



INAOE

**Extracción de compuestos antimicrobianos a  
partir de *Bacillus subtilis* aislado del intestino de  
abejas contra patógenos oportunistas de  
humanos**

por

**José Alberto Rivera Gaspar**

Tesis sometida como requisito parcial

para obtener el

grado de

**Maestro en Ciencias y Tecnologías  
Biomédicas**

en el

**Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y  
Electrónica**

Supervisada por

Dra. Teresita Spezzia Mazzocco *Teresita Spezzia*  
Dra. Marisol Sánchez Esgua

2025 Tonantzintla, Puebla

©INAOE 2025

Derechos Reservados

El autor otorga al INAOE el permiso de reproducir y  
distribuir copias de esta tesis en su totalidad o en partes  
mencionando la fuente.



## RESUMEN

*Bacillus subtilis* ha sido reconocida como una bacteria no dañina para animales o humanos, más bien, es uno de los microorganismos más versátiles en la producción de metabolitos secundarios, es un importante generador de compuestos antimicrobianos, muchos de ellos no estudiados aún. Por lo que, en este trabajo, se aplicaron técnicas de extracción de compuestos a partir de cepas de *B. subtilis* aisladas del intestino de abejas en busca de propiedades antagonicas contra patógenos oportunistas de humanos. A través de pruebas de antibiograma se evaluó la susceptibilidad de estos extractos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis*. Las extracciones se realizaron empleando solventes polares apróticos como acetato de etilo y diclorometano. Como control positivo se emplearon los antibióticos ciprofloxacino y sulfametoxazol. Los resultados mostraron que los extractos del medio de cultivo de *B. subtilis* tienen capacidad antimicrobiana y es similar al de los antibióticos evaluados. Por lo que se puede confirmar el potencial de la cepa de *B. subtilis* aislada del intestino de abeja como fuente importante de compuestos antimicrobianos, los que podrán ser purificados e identificados posteriormente y se podrán emplear para la elaboración de nuevos fármacos antimicrobianos.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, antibióticos, extractos con actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

*Bacillus subtilis* has been recognized as a harmless bacterium for animals or humans. Rather, it is one of the most versatile microorganisms in the production of secondary metabolites and an important producer of antimicrobial compounds, many of which have not yet been studied. Therefore, in this study, extraction techniques were applied to obtain compounds from *B. subtilis* strains isolated from the intestines of bees, aiming to identify antagonistic properties against opportunistic human pathogens.

Through antibiogram tests, the susceptibility of these extracts was evaluated against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. Extractions were performed using polar aprotic solvents such as ethyl acetate and dichloromethane. Ciprofloxacin and sulfamethoxazole were used as positive controls. The results showed that the culture medium extracts of *B. subtilis* exhibited antimicrobial activity comparable to that of the evaluated antibiotics.

Thus, the potential of the *B. subtilis* strain isolated from the bee intestine as a significant source of antimicrobial compounds can be confirmed. These compounds could later be purified and identified for use in the development of new antimicrobial drugs.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, antibiotics, antimicrobial activity extracts.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más profundo agradecimiento a las instituciones, al personal técnico, a los doctores y doctoras que contribuyeron con su apoyo para la realización de este trabajo, en especial a:

- **Al Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y Electrónica (INAOE)** y a **la técnica Mayra Salazar Morales** encargada del Laboratorio de Terapia Fotodinámica, por sus valiosas recomendaciones en el uso del laboratorio.
- **Al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional**, al **Dr. Aarón Mendieta Moctezuma**, por todo su respaldo académico; al **Biol. Javier Carbajal Ávalos**, por sus sugerencias y la excelente atención brindada cada vez que requerí su apoyo; y a **mi codirectora de tesis, la Dra. Marisol Sánchez Esgua**, por su paciencia, apoyo académico, personal y, sobre todo, por el tiempo invertido para lograr este proyecto.
- **Al Dr. Juan Manuel Pacheco Vega**, por cada una de sus enseñanzas y la asesoría brindada desde mis estudios en Ingeniería en Biotecnología. Le agradezco por su confianza en mí, sus excelentes consejos y su constante disposición para resolver mis dudas a lo largo de toda mi maestría.
- **A mi directora de tesis, la Dra. Teresita Spezzia Mazocco**, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su paciencia a lo largo del proceso y por el tiempo dedicado a mi formación.

