-soluble red purple pigment from floral bracts of *Bougainvillea glabra*. *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2), S2145-S2150. doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.047>
72. Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology International*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
73. Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, 10(3), 373. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
74. Lagha, R., Ben Abdallah, F., AL-Sarhan, B. O., & Al-Sodany, Y. (2019). Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6), 1161. <https://doi.org/10.3390/molecules24061161>
75. Lee, J.-E., Jayakody, J. T. M., Kim, J.-I., Jeong, J.-W., Choi, K.-M., Kim, T.-S., Seo, C., Azimi, I., Hyun, J.-M., & Ryu, B.-M. (2024). The influence of solvent choice on the extraction of bioactive compounds from Asteraceae: A comparative review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/foods13193151>.
76. Li, X., Zhang, Z.-H., Qiao, J., Qu, W., Wang, M.-S., Gao, X., Zhang, C., Brennan, C. S., & Qi, X. (2022). Improvement of betalains stability extracted from red dragon fruit peel by ultrasound-assisted microencapsulation with maltodextrin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 82(105897), 105897. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105897>
77. Linares, C., Quiñones, J., Pérez, A., Carvajal, C., Rivas, M., Cid, G., Pérez, L., La Rosa, S., y Capdesuñer, Y. (2018). Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Bioteconología Vegetal*, 18(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/575>.
78. Liu, X. (2021). Organic Chemistry I. Kwantlen Polytechnic University. <https://kpu.pressbooks.pub/organicchemistry/>
79. Loera-Muro, V. M., Jacques, M., Tremblay, Y. D. N., Avelar-González, F. J., Loera Muro, A., Ramírez-López, E. M., Medina-Figueroa, A., González-Reynaga, H. M., & Guerrero-Barrera, A. L. (2013). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in drinking water from pig farms. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt_3), 536–544. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057992-0>

80. Londoño, J. (2012). [Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad](#). Colombia: Corporación Universitaria Lasallista.
81. López González, G. A. (2008). Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares. Tomo I (2a. ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa. Pág. 374.
82. López Sánchez, Claudia, Gonzáles, Yesenia, Méndez, Donaji & Palma Cruz, Felipe. (2022). Las saponinas y su uso farmacéutico. *Revista del centro de graduados e investigación. Instituto tecnológico de Mérida*, 13(96), 120-126.
83. López, M.T. (2001). Saponósidos. *Ámbito Farmacéutico, Fitoterapia. OFFARM*, 20(06), 124-128.
84. Mahendran, G. B., Ramalingam, S. J., Rayappan, J. B. B., Kesavan, S., Periathambi, T., & Nesakumar, N. (2020). Green preparation of reduced graphene oxide by Bougainvillea glabra flower extract and sensing application. *Journal Of Materials Science Materials In Electronics*, 31(17), 14345-14356. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-03994-4>
85. Mannino, G., Serio, G., Gaglio, R., Maffei, M. E., Settanni, L., Di Stefano, V., & Gentile, C. (2023). Biological activity and metabolomics of *Griffonia simplicifolia* seeds extracted with different methodologies. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/antiox12091709>
86. Markandan, S., Abdullah, A., Musa, K. H., Subramaniam, V., & Stockham, K. (2016). Determination of antioxidant activities, total phenolic and flavanoid contents in *Bougainvillea glabra* bracts at various methanol concentrations. *AIP Conference Proceedings*.
87. Mendonça, J. da S., Guimarães, R. de C. A., Zorgetto-Pinheiro, V. A., Fernandes, C. D. P., Marcelino, G., Bogo, D., Freitas, K. de C., Hiane, P. A., de Pádua Melo, E. S., Vilela, M. L. B., & Nascimento, V. A. do. (2022). Natural antioxidant evaluation: A review of detection methods. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(11), 3563. <https://doi.org/10.3390/molecules27113563>
88. Miao, W., Sheng, L., Yang, T., Wu, G., Zhang, M., Sun, J., & Ainiwaer, A. (2020). The impact of flavonoids-rich Ziziphus jujuba Mill. Extract on Staphylococcus aureus biofilm formation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-2833-9>
89. Molina Abril, J. A. (2019). Botánica aplicada. Madrid: Dextra Editorial, p. 128.
90. Mondragón, P. (2017). Espectroscopia de infrarrojo para todos... y 51 espectros de alimentos consumidos en México. Jalisco, México: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C.
