



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
DR. JACOBO BUCARAM ORTIZ  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA  
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE LA  
CORTEZA Y LA HOJA DEL BELDACO (*Pseudobombax millei*)  
FRENTE A *Escherichia coli* COMO AGENTE  
ANTIMICROBIANO**

**AUTOR**

**MENDOZA CASTILLO ANDY JAIR**

**TUTOR**

**ING. LUIS ZUÑIGA MORENO. M.SC.**

**GUAYAQUIL– ECUADOR  
2024**



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
“Dr. JACOBO BUCARAM ORTIZ”  
CARRERA AGROINDUSTRIA**

**APROBACIÓN DEL TUTOR**

El suscrito, **Ing. Luis Zúñiga Moreno**, docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Tutor, certifico que el presente trabajo de titulación: **EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE LA CORTEZA Y LA HOJA DEL BELDACO (*PSEUDOBOMBAX MILLEI*) FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* COMO AGENTE ANTIMICROBIANO**, realizado por el estudiante **MENDOZA CASTILLO ANDY JAIR**; con cédula de identidad N° **0958243206** de la carrera **AGROINDUSTRIA**, Unidad Académica Guayaquil, ha sido orientado y revisado durante su ejecución; y cumple con los requisitos técnicos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador; por lo tanto se aprueba la presentación del mismo.

Atentamente,

Firma del Tutor

ING. LUIS ZÚÑIGA MORENO. M.SC.

Guayaquil, 20 de diciembre del 2024



**UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
“Dr. JACOBO BUCARAM ORTIZ”  
CARRERA AGROINDUSTRIA**

**APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

Los abajo firmantes, docentes designados por el H. Consejo Directivo como miembros del Tribunal de Sustentación, aprobamos la defensa del trabajo de titulación: “: **EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE LA CORTEZA Y LA HOJA DEL BELDACO (*Pseudobombax millei*) FRENTE A *Escherichia coli* COMO AGENTE ANTIMICROBIANO**”, realizado por el estudiante **MENDOZA CASTILLO ANDY JAIR**, el mismo que cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador.

Atentamente,

---

**ING. NADIA CADENA ITURRALDE, M.Sc.  
PRESIDENTE**

---

**ING. MIGUEL MORENO PAREDES, M.Sc.  
EXAMINADOR PRINCIPAL**

---

**ING. YOANSY GARCIA ORTEGA, M.Sc.  
EXAMINADOR PRINCIPAL**

---

**ING. LUIS ZÚÑIGA MORENO, M,Sc.  
EXAMINADOR SUPLENTE**

Guayaquil, 20 de diciembre del 2024

## DEDICATORIA

Dedico este proyecto con profundo amor y gratitud a mis abuelos cuyas enseñanzas sembradas en mí desde niño trazaron la trayectoria de mi vida personal y académica, a mi querida madre quien fue la persona que estuvo a mi lado en todo este trayecto alentándome siempre a seguir adelante, este logro en gran parte es de ella también, gracias a su inquebrantable apoyo, sacrificio y confianza que han sido mi mayor fortaleza en este viaje.

Me lo dedico a mí, por cada madrugada y mañana de arduo trabajo seguido clases, tareas y proyectos, no fue nada fácil, nunca lo fue, rendirse jamás fue una opción.

## **AGRADECIMIENTO**

A mis abuelos, especialmente a mis abuelos maternos Lucía Ascencio y Basilio Castillo, por todo el amor, el apoyo, por sus consejos y por todo lo demás que me brindaron desde niño, sin ellos nada de esto sería posible.

A mi madre, por su apoyo incondicional y su constante sacrificio y dedicación en cada paso que dí a través de los años. Su amor, paciencia y confianza en mí han sido el pilar fundamental que me ha permitido seguir adelante en momentos difíciles. Este logro es tanto mío como suyo, y le estoy eternamente agradecido.

A mi docente guía Luis Zúñiga, cuya paciencia, conocimiento y orientación han sido esenciales para la realización de esta tesis. A los buenos amigos que me ha dejado la universidad, sin ellos entender y pasar asignaturas hubiera sido un trabajo aún más difícil de lo que fue.

## **Autorización de Autoría Intelectual**

Yo **MENDOZA CASTILLO ANDY JAIR**, en calidad de autor del proyecto realizado, sobre **“EXTRACCIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS DE LA CORTEZA Y LA HOJA DEL BELDACO (*Pseudobombax millei*) FRENTE A *Escherichia coli* COMO AGENTE ANTIMICROBIANO”** para optar el título de **INGENIERO AGROINDUSTRIAL** por la presente autorizo a la **“UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR Dr. JACOBO BUCARAM ORTIZ”**, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contienen esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me correspondan, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Guayaquil, 20 de diciembre del 2024

Firma

**MENDOZA CASTILLO ANDY JAIR**

**C.I. 0958243206**

## RESUMEN

Este proyecto se basó en la extracción y evaluación de la corteza y las hojas de beldaco (*Pseudobombax millei*) frente a *Escherichia coli* para analizar la actividad inhibitoria mediante el uso de diferentes concentraciones de solvente orgánico (Etanol) y de materia prima, obteniendo a partir de ello 6 tratamientos mismos que fueron comparados con un blanco (Oxitetraciclina) para medir de forma estandarizada el nivel de actividad inhibitoria, siendo el tratamiento 6 con una concentración de 85% solvente – 15 % hoja pulverizada de beldaco, arroja un nivel de inhibición del 37.80% en comparación con la oxitetraciclina superando el CIM (Concentración mínima inhibitoria) de 3.0 %, dejando demostrada que en efecto si existe actividad inhibitoria sobre el microorganismo *Escherichia coli*, sin embargo, la actividad que estos ejercen sobre la misma no correlaciona una similitud considerable con la oxitetraciclina.

**Palabras claves:** *Beldaco, (Pseudobombax millei), actividad inhibitoria, Escherichia coli, etanol.*

## ABSTRACT

This project was based on the extraction and evaluation of the bark and leaves of Beldaco (*Pseudobombax millei*) against *Escherichia coli* to analyze the inhibitory activity using different concentrations of organic solvent (Ethanol) and raw material, obtaining from it 6 treatments that were compared with a control (Oxytetracycline) to standardize the measurement of inhibitory activity. Treatment 6, with a concentration of 85% solvent – 15% powdered beldaco leaf, demonstrated an inhibition level of 37.80% compared to oxytetracycline, surpassing the minimum inhibitory concentration (MIC) of 3.0%. This shows that there is indeed inhibitory activity against the *E. coli* microorganism. However, the activity observed does not correlate significantly with that of oxytetracycline.

**Keywords:** *Beldaco*, (*Pseudobombax millei*), *inhibitory activity*, *Escherichia coli*, *ethanol*.



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Antecedentes del problema.....	1
1.2 Planteamiento y formulación del problema.....	2
1.3 Justificación de la investigación .....	3
1.4 Delimitación de la investigación .....	4
1.5 Objetivo general .....	4
1.6 Objetivos específicos .....	4
1.7 Hipótesis .....	4
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
2.1 Estado del arte .....	5
2.2 Bases científicas y teóricas de la temática.....	6
2.3 Marco legal .....	13
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1 Enfoque de la investigación .....	14
3.2 Metodología .....	14
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>36</b>
6.1 Conclusiones .....	36
6.2 Recomendaciones .....	36
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>38</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°1. Hojas y tallo de beldaco deshidratados .....	44
Anexo N°2. Pulverización de las hojas de beldaco .....	44
Anexo N°3. Preparación y posterior maceración de los tratamientos.....	45
Anexo N°4. Filtrado de macerados .....	45
Anexo N°5. Obtención de extractos mediante el uso del rotavapor .....	45
Anexo N°6. Preparación de medio de cultivo enriquecido para <i>Escherichia coli</i> .....	46
Anexo N°7. Siembra de cepas en medio de agar enriquecido con discos de antibiograma adheridos .....	46
Anexo N°8. Medios de cultivo en estufa a 34 °C .....	47
Anexo N°9. Medios de cultivo después de 48 horas .....	47
Anexo N°10. Uso de oxitetraciclina.....	48
Anexo N°11. Descripción de estadístico .....	48
Anexo N°12. Porcentaje de inhibición de tratamientos .....	49
Anexo N°13. Kruskal-Wallis test .....	49
Anexo N°14. Tabla de similitud entre tratamientos .....	50
Anexo N°15. Marginal means-tratamientos .....	50
Anexo N°16. Certificación de la cepa de <i>Escherichia coli</i> .....	51

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes del problema

De acuerdo con investigaciones de Tress (2019), en el mundo se aprecia la existencia de alrededor de 50.000 especies de plantas que se utilizan con fines medicinales, creando más de sesenta mil millones de dólares al año. Los árboles tienen un aporte importante dentro de la composición de las siguientes partes que conforman las plantas, tales como: corteza, raíz, fruto, hojas, flores y semillas, siendo éstas últimas materias primas primordiales para la extracción de aceites esenciales, muchos de ellos usados en medicina tradicional e industria alimenticia.

Existen numerosas especies de árboles con importantes aportaciones medicinales reconocidos a nivel mundial, como el *Ginkgo biloba* con propiedades benéficas al sistema nervioso central y antioxidantes en el cuerpo, y el ginseng (*Panax ginseng*) que se ingiere en forma de infusiones estimulando el sistema nervioso central, estimulante de la energía, defensa contra el envejecimiento de los tejidos y anabolizante (Borras, 2013).

En este contexto, en Ecuador numerosas especies de árboles son conocidas por sus propiedades medicinales, entre ellas especies del género *Cinchona* comúnmente llamado "casarilla" se caracteriza por contener quinina, el cual es un alcaloide con propiedades anti febrífugas resaltando de este género a *Cinchona officinalis*, que son ampliamente considerados como el "salvador de la humanidad" de males como el malaria y fiebre, cuyo uso se ha informado oficialmente en desde 1649 (Zevallos, 2017).

El árbol Beldaco con nombre científico (*Pseudobombax millie*) es una especie endémica del Ecuador, se encuentra principalmente en la zona costera como Manabí, Santa Elena, Guayas y Esmeralda, es utilizado por pueblos de diferentes regiones como remedio para diversas enfermedades (Morales y Durand, 2021)

En los últimos años se ha identificado un aumento de la resistencia microbiana a los antimicrobianos convencionales, lo que ha causado que las industrias farmacéuticas y alimentarias opten por alternativas a varias plantas medicinales busca de nuevos farmacéuticos y conservantes para la industria alimentaria. El descubrimiento de nuevos compuestos naturales y sintéticos han sido de vital importancia en la lucha contra la resistencia microbiana, la misma que

ha ido aumentando mientras que el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido considerablemente (Morales y Durand, 2021).

En la Universidad Federal de Río Grande (FURG) utilizaron el *Pseudobombax marginatum* para analizar y evaluar su incidencia antimicrobiana frente a once diferentes grupos de microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, entre otras. Ellos prepararon un extracto hidroalcohólico con un volumen de 225 mL de *P. marginatum* disuelto en cloroformo, n-butanol concentrado y acetato de etilo comprobando que tenía un mayor efecto de inhibición en cultivos de *Escherichia coli* y *B. cereus* (Silva, 2018).

## **1.2 Planteamiento y formulación del problema**

### **1.2.1 Planteamiento del problema**

En los últimos años se han registrado alertas sanitarias debido a la contaminación por *Escherichia coli* las cuales se originaron en alimentos congelados y refrigerados de consumo diario como la carne de res, leche, huevos, alimentos frescos como la espinaca, ensaladas empacadas entre otras. Dichos casos de investigación fueron realizadas por el Centro de Enfermedades Control y Prevención de los Estados Unidos, entre 2021 y 2022 (Centro de Control y Prevención de Enfermedades, 2022).

Con respecto a Ecuador, la incidencia de esta cepa, responsable de enfermedades infecciosas estomacales es menos probable, pero no imposible. En el Ecuador se registran casos de infecciones por *Escherichia coli* en la gaceta ETAS SE 41-2022 expuesta por (Ministerio de Salud Pública, 2022) y hasta el momento de esta investigación, los casos de *Escherichia coli* se encuentran contados entre los 2832 casos de infecciones/intoxicaciones causadas por alimentos hasta diciembre del año 2022.