Finalmente, agradezco al **CONAHCYT** por la beca otorgada con número de apoyo **832686** durante la realización de este proyecto.

## Contenido

|                                                          |      |
|----------------------------------------------------------|------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                   | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                    | XI   |
| Capítulo I.....                                          | 12   |
| INTRODUCCIÓN.....                                        | 12   |
| 1.1 Antecedentes.....                                    | 13   |
| 1.2 Planteamiento del problema.....                      | 14   |
| 1.3 Justificación.....                                   | 14   |
| 1.4 Objetivos.....                                       | 15   |
| 1.4.1 Objetivo general.....                              | 15   |
| 1.4.2 Objetivos específicos.....                         | 15   |
| 1.5 Hipótesis.....                                       | 16   |
| Capítulo II.....                                         | 16   |
| MARCO TEÓRICO.....                                       | 16   |
| 2.1 Extracción.....                                      | 16   |
| 2.2 Cromatografía.....                                   | 18   |
| 2.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC).....              | 18   |
| 2.2.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)..... | 20   |
| 2.3 Agentes antimicrobianos.....                         | 21   |
| 2.3.1 Metabolitos secundarios.....                       | 23   |
| 2.4 <i>Bacillus subtilis</i> .....                       | 24   |
| 2.5 Patógenos oportunistas.....                          | 26   |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                  | 27 |
| 2.5.1.1 Infección del sistema urinario.....                                                                          | 29 |
| 2.5.1.2 Enfermedades diarreicas relacionadas con <i>E. coli</i> .....                                                | 29 |
| 2.5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....                                                                        | 32 |
| 2.6 Microbiota intestinal de las abejas.....                                                                         | 33 |
| Capítulo III.....                                                                                                    | 34 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                                            | 34 |
| 3.1 Material biológico.....                                                                                          | 34 |
| 3.2 Crecimiento del microorganismo antagonico.....                                                                   | 34 |
| 3.3 Prueba de sensibilidad antimicrobiana con sobrenadante contra <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> .....       | 34 |
| 3.4 Producción de sobrenadante de la bacteria antagonista para extracción de compuestos antimicrobianos.....         | 36 |
| 3.5 Extracción de compuestos antimicrobianos.....                                                                    | 37 |
| 3.6 Cromatografía de capa fina (TLC).....                                                                            | 38 |
| 3.7 Prueba de sensibilidad antimicrobiana con extractos contra <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> .....          | 38 |
| 3.8 Elución del extracto obtenido con acetato de etilo.....                                                          | 39 |
| 3.9 Método Bradford para la cuantificación de proteínas.....                                                         | 40 |
| 3.10 Cuantificación de proteínas.....                                                                                | 42 |
| 3.11 Prueba de sensibilidad antimicrobiana con extractos eluidos contra <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> ..... | 45 |
| 3.12 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....                                                            | 46 |