91. Montesano, D., & Gallo, M. (2023). Sustainable approaches for the extraction and characterization of phytochemicals from food matrices. En *Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach* (pp. 103–118). Elsevier.
92. Moreno-González, M. E., & Ruiz-Galindo, E. (2007). *Staphylococcus epidermidis* formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. *Revista Medica Del Hospital General de México*, 70(1), 24-29.
93. Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
94. Najafpour, G. D. (2007). Downstream Processing. En *Biochemical Engineering and Biotechnology* (pp. 170–198). Elsevier.
95. Napoleón, A., Swetha, S., y Angajala, G. (2013). In-vitro anti oxidant and anti bacterial studies of betacyanin isolated from the bracts of bougainvillea glabra. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (4), 84-87.
96. Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>

97. Norma Mexicana (2015). Análisis de agua - medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas – método de prueba (CANCELA A LA NMX-AA-034-SCFI-2001). Recuperado de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166146/nmx-aa-034-scfi-2015.pdf>
98. Núñez, C. (2008). Extracciones con Equipo Soxhlet. Recuperado de: www.cenunez.com.ar
99. Ochoa Pacheco, A., Marin Moran, J., Rivero Breff, D., & Aguilera Saborit, E. M. (2013). Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(1), 52–59.
100. Oliveira, R. N., Mancini, M. C., Oliveira, F. C. S. de, Passos, T. M., Quilty, B., Thiré, R. M. da S. M., & McGuinness, G. B. (2016). FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 21(3), 767–779. <https://doi.org/10.1590/s1517-707620160003.0072>
101. Oluwaseun, R., Nour, H., Chinonso I. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity, *ELSEVIER*, 11, 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.07.003>
102. OMS (2018). *E. coli*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
103. OMS (2021) Resistencia a los antimicrobianos. Who.int. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
104. Ordoudi, S. A., Strani, L., & Cocchi, M. (2023). Toward the non-targeted detection of adulterated virgin Olive oil with edible oils via FTIR spectroscopy & chemometrics: Research methodology trends, gaps and future perspectives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(1), 337. <https://doi.org/10.3390/molecules28010337>
105. Otto M. (2009). Staphylococcus epidermidis: el patógeno "accidental". *Reseñas de la naturaleza. Microbiología*, 7 (8), 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>.
106. Oves, M., Rauf, M. A., & Qari, H. A. (2023). Therapeutic applications of biogenic silver nanomaterial synthesized from the paper flower of *Bougainvillea glabra* (Miami, pink). *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/nano13030615>
107. Pakbin, B., Brück, W. M., & Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
108. Pandey, A., y Tripathi, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013;2(5):115–9.
109. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
110. Pasachova Garzón, J, Ramírez Martínez, S, & Muñoz Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *Nova*, 17(32), 25-38.
111. Patel, K. M., Parmar, B. B., Sadariya, K. A., & Bhavsar, S. K. (2022). Assessment of in vitro antibacterial activity and MIC of cinnamon bark powder ethanolic and aqueous extracts against bacteria. *The journal of phytopharmacology*, 11(5), 324–329. <https://doi.org/10.31254/phyto.2022.11502>

112. Perales, Y., Leysa, M. (2012). Phytochemical Screening and Antibacterial Acitivity of Bougainvillea Glabra Plant Extract as Potential Sources of Antibacterial and Resistance-modifying Agents. *International Conference on Life Science and Engineering*, 45 (25), 121-125.