Debido a que se ha observado un aumento de la resistencia de esta bacteria hacia los antibióticos convencionales se proponen el desarrollo de investigaciones para encontrarse nuevas alternativas de origen natural las cuales logren tener una capacidad inhibitoria en su crecimiento bacteriano como el árbol de beldaco (*Pseudobombax millei*) (Montero et al., 2018).

### **1.2.2 Formulación del problema**

Considerando la información bibliográfica de la familia del beldaco *P. millei*, se consideró la formulación del problema: “¿Los extractos de la corteza y las hojas de Beldaco (*Pseudobombax millei*) tendrán un efecto antimicrobiano sobre el microorganismo *E. coli*?”

### **1.3 Justificación de la investigación**

En la industria alimentaria se requieren conocer nuevos componentes que ayuden a reprimir o eliminar el deterioro de los alimentos que causan los microorganismos, sumándole el peligro que ejercen en la salud de los consumidores. Este caso, se propuso analizar la capacidad antimicrobiana del Beldaco (*P. Millie*) debido a que es una planta endémica del Ecuador y es utilizada de una manera empírica en forma medicinal para tratar problemas digestivos.

El árbol del Beldaco al ser considerado una planta medicinal con características antioxidantes y diuréticas es de gran interés en investigaciones en la industria alimentaria con ansias de demostrar que posee dichas cualidades inhibitorias en *E. coli* para controlar las infecciones que esta cepa causa mediante la ingesta de alimentos a las personas que los consumen (Morales y Durand, 2021).

De acuerdo con Durand y Morales (2021), se ha demostrado que el floema de Belcado *P. millei* presenta actividad inhibitoria. Esta actividad se ha descrito de forma cualitativa y se ha evaluado mediante observaciones en cultivos *in vitro*. En concreto, se ha observado una zona de inhibición en un cultivo de *E. coli*, con halos de inhibición formados alrededor del disco de papel (6 mm de diámetro) impregnado con 10 µL de extracto. Para comparar, se utilizaron discos de papel con antibiótico (Amikacina) como control.

En Ecuador, el Beldaco se emplea de manera empírica, especialmente con fines medicinales, como agente antiinflamatorio, antioxidante y antidiurético, entre otros usos beneficiosos. Con el objetivo de ampliar el conocimiento en este ámbito, se busca llevar a cabo una investigación de la evaluación de su potencial como agente inhibidor de patógenos.

Se propuso, en el mismo contexto experimental, evaluar la capacidad antimicrobiana que ejercen los extractos que se obtendrán de la corteza y la hoja del Beldaco (*Pseudobombax millei*) en cultivos *in vitro* ante el microorganismo *Escherichia coli* y mediante una prueba de sensibilidad con antibiograma medir la

actividad antimicrobiana de los extractos, con la intención de generar información de validez científica para posteriores usos de los extractos en la industria alimentaria.

Se pretendió de igual manera, hacer uso de un software de microbiología predictiva para cuantificar el nivel de crecimiento microbiano de *Escherichia coli* utilizando parámetros que determinan el crecimiento microbiológico como son; Temperatura y pH.

#### 1.4 Delimitación de la investigación

- **Espacio:** La presente investigación se realizó en el Laboratorio de microbiología y en el laboratorio de suelos de la Universidad Agraria del Ecuador, campus Dr. Jacobo Bucaram Ortiz.
- **Tiempo:** La investigación tuvo duración de 7 meses.
- **Población:** Está dirigida para el público en general.

#### 1.5 Objetivo general

Extraer y evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza y la hoja del beldaco (*Pseudobombax millei*) frente a *Escherichia coli*.

#### 1.6 Objetivos específicos

- Obtener extracto de la corteza y las hojas del Beldaco (*Pseudobombax millei*) mediante el método de extracción por maceración y concentrado por rotavapor utilizando etanol como solvente.
- Evaluar la actividad inhibitoria microbiana *in vitro* utilizando el extracto de la corteza y las hojas del Beldaco sobre el microorganismo *E. coli* mediante medición de los halos de inhibición como resultado de un antibiograma.
- Determinar la curva de crecimiento microbiano utilizando la herramienta digital microbiológica predictiva COMBASE mediante la medición de parámetros como el pH, temperatura y actividad de agua ( $A_w$ ).

#### 1.7 Hipótesis

La hipótesis planteada al comienzo de este proyecto de tesis fue: “Una de las concentraciones del extracto de la corteza y hoja de Beldaco (*P. millei*) presentará actividad antimicrobiana ante *E. coli*”.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Estado del arte

Dado que el árbol de Beldaco (*Pseudobombax millei*) es una especie exclusiva de Ecuador y carece de registros a nivel internacional, se destaca que se han llevado a cabo diversas investigaciones relacionadas con árboles pertenecientes al género *Pseudobombax*. En esta sección, se expondrán los resultados presentados por distintos autores en relación con estas investigaciones.

En la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Estatal de Campinas (UNICAMP) en Brasil, se llevó a cabo una investigación que consistió en el aislamiento de nanocristales de celulosa obtenidos a partir de las fibras del árbol de munguba (*Pseudobombax munguba*), ubicado en la selva amazónica. El objetivo principal de este estudio fue la obtención de nanocompuestos biodegradables de PBAT (Adipato de Butileno-co-Tereftalato). Estos nanocompuestos demostraron contar con propiedades mecánicas y térmicas mejoradas, presentando un considerable potencial para sustituir a los polímeros convencionales (Ferreira et al., 2019).

Un estudio realizado por la Universidad de Agricultura de Makurdi en Nigeria llevó a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de la corteza del árbol *Bombax buonopozense*, una especie ubicada en África occidental conocida como árbol de algodón de seda de flores rojas. Se determinó que una muestra cruda de 100 g tenía un contenido de humedad del 55,30%, un contenido de cenizas del 15,30%, un contenido de fibra del 16,80%, mientras que los porcentajes de carbohidratos y proteínas fueron bajos, registrando 1,04% y 6,0% respectivamente. El análisis fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos y saponinas con valores de 0,68 g, 0,09 g, 2,35 g, 1,41 g y 1,15 g respectivamente. Se observó que esteroides y glucósidos se encontraban en niveles muy bajos, siendo apenas detectables. La existencia de estos metabolitos secundarios sugiere el potencial industrial del tallo de *Bombax buonopozense* para la generación de nuevos productos naturales (Khan et al., 2019).

En una investigación adicional sobre árboles de *Pseudobombax marginatum*, se llevó a cabo la evaluación de su capacidad antiinflamatoria y efectos antinociceptivas mediante la preparación de un extracto hidroalcohólico al 5.5%, utilizando etanol al 70% como solvente. Este extracto fue administrado en diferentes dosis a ratones de laboratorio sometidos a diversas pruebas. Para

evaluar la capacidad antiinflamatoria, se realizaron ensayos de mieloperoxidas, pruebas de peritonitis y edema de patas inducidos por carragenina. Para evaluar la capacidad antinociceptiva, se llevaron a cabo pruebas de torsión inducida por ácido acético, placa caliente y formalina. Los resultados de la investigación indicaron que el extracto demostraba actividades antiinflamatorias y antinociceptivas; no obstante, se recomendaba realizar investigaciones adicionales para identificar los componentes responsables de estos beneficios (Costa, et al., 2013).

Lobapo, et al., (2020). exponen que la contaminación alimentaria causada por microorganismos ha emergido como una significativa preocupación de salud pública a nivel global. La preparación de alimentos en condiciones insalubres se vincula con aproximadamente 2.000.000 de fallecimientos anuales. En su investigación sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Vanilla spp.*, se lograron resultados que indican una concentración del 3.1 % como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en bacterias Gram positivas. Es importante destacar que estos resultados pueden variar entre especies pertenecientes a una misma familia.

Los procesos de deterioro de los alimentos están vinculados con diversas alteraciones que provocan modificaciones en las características nutricionales, fisicoquímicas y organolépticas. Estos cambios pueden dar lugar a problemas de salud para aquellos que consumen los alimentos. En su investigación sobre la actividad antimicrobiana del extracto Hidroalcohólico de *Calendula officinalis L.*, utilizaron concentraciones de 30, 50, 70 y 90 °GL. Los resultados mostraron rendimientos en el halo de inhibición de  $2.72 \pm 0.09$ ,  $3.53 \pm 0.14$ ,  $4.25 \pm 0.30$  y  $4.34 \pm 0.83$ , respectivamente (Rodríguez y Alvarez, 2021).

## **2.2 Bases científicas y teóricas de la temática**

### **2.2.1 Beldaco (*Pseudobombax millei*)**

Compuesta por dos elementos etimológicos, la palabra "*Pseudo-bombax*" se deriva de la palabra griega "ψεῦδο" que se traduce como "falso", y "bombax", proveniente del griego "bombyx", que significa "seda". La combinación de estos términos da lugar a "falso Bombax L", definiéndose como una variante que simula la presencia de seda o algodón. Esta denominación hace referencia a la particularidad de que, en esta especie de árboles, las semillas están rodeadas por



tricomas sedosos, creando una apariencia semejante a la seda o al algodón (González, 2010).

### **2.2.2 Descripción botánica**

Conocido en Ecuador bajo el nombre de "beldaco", estos árboles de considerable tamaño exhiben flores blancas en sus ramas. Su rango de crecimiento abarca desde altitudes de 0 a 500 metros sobre el nivel del mar, en condiciones climáticas que oscilan entre los 22,0 °C y los 25,0 °C. El floema presenta características corchosas, de tonalidad grisácea, con fisuras y exfoliaciones en placas irregulares (Aguirre, 2020).

### **2.2.3 Taxonomía**

La descripción taxonómica del Beldaco (*Pseudobombax millei*) detallado en la investigación de Pitman, et al., (2003), es la siguiente:

- **Reino:** *Plantae*
- **Familia:** *Bombacaceae*
- **Filo:** *Tracheophyta*
- **Clase:** *Magnoliopsida*
- **Orden:** *Malvales*
- **Sinónimos:** *Bombax millei Standl*

### **2.2.4 Usos y aplicaciones**

La madera de este árbol se destina principalmente como fuente de leña, aunque también se puede aprovechar para la obtención de tablas destinadas a la construcción de pilares de hormigón y cajoneras. La lana extraída se utiliza en la confección de polímeros para el relleno de colchones y almohadas. Asimismo, tanto el fruto como las hojas encuentran aplicación en la alimentación del ganado durante periodos de sequía. Desde el punto de vista medicinal, se emplea para aliviar inflamaciones de diversa índole, ya sean agudas o crónicas, y muestra beneficios en el tratamiento de inflamaciones en las vías urinarias y los riñones (Figueroa y Naranjo, 2017).

### **2.2.5 Extractos vegetales**

Compuestos extraídos de hojas, raíces, cortezas, tallos, semillas y flores se pueden emplear como un método de control alternativo contra microorganismos

indeseados, tales como bacterias, hongos e insectos. La obtención de dichos elementos se logra mediante el proceso de maceración con diversos solventes durante un periodo específico, exhibiendo simultáneamente un riesgo reducido de toxicidad. Este enfoque busca mitigar los efectos adversos asociados a los plaguicidas químicos sintéticos, los cuales conllevan riesgos de contaminación en los ecosistemas de cultivos vegetales, animales y en la salud humana (Nascimento et al., 2008).

Estos implican una amalgama compleja con una amplia variedad de compuestos químicos, los cuales pueden ser adquiridos mediante métodos físicos, químicos y microbiológicos a partir de una fuente natural, y son aplicables en diversas áreas tecnológicas. Su atributo fundamental radica en la posibilidad de obtener diversos extractos de una planta particular con principios activos distintos, según el solvente utilizado (López et al., 2022).

## **2.2.6 Métodos de extracción**

### **2.2.6.1. Maceración.**

La obtención de extractos vegetales implica la aplicación de métodos y técnicas especializadas que se ajustan a las características fitoquímicas de la planta, ya sea en su totalidad o de un componente específico. En este contexto, se empleará el Etanol como solvente. Este procedimiento comprende dos fases: la fase de reposo y la fase de filtrado, necesarias para eliminar los sólidos de la solución final que se utilizará (Pérez et al., 2011).