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.13 Análisis estadístico.....                                                                                                                     | 46 |
| Capítulo IV.....                                                                                                                                   | 47 |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                    | 47 |
| 4.1 Inhibición de sobrenadante en cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> .....                                                            | 48 |
| 4.2 Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> con extracto obtenido con diclorometano.....                              | 52 |
| 4.3 Inhibición del extracto obtenido con acetato de etilo en cepas de <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> .....                                 | 52 |
| 4.4 Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> con extracto obtenido con acetato de etilo y eluído con acetonitrilo..... | 55 |
| 4.5 Cuantificación de proteínas.....                                                                                                               | 60 |
| 4.6 Cromatografía de capa fina de extractos sin elución.....                                                                                       | 60 |
| 4.7 Cromatografía líquida de alta resolución de extractos obtenidos con acetato de etilo eluídos con acetonitrilo.....                             | 60 |
| Capítulo V.....                                                                                                                                    | 61 |
| DISCUSIÓN.....                                                                                                                                     | 61 |
| Capítulo VI.....                                                                                                                                   | 63 |
| CONCLUSIONES Y TRABAJO A FUTURO.....                                                                                                               | 63 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                                                                                                                                  | 64 |
| ANEXO 1.....                                                                                                                                       | 71 |
| ANEXO 2.....                                                                                                                                       | 75 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 1. Proceso de extracción de un compuesto orgánico de una fase acuosa...                                                                                                  | 17 |
| Fig. 2. Elementos de cromatografía en capa fina.....                                                                                                                          | 19 |
| Fig. 3. Diagrama ilustrativo de las principales partes de un cromatógrafo líquido moderno.....                                                                                | 21 |
| Fig. 4. Aplicación potencial de metabolitos secundarios sintetizados por <i>B. subtilis</i> .....                                                                             | 25 |
| Fig. 5. Crecimiento bacteriano de <i>E. coli</i> en agar Luria Bertani.....                                                                                                   | 28 |
| Fig. 6. Crecimiento bacteriano de los patógenos en agar Luria Bertani.....                                                                                                    | 35 |
| Fig. 7. Obtención de sobrenadantes para prueba de sensibilidad antimicrobiana.....                                                                                            | 36 |
| Fig. 8. Prueba de sensibilidad antimicrobiana.....                                                                                                                            | 36 |
| Fig. 9. Proceso de extracción con diclorometano.....                                                                                                                          | 37 |
| Fig. 10. Evaporación del solvente y obtención del extracto seco.....                                                                                                          | 38 |
| Fig. 11. Extracción en fase sólida.....                                                                                                                                       | 40 |
| Fig. 12. Absorbancias vs concentraciones de los estándares.....                                                                                                               | 43 |
| Fig. 13. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> empleando sobrenadante de medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> ..... | 49 |
| Fig. 14. Producción de halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> empleando sobrenadante de medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> de 48 y 240 h.....            | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 15. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> empleando sobrenadante de medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> .....                                                                         | 51 |
| Fig. 16. Producción de halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> empleando sobrenadante de medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> de 48 y 96 h.....                                                                                     | 51 |
| Fig. 17. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> empleando extracto obtenido por medio de acetato de etilo en comparación con el obtenido con el antibiótico ciprofloxacino.....                       | 53 |
| Fig. 18. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> empleando extracto obtenido por medio de acetato de etilo en comparación con el obtenido con el antibiótico sulfametoxazol y trimetoprima..... | 54 |
| Fig. 19. Prueba de inhibición del extracto del sobrenadante del medio de cultivo obtenido con diclorometano.....                                                                                                                                             | 54 |
| Fig. 20. Producción de halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> empleando extracto obtenido con acetato de etilo.....                                                                                                 | 55 |
| Fig. 21. Producción de halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>S. epidermidis</i> empleando extracto obtenido con acetato de etilo y eluido con acetonitrilo.....                                                                       | 56 |
| Fig. 22. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> empleando extracto eluido con acetonitrilo en comparación con antibiótico ciprofloxacino.....                                                         | 57 |
| Fig. 23. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> empleando extracto eluido con acetonitrilo en comparación con antibiótico ciprofloxacino sulfametoxazol y trimetoprima.....                    | 58 |
| Fig. 24. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> empleando sobrenadante, extracto crudo obtenido con acetato de etilo y extracto eluido con acetonitrilo.....                                          | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Fig. 25. Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> empleando sobrenadante, extracto crudo obtenido con acetato de etilo y extracto eluído con acetonitrilo.....                             | 59 |
| Fig. 26. TLC realizada a extractos obtenidos con acetato de etilo.....                                                                                                                                                                                 | 60 |
| Fig. 27. Cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de extractos obtenidos con acetato de etilo eluídos con acetonitrilo. Los picos corresponden a dos compuestos presentes en la muestra, separados según sus tiempos de retención..... | 61 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Metabolitos secundarios con actividad antibiótica.....                                                                                                                                                         | 22 |
| Tabla 2. Procedimiento para la cuantificación de proteínas.....                                                                                                                                                         | 41 |
| Tabla 3. Absorbancias de los estándares.....                                                                                                                                                                            | 43 |
| Tabla 4. Absorbancias del extracto eluído 80:20.....                                                                                                                                                                    | 44 |
| Tabla 5. Absorbancias extracto eluído <10 kDa.....                                                                                                                                                                      | 45 |
| Tabla 6. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de <i>E. coli</i> empleando sobrenadante de medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> .....                                                                       | 49 |
| Tabla 7. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> empleando sobrenadante de medio de cultivo de <i>B. subtilis</i> .....                                                                | 50 |
| Tabla 8. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> y <i>E. coli</i> con extracto obtenido por medio de acetato de etilo.....                                                             | 52 |
| Tabla 9. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de <i>S. epidermidis</i> y <i>E. coli</i> con extracto obtenido por medio de acetato de etilo y eluído con acetonitrilo en comparacion con el antibiótico..... | 56 |