113. Pickering, W. F. (1980). Química analítica moderna. Barcelona, España, Editorial Reverté.
114. Pinilla, G., Muñoz, L., Ruiz, A., Chavarro, B., & Cifuentes, Y. (2009). Aislamiento de *Staphylococcus epidermidis* portador de integrón clase 1 en un paciente con sepsis neonatal. *Infectio: revista de la Asociacion Colombiana de Infectología*, 13(3), 196–202. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70150-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70150-X)
115. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*, 7(5), 647–671. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.7>
116. Ramírez-Castillo, F. Y., Loera-Muro, A., Vargas-Padilla, N. D., Moreno-Flores, A. C., Avelar-González, F. J., Harel, J., Jacques, M., Oropeza, R., Barajas-García, C. C., & Guerrero-Barrera, A. L. (2018). Incorporation of Actinobacillus pleuropneumoniae in Preformed Biofilms by Escherichia coli Isolated From Drinking Water of Swine Farms. *Frontiers in veterinary science*, 5, 184. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00184>
117. Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
118. Ringuelet, J. A. (2013). Productos naturales vegetales. La Plata: D - Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, p.19.
119. Robles, M., Jaramillo, C., Rojas, L. (2017). Contenido de betalainas y actividad antioxidante en brácteas de *Bougainvillea glabra* Choisy. *Revista Cubana de Farmacia*, 51 (2). Recuperado de <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/226/132>
120. Rodríguez-Angeles, Guadalupe. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
121. Román, N., Aniceto, C., Pineda, S., Alatraste, I., y Rivera, V. (2014). Extracción y estudio cinético de la degradación de las betalainas presentes en la bugambilia fucsia (*bougainvillea* sp), una alternativa como colorante alimentario. Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz.
122. Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2021). Biological properties and applications of betalains. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2520. <https://doi.org/10.3390/molecules26092520>
123. Saeloh, D., & Visutthi, M. (2021). Efficacy of Thai plant extracts for antibacterial and anti-biofilm activities against pathogenic bacteria. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1470. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121470>
124. Saleem, H., Usman, A., Fawzi, M., y Ahemad, N. (2021). *Bougainvillea glabra* (choisy): A comprehensive review on botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 113356. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113356>
125. Saleem, H., Zengin, G., Ahmad, I., Lee, J. T. B., Htar, T. T., Mahomoodally, F. M., Naidu, R., & Ahemad, N. (2019). Multidirectional insights into the biochemical and toxicological properties of *Bougainvillea glabra* (Choisy.) aerial parts: A functional approach for bioactive compounds. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 170, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.027>

126. Sánchez-Valle, V., & Méndez-Sánchez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Medigraphic.com. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms133e.pdf>
127. Sandoval Ortega, M. H., Siqueiros Delgado, M. E., Cerros Tlatilpa, R., & Ocampo, G. (2020). La familia Nyctaginaceae (Caryophyllales) en Aguascalientes, México. *Acta botanica mexicana*, 127. <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1673>
128. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, KM y Yoga Latha, L. (2011). Extracción, aislamiento y caracterización de compuestos bioactivos a partir de extractos de plantas. *Revista africana de medicinas tradicionales, complementarias y alternativas: AJTCAM*, 8 (1), 1–10.
129. Shahinuzzaman, M., Akhtar, P., Amin, N., Ahmed, Y., Hannan, F., Misran, H., y Akhtaruzzaman, M. (2021). New insights of phenolic compounds from optimized fruit extract of *Ficus auriculata*. *Sci Rep* 11, 12503. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91913-w>
130. Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D., & Morante S. (2009). Análisis Instrumental, Volumen 1. España, Netbiblo.
131. Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A., & Suarez, D. (2018). Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales. Colombia: UNIAGRARIA.
132. Silva, E., Teixeira, J. A., Pereira, M. O., Rocha, C. M. R., & Sousa, A. M. (2023). Evolving biofilm inhibition and eradication in clinical settings through plant-based antibiofilm agents. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 119(154973), 154973. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2023.154973>
133. Song, M., Liu, Y., Li, T., Liu, X., Hao, Z., Ding, S., Panichayupakaranant, P., Zhu, K., & Shen, J. (2021). Plant Natural Flavonoids Against Multidrug Resistant Pathogens. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 8(15), e2100749. <https://doi.org/10.1002/adv.202100749>
134. Spórna-Kucab, A., Tekieli, A., Grzegorzczak, A., Świątek, Ł., Boguszewska, A., & Skalicka-Woźniak, K. (2023). Betaxanthin Profiling in Relation to the Biological Activities of Red and Yellow Beta vulgaris L. Extracts. *Metabolites*, 13(3), 408. <https://doi.org/10.3390/metabo13030408>.
135. Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F. (2007), Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of pruebaing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115: 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
136. Stiefel, P., Rosenberg, U., Schneider, J., Mauerhofer, S., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2016). Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 4135–4145. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7396-9>.
137. Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal (3rd. Ed.). Castelló de la Plana: Universitat Jaume.
138. Togneri, A. M., Podestá, L. B., Pérez, M. P., & Santiso, G. M. (2017). Study of *Staphylococcus aureus* infections in a general acute care hospital (2002-2013). *Revista Argentina de microbiología*, 49(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.006>
139. Torres Chati, J. (2014). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Luma chequen (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.* [Título Profesional] Universidad nacional mayor de san marcos

140. Vajrabhaya, L.-O., Korsuwannawong, S., Ruangsawasdi, N., Phruksaniyom, C., & Srichan, R. (2022). The efficiency of natural wound healing and bacterial biofilm inhibition of Aloe vera and Sodium Chloride toothpaste preparation. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03548-7>
141. Vázquez-Nuñez, M. de L. Á., Rocha-Guzmán, N. E., Aguilar-Zárate, P., Rojas, R., Martínez-Ávila, G. C. G., Reyes, A., & Michel, M. R. (2025). Biopolymer-based microencapsulation of procyanidins from litchi peel and coffee pulp: Characterization, bioactivity preservation, and stability during simulated gastroinpruebainal digestion. *Polymers*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/polym17050687>
142. Vuong, C., & Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481–489.
143. Wagdy, S., Taha, F., y Salma S. (2016). Influence of Reduced Phenolics and Simmondsins Contents on Protein Quality of Defatted Jojoba Meal. *American Journal of Food Technology*, 11, 213-220. doi: 10.3923/ajft.2016.213.220
144. Wasihun, Y., Alekaw Habteweld, H., & Dires Ayenew, K. (2023). Antibacterial activity and phytochemical components of leaf extract of *Calpurnia aurea*. *Scientific Reports*, 13(1), 9767. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36837-3>
145. Wu, Q., Fu, X., Chen, Z., Wang, H., Wang, J., Zhu, Z., & Zhu, G. (2022). Composition, color stability and antioxidant properties of betalain-based extracts from bracts of *Bougainvillea*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(16), 5120. <https://doi.org/10.3390/molecules27165120>
146. Yazdani, M., Motallaei, M. N., Tahmasebi, E., Tebyaniyan, H., Alam, M., Abbasi, K., Seifalian, A., Ranjbar, R., Yazdani, A., Hosseini, H. M., & Moghaddam, M. M. (2022). Chemical characterization and cytotoxic/antibacterial effects of nine Iranian Propolis extracts on human fibroblast cells and oral bacteria. *BioMed Research International*, 2022, 6574997. <https://doi.org/10.1155/2022/6574997>
147. Yerlikaya, S., Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M. C., Celik Altunoglu, Y., & Aktumsek, A. (2017). A Multidirectional Perspective for Novel Functional Products: In vitro Pharmacological Activities and In silico Studies on *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 600. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00600>
148. Zahidul I., Tanvir H., Foyosal H., Salma A. and Mohammad A. (2016). *In-vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activity of *Bougainvillea glabra* Flower. *Research Journal of Medicinal Plants*, 10: 228-236.
149. Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6), e1403. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
150. Zendejas , G., Avalos, H., Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.
151. Zhang, S., Qi, Y., Tan, S. P. H., Bi, R., & Olivo, M. (2023). Molecular fingerprint detection using Raman and infrared spectroscopy technologies for cancer detection: A progress review. *Biosensors*, 13(5), 557. <https://doi.org/10.3390/bios13050557>