### **2.2.6.2. Rotavapor.**

Un evaporador rotatorio o rotavapor, es un dispositivo que se utiliza en laboratorios de química para la eliminación eficiente y suave de disolventes en sustancias a través de la evaporación. Cuando se hace referencia en la literatura de investigación química, la descripción de la utilización de esta técnica y los equipos pueden incluir la frase "rotavapor", aunque el uso es a menudo bastante marcado por el lenguaje "la muestra se evaporó a presión reducida". Los rotavapores también se utilizan en la cocina molecular para la preparación de destilados y extractos; Un rotavapor es un aparato que, mediante una destilación al vacío permite la evaporación rápida del disolvente de una disolución (Betsabe, 2021).

## **2.2.7 Microorganismos**

Los microorganismos son organismos diminutos que exhiben funciones vitales como el crecimiento, la alimentación, la producción de energía y la reproducción. Su característica distintiva radica en su capacidad para habitar una amplia gama de entornos. En su mayoría, desempeñan roles cruciales en la salud de prácticamente todos los animales y del ecosistema terrestre (Palavecino et al., 2013).

### **2.2.7.1. Microorganismos patógenos.**

Los microorganismos patógenos, que mayormente incluyen bacterias, virus y protozoarios, son responsables de causar daños en la salud humana, y algunos de ellos pueden llevar a una alta mortalidad. La interacción constante entre los seres humanos y los microorganismos se da en condiciones que permiten una actividad compartida. Esto se refiere a que la alimentación tanto microbiana como humana involucra factores similares como el agua, carbohidratos (azúcares) y otras sustancias que proporcionan la energía esencial para la vida (Sandoval et al., 2010) (Sandoval et al., 2010).

### **2.2.7.2. Bacterias Gram positivas.**

Las especies de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* son bacilos gram positivos formadores de esporas. Estos bacilos tienen la capacidad de generar esporas, lo que les permite sobrevivir en el entorno durante períodos prolongados. *Bacillus* pertenece al grupo aerobio, mientras que *Clostridium* es anaerobio obligado. A diferencia de las bacterias Gram negativas, la pared celular de estos bacilos está compuesta por una envoltura rígida entre la membrana y la cápsula. Presentan Mureína-Peptidoglicano-Neuropéptido, responsable de la integridad estructural de la pared, así como ácidos teicoicos, que constituyen una parte significativa del peso seco de la pared. Estos ácidos teicoicos son polímeros hidrosolubles que contienen residuos de ribitol o glicerol (Mera et al., 2019).

### **2.2.7.3. Bacterias Gram negativas.**

Una característica destacada de las bacterias Gram negativas es su pared celular, que consta de una capa de peptidoglucano y una membrana externa. El peptidoglucano está conectado a lipoproteínas (compuestos de lípidos unidos a proteínas mediante enlaces covalentes) en la membrana externa y se ubica en el

periplasma, un espacio gelatinoso situado entre la membrana externa y la membrana plasmática (Bush y Schmidt, 2022).

#### **2.2.7.4. *Escherichia coli*.**

Es un organismo vivo que habita comúnmente en el intestino de seres humanos y animales, colonizándolo pocas horas después de nacer el hombre. Forma parte de la flora bacteriana de organismos animales, este microorganismo se puede dividir en cepas transitorias y residentes como lo menciona López (2007). De la misma manera, para *Escherichia coli* es un bacilo de la gama gran negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae* (Rodríguez, 2002).

Su actividad es de forma inocua, aunque ciertos huéspedes inmunosuprimidos o cuando las barreras intestinales están sobre limitadas ciertas cepas de *E. coli* pueden provocar infecciones u otras enfermedades patógenas como diarreas y enfermedades entéricas. Esto representa uno del extracto acuoso glúcidos simples glucósidos alcaloides (sales) vitaminas hidrosolubles extracto alcohólico azúcares simples glucósidos triterpénicos compuestos fenólicos (taninos, pigmentos flavonoides) extracto etéreo materia grasa (lípidos) aceites esenciales esteroides (tripterpenos) carotenoides (tetraterpenos) alcaloides (bases) clorofila vitaminas liposolubles. Cuarenta y un problemas de salud pública más graves y comunes que enfrenta la sociedad hoy en día (López et al., 2002).

#### **2.2.8 Crecimiento microbiano**

El crecimiento bacteriano se refiere al incremento organizado de las estructuras y componentes celulares de un organismo. No se considera crecimiento el aumento de la masa celular debido a la acumulación de productos de reserva. En el caso de células individuales, el crecimiento implica un aumento en el tamaño y peso celular que precede a la división celular. Las bacterias se dividen mediante fisión binaria, donde una célula madre, al alcanzar un determinado volumen, se divide para dar lugar a dos células hijas (Terrem et al., 2002).

#### **2.2.9 Actividad antimicrobiana**

Un antimicrobiano se define como un agente que interrumpe funciones microbianas, exhibiendo selectividad en su toxicidad. Los antibióticos, que son ejemplos de estos agentes, poseen espectros de inhibición en su composición.

Algunos son efectivos contra patógenos específicos, mientras que otros son de amplio espectro y actúan sobre diversas clases de patógenos. Existen dos categorías de antimicrobianos: los estáticos, que inhiben el crecimiento microbiano de manera reversible, y los cidas, capaces de eliminar completamente a los microorganismos. La actividad de los agentes cidas depende de la concentración y pueden actuar como estáticos a niveles bajos. Un mismo agente puede tener propiedades cidas para algunas especies y ser estático para otra (Espinosa, 2019).

Un análisis de la actividad antimicrobiana puede ser influenciado por diversos factores, entre ellos el método de extracción, el volumen de la muestra inicial, la etapa de crecimiento del microorganismo, el medio de cultivo utilizado, el pH, así como el tiempo y la temperatura durante la incubación (Espinosa, 2019).

La evaluación fiable de estos agentes se logra a través de datos como la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y el tiempo de muerte. La CIM determina la eficacia antibacteriana al identificar la concentración más baja de un fármaco que impide el crecimiento de un patógeno específico. Por otro lado, la CMB representa la concentración más baja que causa la muerte del patógeno (Espinosa, 2019).

Actualmente, existe una creciente demanda por parte de los consumidores de alimentos mínimamente procesados y sin conservantes sintéticos, con la percepción de ser más "naturales". Como resultado, la industria agroalimentaria se enfrenta al desafío significativo de desarrollar alimentos con propiedades antimicrobianas y antioxidantes naturales, con el objetivo de reducir la dependencia de conservantes sintéticos (Espinosa, 2019).

Según lo detallado por Espinoza (2019) los agentes microbianos se emplean en alimentos por diversas razones:

- La conservación de este para controlar los procesos naturales de deterioro.
- Prevenir y controlar el crecimiento de microorganismos, incluyendo patógenos.

### **2.2.10 Oxitetraciclina**

La oxitetraciclina, un antibiótico, tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en microorganismos susceptibles, evitando la adición de aminoácidos a la cadena peptídica en formación. Aunque las células del huésped carecen del sistema de transporte activo presente en las bacterias, este antibiótico puede

afectar la síntesis proteica en las células del huésped en concentraciones elevadas. En dosis terapéuticas, la oxitetraciclina es bacteriostática y efectiva contra bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (Rodríguez J. , 2005).

### **2.2.11 Método de evaluación actividad antimicrobiana**

#### **2.2.11.1. Antibiograma.**

##### **2.2.11.1.1. Definición.**

El antibiograma en disco sobre placa es un ensayo de susceptibilidad que se recomienda frecuentemente en los laboratorios clínicos, fundamentado en la metodología propuesta por Bauer, Kirby, Sherris y Turk. Esta prueba es preferida debido a su rapidez, practicidad y capacidad para obtener resultados reproducibles (Guzman y Bernal, 1984).

##### **2.2.7.1.1. Lectura del antibiograma.**

La interpretación de un antibiograma debe llevarse a cabo 18 horas después de la incubación de este. Para ello, se mide el diámetro de las zonas de inhibición utilizando un calibrador, y la medida se expresa en milímetros (mm). Este procedimiento evalúa las áreas circundantes a los discos donde no se observa crecimiento bacteriano (Guzman y Bernal, 1984).

### **2.2.12 Combase**

Se trata de una herramienta en línea para la microbiología predictiva y cuantitativa de alimentos, destacando por su base de datos Combase y los modelos Combase. Su enfoque se centra en describir y prever la supervivencia y el crecimiento de microorganismos en diversas condiciones, principalmente relacionadas con alimentos, esta herramienta resulta valiosa para que las empresas alimentarias comprendan prácticas más seguras en la producción y almacenamiento de alimentos, incluyendo el desarrollo de nuevos productos, la reformulación de alimentos, la creación de protocolos de prueba de desafío y la elaboración de planes de seguridad alimentaria. Además, contribuye a que las organizaciones de salud pública formulen políticas basadas en la ciencia mediante la evaluación cuantitativa de riesgos. Cada conjunto de datos ilustra cómo varían las poblaciones bacterianas ante combinaciones específicas de factores ambientales. Los modelos matemáticos, como el caldo Combase y los modelos de alimentos, fueron desarrollados con datos sistemáticamente generados para

predecir el crecimiento o la supervivencia de diversos organismos en distintas condiciones. (Combase, 2023)

## 2.3 Marco legal

### 2.3.1 Constitución de la República del Ecuador (Modificada 25 de enero 2021)

**Art. 13.-** Las personas y colectividades tienen derecho al acceso seguro y permanente a alimentos sanos, suficientes y nutritivos; preferentemente producidos a nivel local y en correspondencia con sus diversas identidades y tradiciones culturales. El Estado ecuatoriano promoverá la soberanía alimentaria (p. 13)

**Art. 281.-** La soberanía alimentaria constituye un objetivo estratégico y una obligación del Estado para garantizar que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades alcancen la autosuficiencia de alimentos sanos y culturalmente apropiado de forma permanente: Asegurar el desarrollo de la investigación científica y de la innovación tecnológica apropiadas para garantizar la soberanía alimentaria (p. 69).

### 2.3.2 Contaminantes indeseados en extractos y aceites según (INEN, 2009)

Tabla 1.

#### **Contaminantes indeseados en extractos y aceites**

	<b>Límite máximo</b>	<b>Método de ensayo</b>
Impurezas insolubles	0,05% m/m	ISO 663
Contenido de jabón	0,0% m/m	AOCSA Cc 17-95 (97)
Hierro	1,5 mg/kg	ISO 8294
Cobre	0,1 mg/kg	ISO 8294
Plomo	0,1 mg/kg	ISO 12 193
Arsénico	0,1 mg/kg	AOAC 952 13

**Nota: Concentración y métodos de análisis de los diferentes compuestos indeseados en los extractos y aceites.**

**Fuente: INEN, (2009).**

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Enfoque de la investigación

##### 3.1.1 Tipo de investigación

El desarrollo del presente proyecto se realizó a través de la investigación experimental, puesto que se manipularon distintas concentraciones del solvente orgánico (etanol) en los tratamientos de los extractos de la corteza y las hojas de Beldaco (*Pseudobombax mille*), extractos que posteriormente se utilizaron en un cultivo *in vitro* para analizar la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*. Además, según la toma de datos de forma prospectiva, ya que los datos fundamentales necesarios para el estudio fueron recolectados conforme sucede y progresa la experimentación.

También presenta características de un trabajo documental, ya que se realizó una revisión bibliográfica para determinar el método de obtención el extracto.

##### 3.1.2 Diseño de investigación

La investigación muestra un diseño cuantitativo porque se levantó información de datos obtenidos de la comparación los tratamientos y las repeticiones adheridas en los discos de inhibición en blanco y midiendo los halos de inhibición que se formaron después de 18 horas de incubación.

#### 3.2 Metodología

##### 3.2.1 Variables

###### 3.2.1.1. Variable independiente.

- Concentración de los extractos de la corteza y la hoja de Beldaco

###### 3.2.1.2. Variable dependiente.

- Cantidad de UFC de *E. coli* en el modelo predictivo.
- Temperatura.
- pH
- Actividad del agua (Aw)

##### 3.2.2 Matriz de operacionalización de las variables

A continuación, se describen las variables independientes y dependientes que serán evaluadas en el presente estudio, detallando los métodos de medición y las características de cada una (Tablas 2 y 3).