## Capítulo I INTRODUCCIÓN

Ante el creciente problema de la resistencia bacteriana a los medicamentos, surge la necesidad de desarrollar nuevas alternativas, como antibióticos de origen natural, que puedan ofrecer soluciones efectivas y sostenibles. *Bacillus subtilis* es un bacilo grampositivo que generalmente se encuentra en el agua, suelo y plantas. Tienen un sistema secretor que produce metabolitos secundarios para diferentes actividades como antibióticos naturales muy importantes para la medicina y del mismo modo en la agricultura [52].

*B. subtilis* es considerado un organismo modelo en microbiología y biología molecular debido a su simplicidad y relevancia científica, su genoma ha sido completamente secuenciado, lo que ha permitido investigaciones detalladas sobre regulación genética, expresión de genes y procesos celulares complejos, como la formación de esporas, la respuesta al estrés ambiental y la comunicación intercelular mediante señales químicas [8].

A lo largo de los años, se ha evidenciado el notable potencial de diversas cepas de *B. subtilis* para la producción de una amplia gama de metabolitos secundarios, lo que resalta su importancia en el ámbito de la salud humana. Estas bacterias no solo son esenciales para el desarrollo de nuevos antibióticos naturales, sino que también ofrecen soluciones prometedoras en la lucha contra la resistencia bacteriana, un problema creciente que amenaza la eficacia de los tratamientos convencionales.

A medida que se avanza en la comprensión de los mecanismos de acción de estos compuestos, se podrán explorar nuevas aplicaciones clínicas que beneficien a la salud pública [8, 52].

## 1.1 Antecedentes

*B. subtilis* ha sido reconocida de forma general por la FDA como una bacteria inocua para animales o humanos [36]. Además, consta de una versatilidad metabólica para producir compuestos de diferentes naturalezas como por ejemplo antibióticos, herbicidas fungicidas y surfactantes. Tomando en cuenta, estas propiedades de gran beneficio para los campos de la salud, la biotecnología, la agricultura y la industria alimentaria, su estudio y aplicación continúan siendo de alto interés científico.

Los antibióticos sintéticos son actualmente la primera opción para llevar el control del crecimiento de patógenos en humanos y animales por su rapidez y eficacia, comparado con compuestos naturales, ya que el uso no regulado de antibióticos ha inducido que las bacterias tengan mecanismos multirresistentes.

Como cepa de laboratorio, *B. subtilis* es el preferido para entender los principios fundamentales de las bacterias Gram positivas que han sido formadoras de esporas durante décadas. En la industria biotecnológica, es el llamado caballo de batalla utilizado para la síntesis de una variedad de productos, desde enzimas hasta compuestos químicos.

Durante un par de décadas *B. subtilis* ha sido reconocida por la producción de lipopéptidos cíclicos complejos, incluyendo surfactinas [55], iturinas y fengicinas [54], que atraen un potencial interés biotecnológico y farmacéutico como biosurfactantes y antibióticos.

Actualmente se han reportado diferentes dihidroisocumarinas [19], macrólidos derivados de poliquétidos y lipopéptidos de cadena lineal [19], que presentan propiedades antimicrobianas.

Los lipopéptidos cíclicos complejos presentan una estructura no tan común y su potente bioactividad, así como actividad surfactante, los han convertido en atracción para su estudio e investigación. Su actividad surfactante tienen su origen en la estructura anfifílica, esta es creada por un esqueleto de péptido cíclico polar que se encuentra unido a una cadena alquílica no polar larga que puede ser ramificada o no. De forma general, la mayor parte de los lipopéptidos

ciclicos de *B. subtilis* son agrupados en familias de surfactinas, iturinas y fengicinas [19].

Por lo que en este trabajo de investigación se estudiaron las propiedades antimicrobianas de extractos del medio de cultivo de la cepa *B. subtilis* aislada de intestino de abejas, buscando la capacidad de inhibir a *E. coli* y *S. epidermis*.

## **1.2 Planteamiento del problema**

Durante años, la investigación de nuevos antibióticos no ha recibido tanta atención ni financiación como la de otros tratamientos más rentables. Esto debido posiblemente a la dificultad y complejidad de descubrir y desarrollar nuevos compuestos antimicrobianos efectivos. Por lo que resulta urgente nuevos estudios y desarrollos para encontrar alternativas que puedan ayudar a enfrentar las infecciones resistentes microbianas, cada vez más comunes. Por su parte, *B. subtilis* ha demostrado ser un excelente productor de compuestos antimicrobianos que han sido probados contra patógenos [46,48]. Sin embargo, dado la gran diversidad de metabolitos que es capaz de producir y la diversidad de ecosistemas en los que habita, aún queda mucho por explorar de esta especie y existe la posibilidad de encontrar nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas. Por lo cual, la investigación sobre *B. subtilis* se presenta como una vía fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias de control de patógenos y el fortalecimiento de la salud pública.

## **1.3 Justificación**

Hoy en día se sabe que los antibióticos han salvado vidas a lo largo de los años desde el descubrimiento de la penicilina en el año 1928 por el médico escocés Alexander Fleming hasta la fecha actual, considerando que la penicilina se comenzó a utilizar en el año de 1941. Sin embargo, existe una gran resistencia bacteriana a los antibióticos, ya que algunas bacterias han logrado sobrevivir a concentraciones de antibióticos que matan o inhiben a otras de su misma especie. Datos recientes han descrito que cepas de *S. epidermidis* han mostrado resistencia a cefazolina, ciprofloxacino, sulfametoxazol y oxacilina [42].

Debido el mal uso que se le ha dado a los antibióticos, con el paso del tiempo se han descubierto nuevas cepas que resisten a los mecanismos de acción de algunos antibióticos, esto es alarmante porque las bacterias resistentes a los antibióticos pueden causar infecciones que son más difíciles de tratar, lo que resulta en una mayor morbilidad y mortalidad. Por lo que se debe impulsar el estudio y desarrollo de nuevos antibióticos capaces de inhibir a cepas resistentes, de lo contrario la tasa de mortalidad causada por las enfermedades infecciosas seguirá creciendo, de no tomarse las medidas adecuadas frente a las resistencias a los antimicrobianos, en el año 2050 se producirán en el mundo más de 10 millones de muertes asociadas a la resistencia [44].

Una de las líneas de investigación en el área biomédica está enfocada en encontrar nuevos compuestos naturales que sirvan para poder combatir infecciones que producen ciertas bacterias que hoy en día presentan resistencia a diferentes fármacos. Es por eso que este proyecto tiene la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana que presentan los compuestos extraídos a partir de *B. subtilis* aislados del intestino de abejas contra diferentes patógenos humanos.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios extracelulares producidos por *B. subtilis* aislada del intestino de abejas.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

1. Identificar la capacidad antimicrobiana del sobrenadante de crecimiento de *B. subtilis* contra *E. coli* y *S. epidermidis* por el método de antibiograma.
2. Establecer un sistema de extracción de los metabolitos activos empleando solventes.
3. Fraccionar y probar la actividad antagónica de los diferentes metabolitos secundarios del cultivo de *B. subtilis* contra *E. coli* y *S. epidermis*.
4. Comparar la respuesta inhibitoria de los metabolitos extraídos con la obtenida con antibióticos comerciales.
5. Caracterizar parcialmente los extractos activos.