**Tabla 2**  
**Descripción de las variables independientes.**

Variable	Tipo	Nivel de medida	Descripción
Formulación de distintos tratamientos a partir de la relación (solvente orgánico – materia prima)	Cuantitativa	Discreta	Variaciones en los porcentajes de etanol – agua en el proceso de maceración de los tratamientos.

Elaborado por: El Autor, 2024

**Tabla. 3**  
**Descripción de las variables dependientes**

Variable	Tipo	Nivel de medida	Descripción
Prueba de sensibilidad en antibiograma	Cuantitativa	Discreta	Medición de halos de inhibición alrededor de discos con extractos de los tratamientos impregnados. Regulación de las condiciones
Medición y control de temperatura en el proceso de crecimiento de los microorganismos	Cuantitativa	Discreta	atmosféricas idóneas para el crecimiento de <i>E. coli</i> durante la etapa de crecimiento microbiano
Identificación de pH en solución del medio de cultivo	Cuantitativa	Discreta	Utilizando información identificada en el rotulo del medio de cultivo se considera el pH en el cual crecieron los microorganismos
Identificación de la actividad del agua ( $A_w$ ) del medio de cultivo	Cuantitativa	Discreta	Identificación de la actividad del agua mediante la lectura del rotulo del medio de cultivo utilizado para posterior análisis comparativo entre Combase – apartado experimental.

Elaborado por: El Autor, 2024

### 3.2.3 Tratamientos

Se obtuvieron 6 tratamientos; 3 tratamientos del extracto de la corteza y 3 tratamientos del extracto la hoja de Beldaco, con 3 repeticiones de cada tratamiento utilizando concentraciones distintas del solvente orgánico (Etanol) definiéndolos en las columnas abreviadas con C1 para corteza del tratamiento 1, C2 corteza del tratamiento 2, C3 corteza del tratamiento 3 y H1 para Hojas del tratamiento 1, H2 para hojas del tratamiento 2 y H3 para hojas del tratamiento 3 (Tabla 4).

**Tabla 4.**  
**Concentraciones de tratamientos por extracción hidroalcohólica**

Relación	Extracto de la corteza			Extracto de las hojas		
	C1	C2	C3	H1	H2	H3
Etanol - agua	90%	85%	80%	90%	85%	80%

**Elaborado por: Autor, (2024).**

Según los extractos obtenidos en el desarrollo de este trabajo de titulación, se realizó la tabla 5 que explica las cantidades en mL de solvente y gramos de la materia prima a analizar. Se elaboró una solución la cual estuvo constituida por 75 mL de etanol, 30 mL de agua y 30 g de materia prima triturada por cada 100 mL, los datos fueron utilizados en base al estudio realizado por (Vergara et al., 2018) en el que se realizó una extracción de la corteza y la hoja del beldaco mediante el uso de solventes orgánicos.

Para determinar las concentraciones de los volúmenes utilizados en conjunto con la preparación del envenenamiento del medio de cultivo tomó como referencia lo que exponen Valla y Cogo (2017), debido a que, en dichas medidas se encontró actividad inhibitoria microbiológica del extracto de guayusa.

**Tabla 5.**  
**Tratamientos antimicrobianos**

Tratamientos	Método de extracción	Factor A (Extractos)	Factor B (Maceración)	Dosis ( $\mu\text{g/mL}$ )
T Positivo			Oxitetraciclina	-
T Negativo			Blanco	-
T1	Maceración	Corteza de Beldaco triturado (10%)	Etanol-Agua 90%	35 $\mu\text{L}$
T2	Maceración	Corteza de Beldaco triturado (15%)	Etanol-Agua 85%	35 $\mu\text{L}$
T3	Maceración	Corteza de Beldaco triturado (20%)	Etanol-Agua 80%	35 $\mu\text{L}$
T4	Maceración	Hojas de Beldaco pulverizado (10%)	Etanol-Agua 90%	35 $\mu\text{L}$
T5	Maceración	Hojas de Beldaco pulverizado (15%)	Etanol-Agua 85%	35 $\mu\text{L}$
T6	Maceración	Hojas de Beldaco pulverizado (20%)	Etanol-Agua 80%	35 $\mu\text{L}$

**Nota: Tratamientos y método de extracción a utilizar en la prueba de sensibilidad antibiograma.**

**Elaborado por: Autor, (2024).**

### **3.2.4 Diseño experimental**

El proceso experimental del presente proyecto se realizó en el laboratorio de suelos, lácteos y microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias Dr. Jacobo Buracam Ortiz de la Universidad Agraria del Ecuador, iniciando por la obtención de la harina de la corteza y las hojas de Beldaco, luego se dio paso a la maceración y utilizando un equipo de evaporación en vacío denominado rotavapor se obtuvieron 6 tratamientos, 3 extractos de la corteza y 3 de las hojas del Beldaco (*P. millei*), una vez obtenido los extractos se realizó una prueba de sensibilidad mediante una prueba de antibiograma, mismo que está normado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards CLSI M100- S20-2021, y como punto final del proceso experimental, se usó un equipo contador de colonias digital para conocer el nivel de inhibición sobre el microorganismo *Escherichia coli*.

El presente trabajo utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x3, compuesto por 6 tratamientos de 3 repeticiones cada uno, se

analizaron los tratamientos con actividad significativa un análisis de varianza (ANOVA) con margen de error del 5% ( $p \leq 0,05$ ).

### **3.2.5 Recolección de datos**

La materia prima, equipos y materiales que se emplearon para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos se obtuvieron de la corteza y la hoja de Beldaco por el solvente orgánico Etanol y Agua.

#### **3.2.4.1. Recursos.**

En la siguiente lista se detallan los materiales, reactivos y equipos que fueron utilizados en la parte experimental de la investigación.

#### **Materiales y equipos**

- Balanza analítica
- Balanza analítica (300 g)
- Cocina a gas
- Rotavapor RV 8
- Frascos ámbar 300 mL
- Micropipeta (100 - 1000  $\mu$ L)
- Puntas
- Bolsas ziploc
- Caja Petri
- Matraces Erlenmeyer de 50, 100 y 200 mL
- Discos en blanco
- Vaso de precipitación de 50, 100 y 150 mL
- Micropipeta
- Discos inhibitorios
- Espátulas
- Frascos de ámbar de 50, 100 mL

#### **Materia prima**

- Corteza del Beldaco
- Hojas de Beldaco

#### **Reactivos**

- Etanol al (96%)
- Medio enriquecido (Agar Muller Hinton)

- Oxitetraciclina

### Material biológico

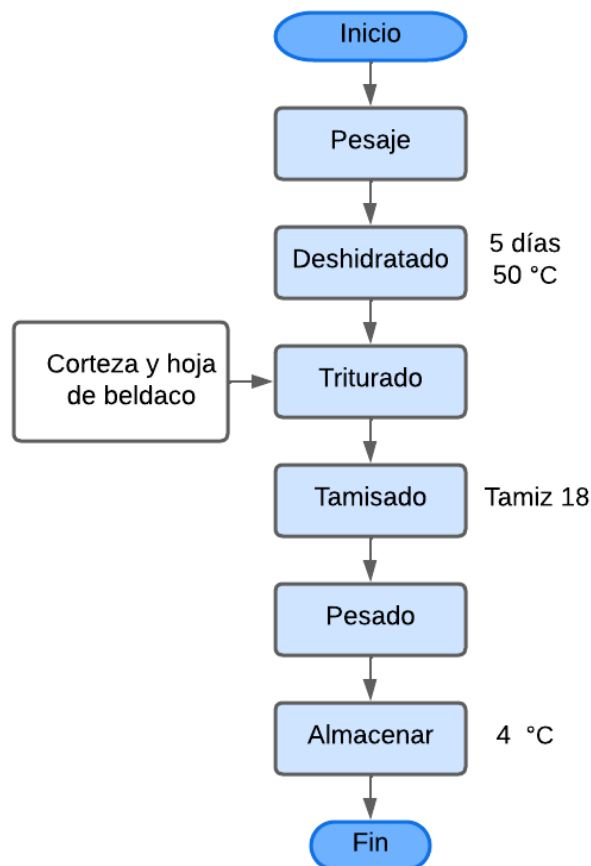
- Cepas de *Escherichia coli*

### 3.2.4.2. Métodos y técnicas.

A continuación, se describe en la figura 1 el proceso de obtención de harina de la corteza y las hojas de Beldaco separado por sus operaciones unitarias detallando temperaturas y tiempos.

**Figura 1.**

**Diagrama de flujo de obtención de la harina de la corteza y las hojas del Beldaco**



Elaborado por: Autor, 2024.

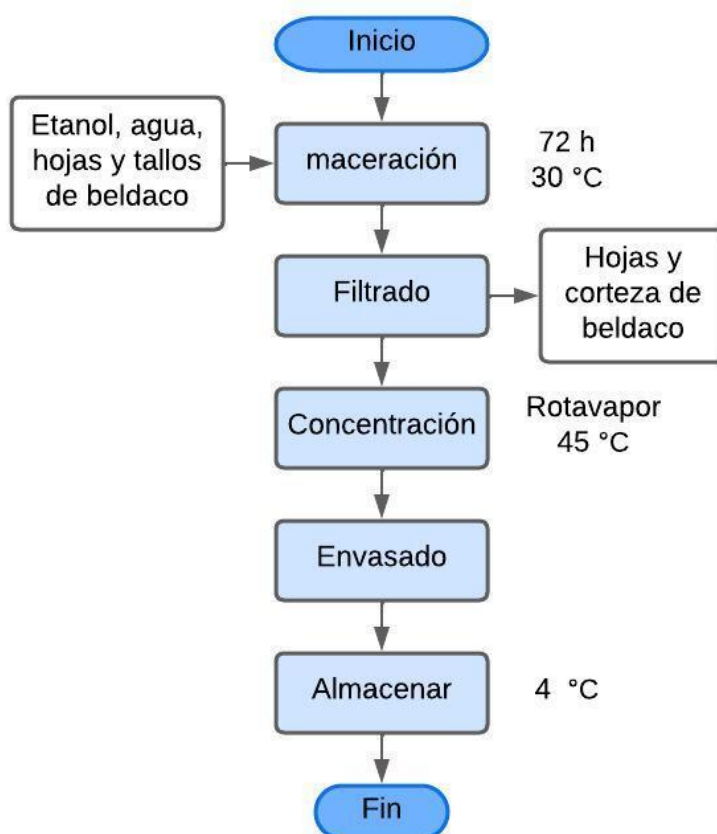
#### 3.2.4.2.1. Descripción de diagrama de flujo de obtención de harina de la corteza y las hojas de Beldaco.

- **Pesaje:** Se realizó el pesado de la corteza del Beldaco para iniciar el procedimiento.
- **Deshidratado:** El deshidratado se realizó durante 5 días en una estufa a 50 °C.

- **Triturado:** Se trituró la corteza del beldaco deshidratado para obtener un tamaño de partículas muy pequeño, se buscó obtener un nivel de granulometría de 2.38 mm en abertura.
- **Tamizaje:** Se tamizó la harina de la corteza de Beldaco en un tamiz número 18.
- **Pesaje:** Se pesó 25 gramos de la harina de la corteza de Beldaco tamizado.
- **Almacenar:** Se almacenó en bolsas ziploc (selladas al vacío) en refrigeración a 4 °C.

**Figura 2.**

**Diagrama de flujo de obtención del extracto fenólico de la corteza y las hojas del Beldaco.**



Elaborado por: Autor, 2024

### **3.2.4.2.2. Descripción de diagrama de flujo de obtención de extracto etanólico.**

- **Maceración:** En este paso las muestras hechas harina se colocaron con etanol en los frascos de vidrio color ámbar y fueron maceradas durante tres

días a temperatura ambiente (25 °C) y se agitaron manualmente una vez por día.