## 1.5 Hipótesis

Los compuestos antimicrobianos extraídos de *B. subtilis* aislada del intestino de abejas tienen actividad bacteriostática y/o bactericida contra microorganismos como: *E. coli* y *S. epidermidis*.

## Capítulo II MARCO TEÓRICO

### 2.1 Extracción

La extracción es la técnica que más se emplea para separar compuestos que se encuentra en una mezcla o para poder aislarlo de sus fuentes naturales. Se puede definir como la separación de un componente de una mezcla utilizando un disolvente [1].

La extracción con disolventes consiste en la distribución o reparto de un soluto entre dos fases líquidas inmiscibles. Esta técnica es extremadamente útil para hacer separaciones muy rápidas y limpias de sustancias orgánicas e inorgánicas [14].

El procedimiento consiste en agitar la fase acuosa utilizando un disolvente orgánico inmiscible en agua dejando que se separen las fases acuosas y orgánica. Los solutos existentes se distribuyen entre la fase acuosa y la fase orgánica, en relación con sus solubilidades relativas.

Algunos compuestos, como el yodo, alcoholes, ésteres, entre otros, son parcialmente solubles en las dos fases, orgánica y acuosa, por lo que, al agitar ciertas soluciones acuosas con algún disolvente orgánico, el compuesto se disuelve en forma parcial en algunos disolventes. Se necesita entonces, varias extracciones de manera que se pueda realizar una separación eficiente [1].

La extracción se usa de distintas formas en química orgánica. Varios compuestos orgánicos de origen animal presentan un elevado contenido de agua. El éter etílico es el solvente que se utiliza con frecuencia en las extracciones, aunque se emplean otros solventes de acuerdo con su polaridad y que no sean miscibles en agua, como el hexano, el éter de petróleo y cloruro de metileno.

En un método de extracción convencional, se mezcla la fase acuosa con algún solvente orgánico no miscible. Que se conoce como fase orgánica y esto se realiza empleando un embudo de separación. Dicho embudo es el que contiene dos solutos: uno que es de naturaleza orgánica, que es el que va a ser separado y otro que es de naturaleza inorgánica (Fig. 1).

Los solutos se distribuyen entre la fase acuosa y la fase orgánica en relación con sus niveles relativos de solubilidad una vez que se ha añadido el disolvente orgánico al embudo y se ha agitado la mezcla. Generalmente, las sales inorgánicas tienen una mayor afinidad por la fase acuosa, sin embargo, la mayoría de los compuestos orgánicos se disuelven fácilmente en la fase orgánica. En general, se necesitan realizar de dos a tres extracciones de una mezcla acuosa para transferir totalmente un compuesto orgánico no polar, como un hidrocarburo, al solvente orgánico [29].

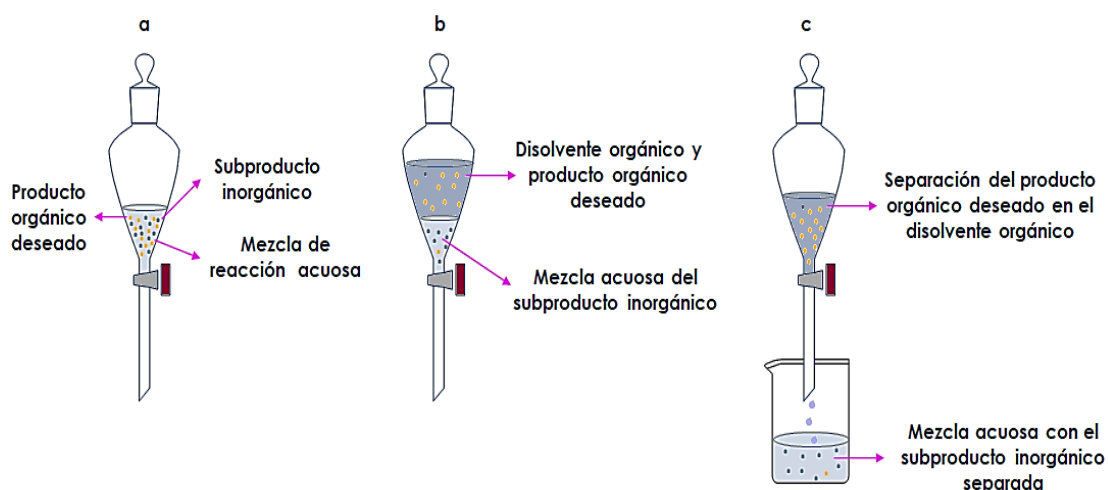


Fig. 1 Proceso de extracción de un compuesto orgánico de una fase acuosa [29].