- **Filtrado:** Se filtró la muestra luego del proceso de maceración con filtro de papel para eliminar sólidos.
- **Concentrado:** Se realizó un concentrado por rotavapor para eliminar cualquier micro residuo y para la eliminación del solvente, el equipo se calibró a una temperatura de 50 ° C.
- **Envasado:** El extracto final se recolectó y envasó en viales para su posterior uso.
- **Almacenado:** Los viales son almacenados a 4 °C.

#### ***3.2.4.2.3. Preparación del medio de cultivo.***

La elaboración del envenenamiento del medio de cultivo se desarrolló en base a lo realizado por Morales y Durant (2021) y lo detallado por Castillo et, al., (2016), según la National Committee for Clinical Laboratory Standards.

- Se preparó el Agar Muller Hinton suspendiendo 37 g de polvo en 1 litro de agua purificada.
- Una vez realizado dicho paso, se dejó embeber el agar de 10 a 15 minutos.
- Una vez pasado el tiempo de hidratación del polvo de agar, este se agitó fuertemente mientras se calentaba y se dejó hervir un minuto para su disolución total, y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos.
- Se realizó la adición de los discos de inhibición con los tratamientos impregnados en ellos y se procedió a dar paso a la siembra superficial de las cepas y se dejó incubando durante 24 h a 37 °C.
- Una vez transcurrieron las 24 h en la incubadora se observó crecimiento de colonias y visualizaron los halos de inhibición en cada tratamiento y repetición.
- La evaluación del halo de inhibición se llevó a cabo transcurrido un período de incubación de 18 a 24 horas, utilizando un calibrador para medir el diámetro, cuyo resultado debe registrarse en milímetros (mm).
- La medición se efectuó a contraluz desde el reverso de la placa, de acuerdo con las directrices establecidas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards.

#### **3.2.4.2.4. Método de estándar McFarland 0.5**

El método de McFarland es una escala de turbidez visual que se utiliza en microbiología para estimar la densidad celular de una suspensión bacteriana. En términos más simples, nos permite tener una idea de cuántas bacterias hay en una muestra líquida, comparándola con una serie de tubos estándar de turbidez conocida. (Ortiz, 2022)

(Ortiz, 2022) Menciona que, dentro de esta escala, el estándar de McFarland 0.5 es uno de los más utilizados. Corresponde a una densidad celular aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). Este valor es especialmente relevante en:

- **Inoculación de medios de cultivo:** Al ajustar la densidad de una suspensión bacteriana a 0.5 de McFarland, se asegura que se inocule un número adecuado de bacterias en un medio de cultivo, lo que permite obtener resultados confiables en pruebas de sensibilidad a antibióticos, recuentos bacterianos y otros ensayos microbiológicos.
- **Preparación de antígenos:** En la producción de vacunas y otros productos biológicos, se utiliza para estandarizar la concentración de antígenos bacterianos

La preparación del estándar de McFarland 0.5 implica mezclar soluciones específicas de cloruro de bario y ácido sulfúrico, lo que produce un precipitado de sulfato de bario que le otorga la turbidez característica. Existen tablas detalladas que indican las proporciones exactas de cada reactivo para obtener los diferentes estándares de McFarland. (Ortiz, 2022)

#### **3.2.4.2.5. Parámetros de crecimiento microbiológico.**

- **Temperatura (°C)**

Se usó un termómetro de sonda el cual nos permitió controlar el parámetro de temperatura en la muestra estudiada, la sonda se introdujo en la muestra durante 15 segundos para que el medidor de estabilización y nos brindara datos precisos.

- **pH**

El crecimiento y la supervivencia de los microorganismos está regulado principalmente por el pH o acidez de una muestra o un producto, en este caso, se preparó una pasta homogénea para medir el pH, de la cual se utilizaron 5 g de



muestra en 45 mL de agua destilada, la muestra se trituró en el mortero para obtener una muestra completamente uniforme, haciendo uso del potenciómetro el cual fue calibrado primero, se tomaron las lecturas sumergiendo el electrodo en la muestra y se logró determinar el pH, este proceso se repitió 3 veces en cada muestra para obtener datos más precisos. (Betsabe, 2021)

- **Actividad de agua ( $A_w$ )**

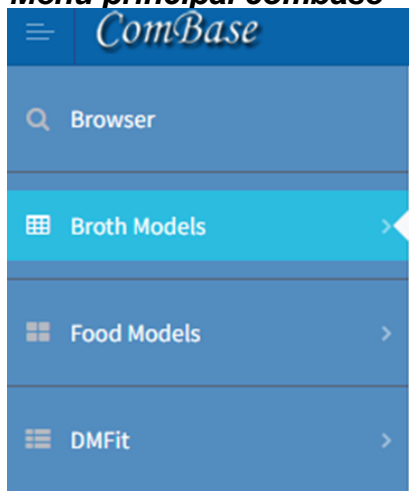
El  $A_w$  es la relación entre la presión de vapor del agua en la alimentación y la presión de vapor del agua pura. Este parámetro se utiliza para medir la cantidad de agua disponible. La actividad del agua ( $A_w$ ) se midió mediante el método del higrómetro de punto de rocío con espejo refrigerado, que es uno de los más precisos entre los disponibles habitualmente. El punto de rocío es la temperatura a la que la muestra (vapor de agua en equilibrio con la muestra) alcanza la saturación con vapor de agua a presión constante. A esta temperatura de saturación, con un mayor enfriamiento, se produce una condensación de agua en el espejo de humedad, que se detecta mediante un mecanismo fotoeléctrico. La temperatura del espejo se controla electrónicamente para mantener el equilibrio. (Trees, 2019)

#### **3.2.4.2.5. Utilización de la plataforma predictiva de crecimiento microbiano Combace en el microorganismo *Escherichia coli*.**

Como se observa en la figura 3 previamente medidos los parámetros se accede al navegador y se ingresa a la página principal de la plataforma Combace.

**Figura 3.**

#### **Menú principal combace**



**Elaborado por: Autor, 2024.**

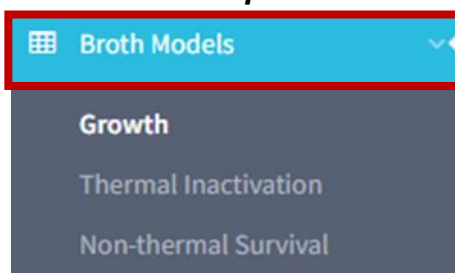
En la figura 4 se evidencia los 3 tipos de modelos a seleccionar los cuales son:

1. Modelos de Crecimiento
2. Modelos de Inactivación térmica
3. Modelos de inactivación no térmica

Antes de utilizar el programa ComBase Predictor se debe seleccionar el tipo de modelo.

Seleccionar el modelo "Growth"

**Figura 4.**  
**Selección del tipo de modelo**

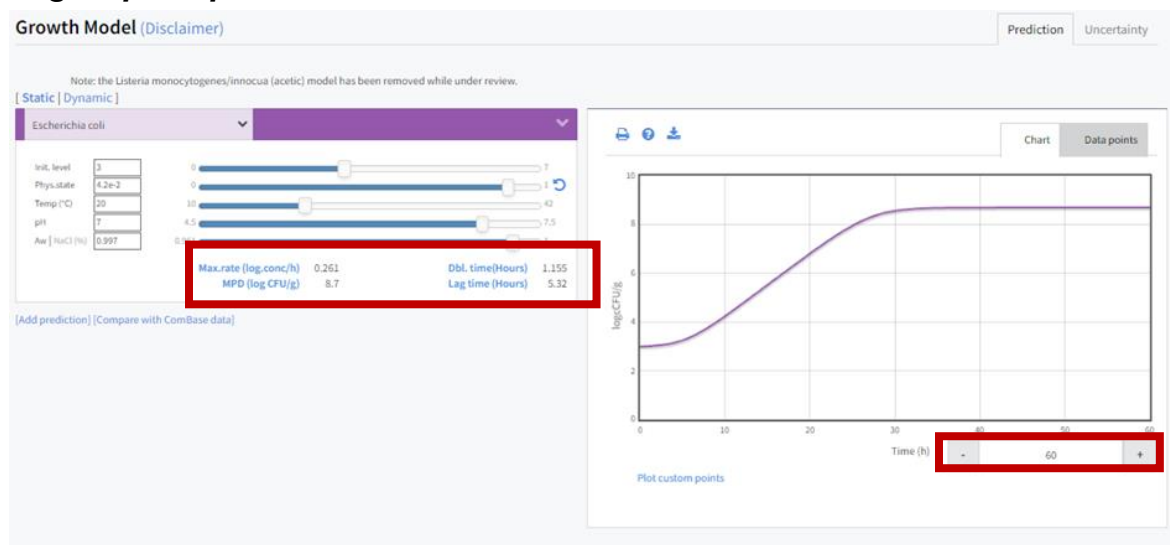


Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 5 la página principal de **Combase Predictor Growth Model** tiene un aspecto permite:

- Realiza predicciones tanto con una temperatura estática (a lo largo del tiempo) como en condiciones de temperatura fluctuante a lo largo del tiempo.

**Figura 5.**  
**Página principal de Combase Predictor Growth Model**



Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 6 se seleccionar entre el modo variable o fluctuante ("dinámico") permite introducir un rango de temperatura diferente a lo largo del tiempo.

**Figura 6.**  
**Selección del modo estático o dinámico**



Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 7 en actividad acuosa seleccionar concentración de NaCl.

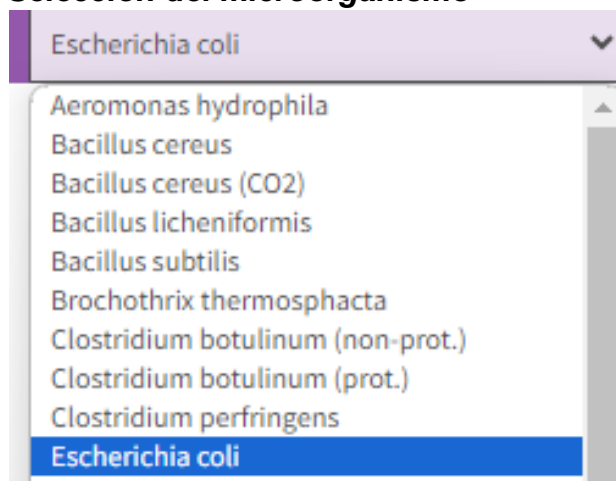
**Figura 7.**  
**Selección de NaCl o Aw**



Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 8 en el área para fijar el microorganismo se seleccionó, en el menú desplegable: *Escherichia coli* es el microorganismo responsable del deterioro de productos cárnicos y vegetales.

**Figura 8.**  
**Selección del microorganismo**



Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 9 en el área para establecer las condiciones, en la casilla "**Init. level.**", escribir la cifra. El nivel inicial es el número de microorganismos por gramo expresado como log UFC/g Por lo tanto, un 3 refleja  $\log \text{UFC/g}=3$  lo que es igual a 1000 UFC/g

**Figura 9.**  
**Selección del nivel inicial**

Init. level

**Elaborado por: Autor, 2024.**

Cómo se observa en la figura 10, se deja la casilla "Estado físico" vacía o se borre el número existente. De este modo, el programa rellenará automáticamente el número más adecuado. El "Estado físico" es una dimensión entre 0 y 1 y se refiere a la fase latente del microorganismo. 1 significa que el microorganismo se multiplica inmediatamente y que no hay ningún período de retraso.

**Figura 10.**  
**Selección del estado físico**

Phys.state

**Elaborado por: Autor, 2024.**

Como se observa en la figura 11 en la casilla "**Temp (°C)**", escriba la cifra 20 o comprobar que esta cifra existe.

**Figura 11.**  
**Selección de la temperatura**

Temp (°C)

**Elaborado por: Autor, 2024.**

Como se observa en la figura 12 en la casilla donde se establece el "**pH**" se escribe la cifra de 7 o compruebe que existe esa cifra.

**Figura 12.**  
**Selección del pH de la muestra**

pH

**Elaborado por: Autor, 2024.**

Como se observa en la figura 13 en el campo "NaCl (%)", introduzca 0,6 o compruebe si existe este valor.

**Figura 13.**  
**Selección de NaCL o Aw**

NaCl (%)

Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 14 en la casilla que aparece debajo de la gráfica (Time (h)) introducir 25 horas.

**Figura 14.**  
**Selección del tiempo en horas**

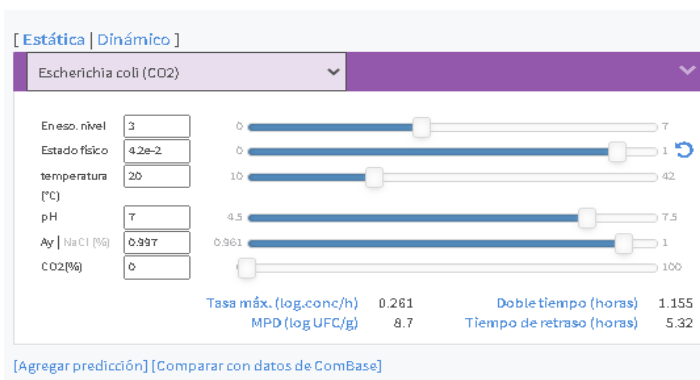
Time (h)

Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 15 al ejecutar la predicción, aplastamos la tecla 'Enter' o 'Return' posteriormente al sustituir un comando, al correr el modelo con los datos introducidos o seleccionados se generan los resultados de la predicción:

- **Los resultados de la predicción son expresados por las constantes cinéticas de crecimiento:** tasa máxima de crecimiento (Log. conc/h) y tiempo de duplicación (h).
- **Área de resultados obtenidos gráfica o numéricamente.** Para pasar de uno a otro active el enlace "**Chart**" o "**Data points**".

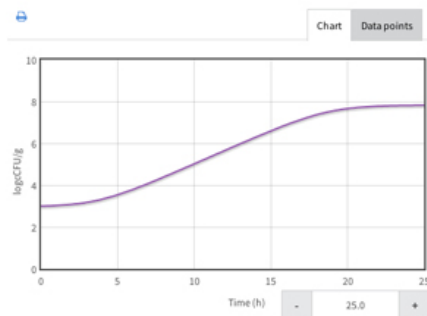
**Figura 15.**  
**Modelo de crecimiento**



Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 16 cuando el modelo se ejecuta en condiciones especificadas y durante un período de tiempo determinado, las predicciones se realizan de acuerdo con la ecuación del modelo, expresando gráficamente el logaritmo UFC/g para una duración determinada (en este caso, aproximadamente 24 horas).

**Figura 16.**  
**Curva de crecimiento**



Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 17 encima del gráfico se encuentra dos enlaces para mostrar los resultados obtenidos de forma gráfica o numérica. Para visualizar los resultados en tabla hacer clic "**Data points**". Se observa la tabla con la concentración de microorganismos expresados en Conc (Log<sub>10</sub>UFC/g) con intervalos regulares de tiempo en horas.

**Figura 17.**  
**Concentración de microorganismos**

Time (h)	Conc (Log <sub>10</sub> cells/g)
0	3
0.2	3
0.4	3.01
12	5.66
12.2	5.72
12.4	5.79

Elaborado por: Autor, 2024.

Como se observa en la figura 18 bajo la zona donde se ingresan las condiciones aparecen 2 parámetros que definen el crecimiento microbiológico para esas condiciones: Tasa de crecimiento **máxima ("Max.rate")**, y **Tiempo de duplicación ("Dbl.time")**, el tiempo en las que se duplica la población.

**Figura 18.**

**Estimación máxima de crecimiento y tiempo de duplicación en horas**

<b>Max.rate (log.conc/h)</b>	<b>0.323</b>
<b>Dbl. time(Hours)</b>	<b>0.932</b>

**Elaborado por: Autor, 2024.**

### **3.2.6 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de este estudio los datos se analizaron utilizando el programa estadístico InfoStat, en el cual se realizó un análisis de varianza ANOVA, evaluando los valores promedio de los resultados que se tabularon en la parte experimental de la comparación de extractos obtenidos. Se utilizará la prueba de comparaciones múltiples de Tukey con un margen del error del 5 % ( $p \leq 0.05$ ), se pretende comparar la actividad inhibitoria en el microorganismo *Escherichia coli*, a diferentes concentraciones del solvente orgánico.

**Tabla 6.**

**Esquema del análisis de varianza**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Factor A (A-1)	$2-1 = 1$
Factor B (B-1)	$3-1 = 2$
Interacción (A-1)x(B-1)	$(2-1)(3-1) = 2$
Error (AB(r-1))	$(2 \times 3 \times (3-1)) = 12$
Total ABr-1	$2 \times 3 \times 3 - 1 = 17$

**Elaborado por: Autor, 2024.**

$H_0$  = No presenta actividad antimicrobiana el extracto de la corteza y la hoja del beldaco (*Pseudobombax millei*) frente a *Escherichia coli*.

$H_1$  = Si presenta actividad antimicrobiana el extracto de la corteza y la hoja del beldaco (*Pseudobombax millei*) frente a *Escherichia coli*.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1 Obtener extracto de la corteza y las hojas del beldaco (*Pseudobombax millei*) mediante el método de extracción por maceración y concentrado por rotavapor utilizando etanol como solvente.

La obtención de los extractos con el solvente orgánico Etanol al 98 por ciento en combinación con agua destilada se realizaron mediante macerados con polvo fino de las hojas deshidratadas y pulverizadas de beldaco y con mechas deshidratadas de la corteza, la maceración tuvo lugar en frascos de 500 mL donde se utilizaron las siguientes cantidades de solvente orgánico:

**Tabla 7.**  
**Relación mL – g de los tratamientos en maceración**

Tratamientos	Mililitros de solvente (mL)	Gramos de materia a macerar (g)
T1 Hojas deshidratadas y pulverizadas	225.0	25.0
T2 Hojas deshidratadas y pulverizadas	212,5	37.5
T3 Hojas deshidratadas y pulverizadas	200.0	50.0
T4 Corteza deshidratada y desmechada	225.0	25.0
T5 Corteza deshidratada y desmechada	212,5	37.5
T6 Corteza deshidratada y desmechada	200.0	50.0

**Elaborado por: Autor, 2024.**

El proceso de macerado duró 3 días, se realizaron agitaciones de los medios de maceración para asegurar una extracción homogénea, una vez transcurridos los 3 días se obtuvieron los tratamientos los cuales fueron sometidos a un proceso de ebullición del etanol y del agua mediante el uso de rotavapor, el proceso se dio a una temperatura de 45 grados Celsius durante 25 minutos para finalmente obtener 8 mL de cada tratamiento.



**4.2 Evaluar la actividad inhibitoria microbiana *in vitro* utilizando el extracto de la corteza y las hojas del Beldaco sobre el microorganismo *E. coli* mediante medición de los halos de inhibición como resultado de un antibiograma.**

Para el análisis *in vitro* de la actividad antimicrobiana en los extractos de hoja y la corteza del beldaco frente a *Escherichia coli* se realizó el procedimiento respectivo de la preparación de las cajas Petri con el agar propuesto (Müller Hinton). Se realizaron 8 placas con 20 mL de agar Müller Hinton, 6 de los tratamientos a analizar, un blanco positivo que fue la tetraciclina y un blanco testigo para posteriormente proceder a la siembra de treinta y cinco  $\mu\text{L}$  de *Escherichia coli*, según el estándar de turbidez de la escala de McFarland al 0.5.

Posteriormente se procedió a colocar los discos en blanco impregnados con cada tratamiento, se colocaron 3 discos de inhibición en cada placa simulando una repetición por cada disco (ver tabla 5).

Una vez sembrados los microorganismos y dispuestos los discos de sensibilidad en las placas, se llevó a cabo la incubación de las cajas de Petri durante 24 horas a 37 °C, para la posterior evaluación del halo de inhibición.

Para determinar el halo de inhibición, se utilizó una fórmula específica para calcular el porcentaje de inhibición de cada tratamiento. La fórmula se describe a continuación:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\Phi \text{ haloextracto} - \Phi \text{ haloblanco}}{\Phi \text{ halocontrolpositivo} - \Phi \text{ blanco}} \times 100$$

De esta forma se tuvieron los resultados expuestos en la tabla 9 en base a estos datos se realizó un análisis de varianza el cual demostró los siguientes resultados (ver tabla 8 y 9).

El análisis de varianza obtenido demuestra que el p-valor que se obtuvo de los datos tabulados de los 6 tratamientos posee evidencia necesaria para rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa en esta investigación (Los extractos de la beldaco si poseen capacidad antimicrobiana). Además, se llevó a cabo un análisis para determinar si los datos recolectados cumplían con los supuestos de normalidad necesarios para un análisis de Tukey.

#### 4.2.1 Actividad antimicrobiana del extracto de las hojas del beldaco

Los datos obtenidos de la actividad inhibitoria microbiana que ejercen los extractos de la hoja del beldaco frente a *E. coli* son detallados en la siguiente tabla:

**Tabla 8.**

#### ***Porcentajes de inhibición de los tratamientos de las hojas de beldaco***

Tratamientos	Medidas
T positivo (oxitetraciclina)	100 <sup>a</sup>
T3	14.93 <sup>b</sup>
T1	12.56 <sup>c</sup>
T2	0.00 <sup>d</sup>
T negativo (testigo)	0.00 <sup>d</sup>
p-valor	0.0001

**Nota: Prueba de Kruskal Wallis. Letras con una letra común no son significativamente diferentes según la prueba de Dunn-Bon Ferroni ( $p < 0.05$ )  
Elaborado por: Autor, 2024.**

Los resultados presentados en la Tabla 8 hace referencia a la efectividad de los tratamientos comparándolos con el antibiótico oxitetraciclina; Los extractos hidroalcohólicos obtenidos de la corteza de beldaco también muestran diferencias significativas en comparación con otros tratamientos. El tratamiento T3, con una concentración del 85% de solvente orgánico, se destaca como el más eficaz, seguido en segundo lugar por el tratamiento T1, que también presenta diferencias significativas. Los resultados revelan que los tratamientos T testigo (control negativo) y T2 (concentración de 85% de solvente orgánico) no muestran diferencias significativas respecto a los demás tratamientos.

#### 4.2.2 Actividad antimicrobiana del extracto de la corteza del beldaco

Los datos obtenidos de la actividad inhibitoria microbiana que ejercen los extractos de la corteza del beldaco frente a *E. coli* son detallados en la siguiente tabla.

**Tabla 9.**  
**Porcentajes de inhibición de los tratamientos de la corteza de beldaco**

Tratamientos	Medidas
T positivo (oxitetraciclina)	100
T5	38,70
T6	27,43
T4	14,80
T negativo (testigo)	0.00
p-valor	0.0001

**Nota: Prueba de Kruskal Wallis. Letras con una letra común no son significativamente diferentes  $p > 0.05$ .**

**Elaborado por: El Autor, 2024.**

Los resultados presentados en la Tabla 9 hace referencia a la efectividad de los tratamientos comparándolos con el antibiótico oxitetraciclina. Sin embargo, los extractos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas de beldaco también muestran diferencias significativas en comparación con otros tratamientos. El tratamiento T5, con una concentración del 85% de solvente orgánico, se destaca como el más eficaz, con una media de inhibición microbiana del 38,70 %, seguido en segundo lugar por el tratamiento T6 con un porcentaje de inhibición del 27,43%, que también presenta diferencias significativas.