Conviene distinguir entre los términos extracción y lavado. Ambos definen la misma operación, aunque se realizan con distinto fin, y la terminología cambia según cuál sea la fase de la que se parte: la extracción se refiere al paso del compuesto orgánico de interés de una fase acuosa a un disolvente orgánico, mientras que el lavado se realiza con una disolución acuosa para retirar de la fase orgánica un compuesto no deseado.

La extracción líquido-líquido es un método muy útil para separar los componentes de una mezcla. Su éxito depende de la diferencia de solubilidad del compuesto a extraer en dos disolventes diferentes [28].

## **2.2 Cromatografía**

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada define la cromatografía como un método físico utilizado para separar sustancias en dos fases: una fase estacionaria y otra móvil. En este proceso, los componentes a separar se distribuyen entre esas dos fases [43].

La fase estacionaria suele estar en una columna, pero también puede adoptar otras formas, como una fase plana (hoja plana). Las técnicas cromatográficas han sido valiosas en la separación y análisis de mezclas altamente complejas y han revolucionado las capacidades de la química analítica [14].

La cromatografía facilita la separación, el aislamiento y, en muchas ocasiones, la identificación de componentes estrechamente relacionados que se encuentran en mezclas complejas. En numerosos casos, no es posible llevar a cabo estas separaciones mediante otros métodos, lo que convierte a esta técnica en una herramienta útil en todas las disciplinas científicas [43].

En el ámbito laboral, la cromatografía es uno de los métodos cuantitativos más apreciados, relevantes y precisos. A través de diversos muestreos y pruebas, permite asegurar que un producto cumple con los estándares de calidad establecidos por la empresa, además de identificar impurezas no deseadas, optimizar el proceso y, como resultado, obtener un producto más competitivo [27].

### **2.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)**

Se lleva a cabo sobre papel u otro material sólido, y a menudo se denomina "en capa delgada" porque la fase estacionaria cubre una superficie plana y rígida. En la cromatografía en capa fina (TLC), la fase estacionaria consiste en una capa de pequeñas partículas, de unos pocos milímetros de grosor, adheridas a un soporte sólido, que suele ser de aluminio, plástico o vidrio. Una vez que se aplica

el analito cerca de la base de la placa seca, el disolvente inicia el proceso de separación [27].

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica versátil para la separación de clases de lípidos. Ofrece una excelente resolución, se puede utilizar tanto para aplicaciones preparativas como analíticas, y no requiere equipo costoso [20].

Es una forma de cromatografía de adsorción en la cual la fase móvil se mueve por capilaridad a través de la fase estacionaria (adsorbente) aplicada como una capa fina y uniforme sobre un soporte inerte de vidrio, plástico o lámina de aluminio (Fig. 2). La TLC puede ser considerada como una cromatografía de lecho abierto, y el mecanismo de separación se basa generalmente en un proceso de adsorción. Sin embargo, es factible que ocurra un proceso de partición o una combinación de ambos efectos, dependiendo del tipo particular de adsorbente, su preparación y el uso con diferentes fases móviles. Si por ejemplo la fase móvil contiene agua, metanol, u otros solventes muy polares, este líquido puede ser adsorbido desde la fase móvil que está avanzando, convirtiendo así el sistema de adsorción en un sistema cromatográfico de partición [40] .