#### **4.3 Determinar la curva de crecimiento microbiano utilizando la herramienta digital microbiológica predictiva COMBASE mediante la medición de parámetros como el pH, temperatura y actividad de agua (Aw)**

Siguiendo los parámetros establecidos anteriormente como modelo de crecimiento microbiano, se midieron los tiempos, temperaturas, actividad del agua, inóculo inicial y estado físico de la bacteria, los datos obtenidos de manera predictiva se detallan en la siguiente tabla:

**Tabla 10.**  
**Parámetros de crecimiento microbiano de *E. coli***

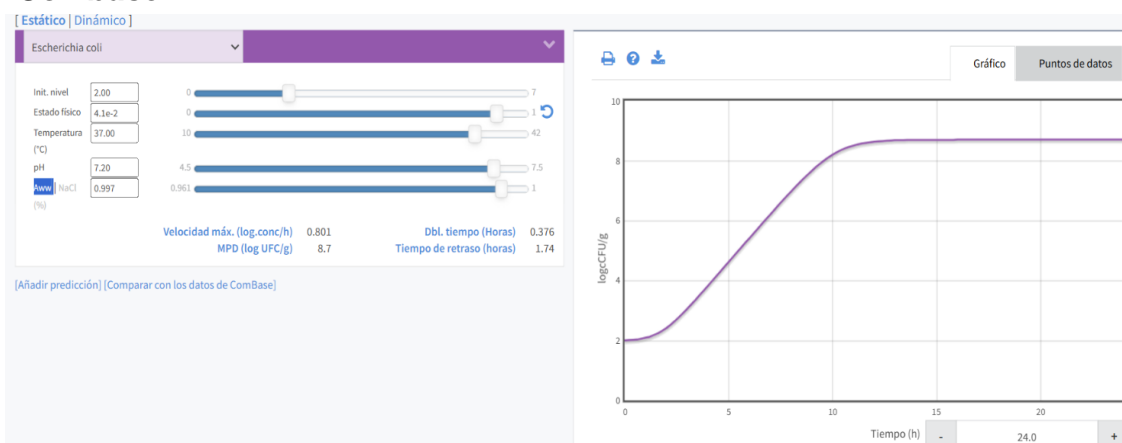
Organismo	<i>Escherichia coli</i>
Inóculo	2
Tiempo en unidades	H
Temperatura ambiente	37 °C
Actividad del agua	0.997
Estado fisiológico inicial	0.041
Crecimiento bacteriano	8.7
Velocidad máxima de crecimiento	0.857
pH	7.2

Elaborado por: El Autor, 2024.

**Nota: Detalle de parámetros necesarios para el crecimiento microbiano dentro de la aplicación Combase.**

Los datos estipulados anteriormente fueron utilizados en el programa predictivo Combase para visualizar la curva de crecimiento microbiano, la cual se puede apreciar de la siguiente manera:

**Figura 19.**  
**Estimación máxima de crecimiento y tiempo de duplicación en horas en Combase**



Elaborado por: El Autor, 2024

En la curva se puede observar un crecimiento exponencial a partir de la primera hora de incubación, observándose la fase exponencial de su crecimiento hasta las 11 horas posterior al inicio de su incubación.

## 5. DISCUSIÓN

En base a lo antes expuesto, los resultados de esta investigación tienen similitud con lo que indica Costa, et al., (2013), acerca de la actividad inhibitoria de la familia *Pseudobombax*. El extracto hidroalcohólico de *Bombax buonopozense*, después de un examen fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles taninos y saponinas, dando una posibilidad a que los extractos que se obtuvieron a partir de las hojas o y el tallo del beldaco tienen estos compuestos que causan inhibición particularmente en *Escherichia coli*.

En el estudio realizado por Lobapo et al., (2020), menciona que los extractos hidroalcohólicos de *Vanilla spp*, ejercen actividad antimicrobiana sobre bacterias gram positivas, obteniendo una CMI (Concentración mínima inhibitoria) del 3,1 %, la efectividad de los métodos de maceración mediante solventes orgánicos como el etanol permiten la extracción directa de los compuestos encargados de ejercer actividad antimicrobiana en este grupo de bacterias.

Otro trabajo de investigación perteneciente a Costa, et al., (2013) detalla también que el uso de extractos hidroalcohólicos con etanol al 70% utilizado con *Pseudobombax marginatum* cuenta con capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria, demostrando que la familia *Pseudobombax* cuenta con características de inhibición microbiana, como fue finalmente concluido en este documento.

El estudio realizado por Moreno et al., (2021) menciona el gran potencial antimicrobiano de los metabolitos secundarios como taninos, saponinas y alcaloides. En particular, se ha reportado que estos compuestos pueden ser co-extraídos utilizando metanol, un solvente orgánico común. Los resultados de investigaciones previas sugieren que estos extractos metanólicos exhiben una actividad inhibitoria mínima (CMI) frente a ciertos hongos, lo cual coincide con los hallazgos del presente estudio. La similitud en los métodos de extracción y los perfiles de actividad antimicrobiana observados en investigaciones anteriores respaldan la hipótesis de que los compuestos fenólicos presentes en nuestros extractos podrían ser responsables de los efectos inhibitorios observados.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1 Conclusiones

En conclusión, se obtuvieron 6 extractos con diferentes concentraciones de solvente orgánico. Los tratamientos fueron utilizados en la prueba de sensibilidad de antibiograma lo que permitió conocer el nivel de inhibición frente a *E.coli* siendo el tratamiento 6 (85% solvente – 15 % hoja pulverizada de beldaco) el que mayor actividad inhibitoria tuvo en comparación de los demás.

La prueba estadística de análisis de varianza mediante una prueba anova se rechazó la hipótesis nula donde refleja en medida de los tratamientos un p-valor de 0.0158, siendo este menor a 0.05, demostrando así que existen diferencias significativas con respecto al tratamiento positivo (Oxitetraciclina).

Además, se encontró que el extracto puede alterar el rango de crecimiento exponencial de los microorganismos en la placa Petri, específicamente dentro del halo radial. Esto se observó durante la fase de latencia, que abarcó desde la primera hora hasta las once horas posteriores a la incubación. Los resultados fueron comparados con la plataforma estadística Combase, permitiendo una evaluación del crecimiento microbiano en relación con los datos experimentales obtenidos en este estudio.

### 6.2 Recomendaciones

Los resultados preliminares sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de beldaco son prometedores. Sin embargo, es necesario profundizar en el entendimiento de sus mecanismos de acción a nivel molecular. Identificar los compuestos bioactivos responsables de esta actividad y analizar su interacción con los microorganismos patógenos permitirá optimizar su potencial como agentes antimicrobianos en la industria alimentaria, abriendo nuevas vías para el desarrollo de productos más seguros y eficaces.

Si bien los resultados in vitro son prometedores, es indispensable evaluar la eficacia y seguridad de los extractos de beldaco en condiciones reales de aplicación. Se requieren ensayos en alimentos contaminados con patógenos para determinar su capacidad de inhibir la proliferación bacteriana. Asimismo, es fundamental llevar a cabo estudios de toxicidad exhaustivos para garantizar la inocuidad de estos compuestos en el contexto de la seguridad alimentaria.

Es crucial reconocer que los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio pueden no reflejar completamente la eficacia y seguridad de los extractos de beldaco en aplicaciones prácticas. Por ello, se recomienda realizar estudios adicionales en modelos más complejos y cercanos a las condiciones reales, incluyendo ensayos clínicos. Asimismo, es fundamental identificar y caracterizar los compuestos activos responsables de la inhibición de *E. coli* para evaluar su potencial y posibles efectos secundarios en el contexto de la salud pública y la seguridad alimentaria.

Además de su prometedora actividad antimicrobiana, los extractos de beldaco presentan un amplio espectro de propiedades bioactivas que merecen ser exploradas. Investigaciones futuras podrían centrarse en evaluar su potencial antioxidante, antiinflamatorio y cicatrizante, entre otras, ampliando así su rango de aplicaciones potenciales.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, D. (2015). *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Rev Invest Med Sur Mex*, 22(2), 57-63.  
<https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2015/ms152b.pdf>
- Bernal, M., y Guzman, M. (1984). El antibiograma de discos. *Revista de normalización de la técnica de Kirby-Bauer Biomedica*. 3(4), 1-10.  
<https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
- Betsabe, M. (2021). *Rotavapor, usos y definiciones*. Madrid: Santiana. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Madrid].  
<https://es.scribd.com/document/363053846/Rotavapor>
- Borrás, P. (2013). *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas*. 21(2), 76-83.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4956305>
- Bush, F., y Schmidt, S. (2022). Introducción a las bacterias gram negativas. *MDS Manuals*, 1-3.  
<https://www.msmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias-gram->
- Cantón, R., Gómez, N., Villa, J., García, J., y Gómez, M. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En *Procedimientos en Microbiología Clínica*. *Revista Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 5(3), 1-54.  
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>



- Centro de Control y Prevención de Enfermedades. (2022). *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). U.S. Departamento de salud y Servicios Humanos. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html>
- Combase. (2023). Combase web [Software predictivo página principal]. <https://www.combase.cc/index.php/en/>
- Costa, D., Thomazzi, S., Araujo, D., Viana, F., Santos, C., y Diniz, J. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar. *Journal of Ethnopharmacology*, *149*(2), 416–421. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874113004303?via%3Dihub>
- Carvalho, J., Ramella, L., de Queiroz, L., y Dorr, L. (2016). Towards a revision of *Pseudobombax dugand* (Malvaceae- Names by E. Hassler and R. Chodat in the related genus *Bombax* L. *Candollea*, 93–99. *Revista BioOne*, *69*(1), 1-8. <https://raipub.com/index.php/jns/article/view/3970>
- Nascimento, F., Diniz, E., Pereira, a., Mesquita, L., y Oliveira, A. (2008). Extractos vegetales en el control de plagas. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável grupo verde de agricultura alternativa (gvaa)*, *3*(3), 1-4.  
Dialnet-ExtractosVegetalesEnElControlDePlagas-7484143 (1).pdf
- Espinosa, J. (2019). *Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto hidroalcohólico de orégano (Origanum vulgare L.) sobre Escherichia coli y Salmonella Sp.* [Tesis de grado. Universidad Nacional de Chimborazo]. <file:///C:/Users/PIRU/Downloads/Tesis%20Jairo.pdf>
- Ferreira, I., Alves, G., Pinheiro, I., Morales, A., & Mei, L. (2019). Biodegradable PBAT-Based Nanocomposites Reinforced with Functionalized Cellulose

Nanocrystals from *Pseudobombax munguba*: Rheological, Thermal, Mechanical and Biodegradability Properties. *Polym Environ*, 1(7), 757–766.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-019-01389-z>

Figueroa, G., & Naranjo, L. (2017). *Caracterización y preparación del floema de la corteza del Beldaco (Pseudobombax millei)*. [Tesis de grado. Universidad de Guayaquil].  
[https://biblioteca.semisud.org/opac\\_css/index.php?lvl=notice\\_display&id=302407](https://biblioteca.semisud.org/opac_css/index.php?lvl=notice_display&id=302407)

González, J. (2010). Explicación Etimológica de las Plantas de la Selva. *Flora digital de la selva*, 14(3), 1-1357.  
<https://sura.ots.ac.cr/local/florula4/docs/ETIMOLOGIA.pdf>

Guzman, J., & Bernal, H. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*,(4), 3-4.  
<https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>

INEN. (2009). Instituto Ecuatoriano de Normalización. *Extractos Requisitos*  
<https://ia903209.us.archive.org/7/items/ec.nte.2421.2012/ec.nte.2421.2012.pdf>

Lobapo, C., Mendoza, N., & Reyes, D. (2020). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Vanilla spp.* [Tesis de pregrado, Autónoma de Puebla].  
[https://www.researchgate.net/publication/303651954\\_Evaluacion\\_de\\_la\\_actividad\\_antimicrobiana\\_de\\_extractos\\_de\\_Vanilla\\_spp](https://www.researchgate.net/publication/303651954_Evaluacion_de_la_actividad_antimicrobiana_de_extractos_de_Vanilla_spp)

López, N., Chavez, A., González, A., Ríos, C., & Rodríguez, L. (2022). Extractos vegetales. Obtención, caracterización y evaluación antimicrobiana contra microorganismos orales. *Tamé*, 5(3), 31-35.

[https://www.researchgate.net/publication/358119170\\_Extractos\\_vegetales\\_Obtencion\\_caracterizacion\\_y\\_evaluacion\\_antimicrobiana\\_contra\\_microorganismos\\_orales](https://www.researchgate.net/publication/358119170_Extractos_vegetales_Obtencion_caracterizacion_y_evaluacion_antimicrobiana_contra_microorganismos_orales)

Mera, L., Ezpinosa, M., Vite, F., Valle, P., Mendoza, L., & Macías, A. (2019). *Microbiología.y.Salud. 3 Ciencias*.

<http://dx.doi.org/10.17993/Med.2019.62>

Ministerio de Salud Pública. (2022). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos, otras intoxicaciones alimentarias. *Ministerio de Salud Pública*.

<https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/11/ETAS-41.pdf>

Morales, M., & Durand, V. (2021). Extracción y caracterización del floema de beldaco "*Pseudobombax mille*" y su capacidad inhibitoria contra microorganismo. [Tesis de grado, Universidad de Guayaquil]

<https://repositorio.ug.edu.ec/server/api/core/bitstreams/e2fbb5f6-8bd7-46be-b2cc-b7673b0ab737/content>

Moreno, M., Ramirez, L., Cedeno, E (2021) Evaluación del efecto antagónico de una biopelícula con extractos de *Samanea saman* frente a *Colletotrichum gloeosporioides* responsable de la antracnosis en mango, *Bionatura*, 1-7 (6).

<https://www.revistabionatura.com/files/2021.06.01.5.pdf>

Ortiz, José (2022). Patrón McFarland. *Microbiología industrial*. 1-5 (2).

<https://es.scribd.com/document/379366627/Lab-Escala-McFarland>

Palavecino, H., Tobar, M., Nieto, F., & Bueno, M. (2013). Microorganismos y enfermedades. Ministerio de Economía, Fomento y Turism. *SERNAPESCA*, 1(2), 1-5.

[http://www.imii.cl/wp-content/uploads/2015/10/Libro\\_IMII\\_Microbiologia.pdf](http://www.imii.cl/wp-content/uploads/2015/10/Libro_IMII_Microbiologia.pdf)

Pérez, A., Rojas, J., Chamorro, L., & Pérez, K. (2011). Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de

- Colletotrichum* spp. *Acta Agronómica*, 4(2), 158-164.  
<http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=169922373007>
- Pitman, L., Endara, L., Ulloa, L., & Navarrete, H. (2003). *Pseudobombax millei* has most recently been assessed. *The IUCN* .1(2), 5-9.  
<https://www.iucnredlist.org/species/43202/10784378>
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos de los patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Principal de México*, 44(5), 445-475.  
[https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342002000500011](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011)
- Rodríguez, J. (2005). Microbiología: Lo esencial y lo práctico. *Organización Panamericana de la Salud*.1(9), 33-67.  
[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51601/MicrobiologiaPractico\\_spa.pdf?sequence=1](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51601/MicrobiologiaPractico_spa.pdf?sequence=1)
- Rodríguez, R., & Alvarez, N. (2021). Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de *Calendula officinalis* L. *Investigación, Optimización y Nuevos Procesos en Ingeniería*, 3(8), 1-9.  
<https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/12215>
- Sandoval, A., Camargo, J., Sánchez, J., & Montaña, N. (2010). Los microorganismos: pequeños gigantes. *Ciencia y cultura*, 17(77), 15-23.  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=29411989003>
- Silva, J. (2018). Interaction of *Pseudobombax marginatum* Robyns stem bark extract on the cell surface of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology and*, 5(2), 1-7.  
<https://www.researchgate.net/publication/324091943>

Terrem, V., Sanchez, P., & Benetiende, R. (2002). *Unidad Temática 3: Crecimiento Bacteriano. En Microbiología agrícola*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Entre Ríos].

<https://www.studocu.com/co/document/universidad-colegio-mayor-de-cundinamarca/microbiologia/unidad-3-crecimiento-bacteriano/17442034>

Trees, G. (2019). The Global Trees Campaign is a partnership between Fauna and Flora International and Botanic Gardens Conservation International. *BGCI*. 2(5), 66-83.

<https://www.jstor.org/stable/pdf/24811433.pdf>

Zevallos, P. (2017). *Taxonomía, Distribución Geográfica y Status del Género*.

[Tesis de posgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina]

[https://www.researchgate.net/publication/266558941\\_Taxonomia\\_distribucion\\_geografica\\_y\\_status\\_del\\_genero\\_Cinchona\\_en\\_el\\_Peru](https://www.researchgate.net/publication/266558941_Taxonomia_distribucion_geografica_y_status_del_genero_Cinchona_en_el_Peru)

## 8. Anexos

### Anexo N°1.

#### *Hojas y tallo de beldaco deshidratados*



Elaborado por: El autor, 2024

### Anexo N°2.

#### *Pulverización de las hojas de beldaco*



Elaborado por: El autor, 2024

**Anexo N°3.*****Preparación y posterior maceración de los tratamientos.*****Elaborado por: El autor, 2024****Anexo N°4.*****Filtrado de macerados*****Elaborado por: El autor, 2024****Anexo N°5.*****Obtención de extractos mediante el uso del rotavapor*****Elaborado por: El autor, 2024**



**Anexo N°6.*****Preparación de medio de cultivo enriquecido para Escherichia coli.***

Elaborado por: El autor, 2024

**Anexo N°7.*****Siembra de cepas en medio de agar enriquecido con discos de antibiograma adheridos***

Elaborado por: El autor, 2024

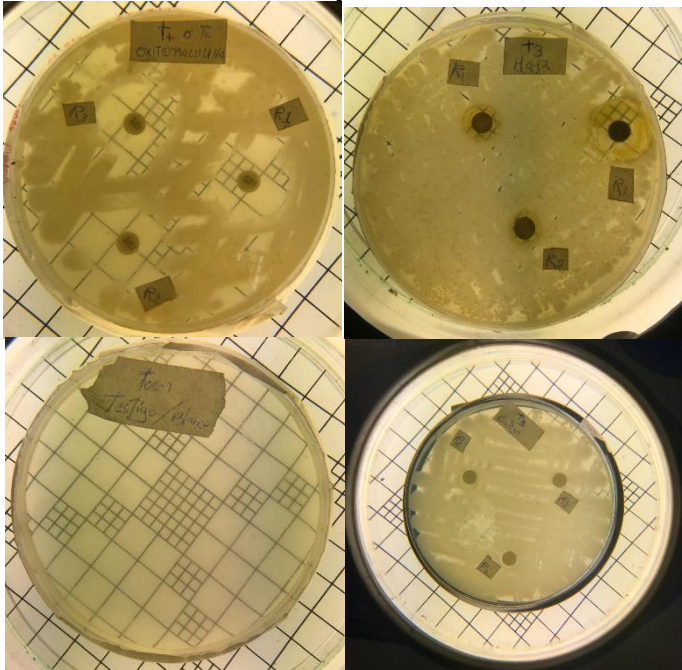


**Anexo N°8.**  
**Medios de cultivo en estufa a 34 °C.**



Elaborado por: El autor, 2024

**Anexo N°9.**  
**Medios de cultivo después de 48 horas**



Elaborado por: El autor, 2024

## Anexo N°10. Uso de oxitetraciclina

[Code of Federal Regulations]  
[Title 21, Volume 6]  
[CITE: 21CFR558.450]

TITLE 21--FOOD AND DRUGS  
CHAPTER I--FOOD AND DRUG ADMINISTRATION  
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES  
SUBCHAPTER E - ANIMAL DRUGS, FEEDS, AND RELATED PRODUCTS

PART 558 -- NEW ANIMAL DRUGS FOR USE IN ANIMAL FEEDS

Subpart B - Specific New Animal Drugs for Use in Animal Feeds

Sec. 558.450 Oxytetracycline.

(a) Specifications. Each pound of Type A medicated article contains:

(1) Oxytetracycline (from oxytetracycline quaternary salt) equivalent to 50 or 100 grams oxytetracycline hydrochloride; or oxytetracycline (from oxytetracycline dihydrate base) equivalent to 10, 30, 50, 100, or 200 grams oxytetracycline hydrochloride.

(2) Oxytetracycline (from oxytetracycline dihydrate base) equivalent to 50, 100, or 200 grams oxytetracycline hydrochloride; or 100 grams oxytetracycline hydrochloride.

(b) Sponsors. See sponsors in § 510.600(c) of this chapter as follows:

(1) No. 066104: Type A medicated articles as in paragraph (a) (1) of this section.

(2) No. 069254: Type A medicated articles as in paragraph (a) (2) of this section.

(c) Related tolerances. See § 556.500 of this chapter.

(d) Special considerations. (1) Federal law restricts medicated feed containing this veterinary feed directive (VFD) drug to use by or on the order of a licensed veterinarian.

**Fuente: Código de Regulación Federal, 2024**

## Anexo N°11. Descripción de estadístico

### *Descriptive Statistics*

	% de inhibición
Valid	21
Missing	0
Mean	29.781
Std. Deviation	34.203
Shapiro-Wilk	0.761
P-value of Shapiro-Wilk	< .001
Minimum	0.000
Maximum	100.000

**Elaborado por: El autor, 2024**

## Anexo N°12. Porcentaje de inhibición de tratamientos

ANOVA - % de inhibición

Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
tratamientos	19933.466	6	3322.244	13.431	< .001
Residuals	3462.907	14	247.350		

Note. Type III Sum of Squares

Descriptives - % de inhibición

tratamientos	N	Mean	SD	SE	Coefficient of variation
t1	3	12.567	5.358	3.093	0.426
t2	3	0.000	0.000	0.000	NaN
t3	3	14.933	1.963	1.133	0.131
t4	3	14.800	14.030	8.100	0.948
t5	3	27.433	17.956	10.367	0.655
t6	3	38.733	34.346	19.830	0.887
t0	3	100.000	0.000	0.000	0.000

Elaborado por: El autor, 2024

## Anexo N°13. Kruskal-Wallis test

Kruskal-Wallis Test

Factor	Statistic	df	p
tratamientos	14.161	6	0.028

Dunn ▼

Dunn's Post Hoc Comparisons - tratamientos ▼

Comparison	z	W <sub>i</sub>	W <sub>j</sub>	r <sub>rb</sub>	p	P <sub>bonf</sub>	Pholm
t1 - t2	1.497	9.500	2.000	1.000	0.134	1.000	1.000
t1 - t3	-0.266	9.500	10.833	0.222	0.790	1.000	1.000
t1 - t4	0.166	9.500	8.667	0.111	0.868	1.000	1.000
t1 - t5	-0.699	9.500	13.000	0.444	0.485	1.000	1.000
t1 - t6	-0.699	9.500	13.000	0.444	0.485	1.000	1.000
t1 - t0	-2.096	9.500	20.000	1.000	0.036	0.758	0.614
t2 - t3	-1.763	2.000	10.833	1.000	0.078	1.000	1.000
t2 - t4	-1.331	2.000	8.667	1.000	0.183	1.000	1.000
t2 - t5	-2.196	2.000	13.000	1.000	0.028	0.591	0.534
t2 - t6	-2.196	2.000	13.000	1.000	0.028	0.591	0.534
t2 - t0	-3.593	2.000	20.000	1.000	< .001	0.007	0.007
t3 - t4	0.432	10.833	8.667	0.333	0.665	1.000	1.000
t3 - t5	-0.432	10.833	13.000	0.333	0.665	1.000	1.000
t3 - t6	-0.432	10.833	13.000	0.333	0.665	1.000	1.000
t3 - t0	-1.830	10.833	20.000	1.000	0.067	1.000	1.000
t4 - t5	-0.865	8.667	13.000	0.556	0.387	1.000	1.000
t4 - t6	-0.865	8.667	13.000	0.556	0.387	1.000	1.000
t4 - t0	-2.262	8.667	20.000	1.000	0.024	0.497	0.474
t5 - t6	0.000	13.000	13.000	0.000	1.000	1.000	1.000
t5 - t0	-1.397	13.000	20.000	1.000	0.162	1.000	1.000
t6 - t0	-1.397	13.000	20.000	1.000	0.162	1.000	1.000

Note. Rank-biserial correlation based on individual Mann-Whitney tests.

Elaborado por: El autor, 2024

**Anexo N°14.*****Tabla de similitud entre tratamientos.***

<b>Tratamientos</b>	<b>Letter</b>
t1	a b
t2	a b
t3	a b
t4	a b
t5	a b
t6	a b
t0	c

**Elaborado por: El autor, 2024.**

**Anexo N°15.*****Marginal means-tratamientos***

<b>tratamientos</b>	<b>Marginal Mean</b>
t1	12.567 a
t2	$1.776 \times 10^{-14}$ a
t3	14.933 a
t4	14.800 a
t5	27.433 a
t6	38.733 a
t0	100.000 b
Error Estandar	9.080

**Elaborado por: El autor, 2024**