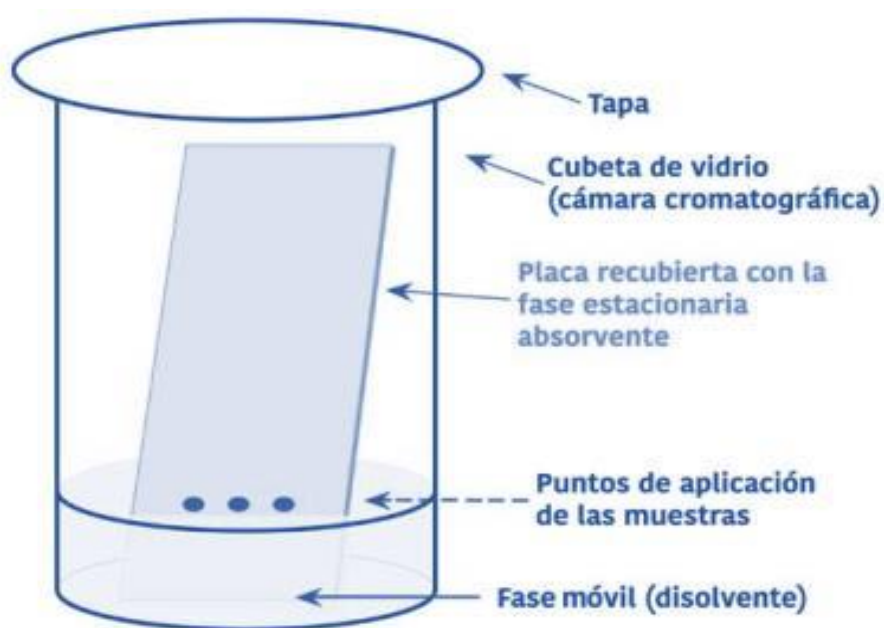


Fig. 2 Elementos de cromatografía en capa fina (TLC) [27].

### 2.2.2 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se ha convertido en una de las herramientas más eficaces en el campo de la química analítica, emplea bombas de alta presión para impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria contenida en una columna de diámetro reducido [30]. Permite separar, identificar y cuantificar los compuestos presentes en cualquier muestra soluble en líquido. Este método es uno de los más precisos utilizados en el análisis cualitativo y cuantitativo de productos farmacéuticos. Su funcionamiento se basa en inyectar una solución de la muestra en una columna que contiene un material poroso (fase estacionaria), mientras un líquido (fase móvil) se bombea a alta presión a través de dicha columna. La separación de los componentes se produce debido a las diferencias en las velocidades de migración en la columna, que dependen de cómo se distribuyen los compuestos entre la fase estacionaria y la fase móvil. Según el comportamiento de partición de los diferentes componentes, la elución ocurre en distintos momentos. Los compuestos que tienen una mayor afinidad por la fase estacionaria se desplazarán más lentamente y recorrerán distancias más cortas, en contraste con aquellos que tienen menor afinidad, que se moverán más rápido y cubrirán mayores distancias. Además, la HPLC es más versátil que la cromatografía de gases, ya que no se limita a muestras volátiles y térmicamente estables, y ofrece una mayor variedad en la selección de fases móviles y estacionarias [58].

Las principales fuerzas que actúan en las moléculas son:

- Las fuerzas de dispersión de London
- Las interacciones dipolo
- Las interacciones por puente de hidrógeno
- Interacciones dieléctricas
- Interacciones electroestáticas

Cualquier variación de estas fuerzas afectará directamente el grado de separación obtenido [50].

La cromatografía líquida moderna es más compleja y sofisticada que la cromatografía líquida clásica, la cromatografía líquida moderna es rápida y automatizada a diferencia de la clásica que es lenta y manual. A diferencia de la cromatografía gaseosa, donde todos los componentes del cromatógrafo están encerrados en una caja "sellada", en la cromatografía líquida, los equipos son frecuentemente modulares (Fig. 3). Así, generalmente es posible intercambiar un módulo de un equipo (por ejemplo, un detector) de una marca por uno equivalente de otra marca, lo que permite que los equipos se monten con módulos de diferentes fabricantes, de acuerdo con el interés del usuario. Esto permite al usuario configurar un cromatógrafo líquido según sus necesidades y preferencias, en lugar de ajustarse a modelos rígidos preestablecidos [22].

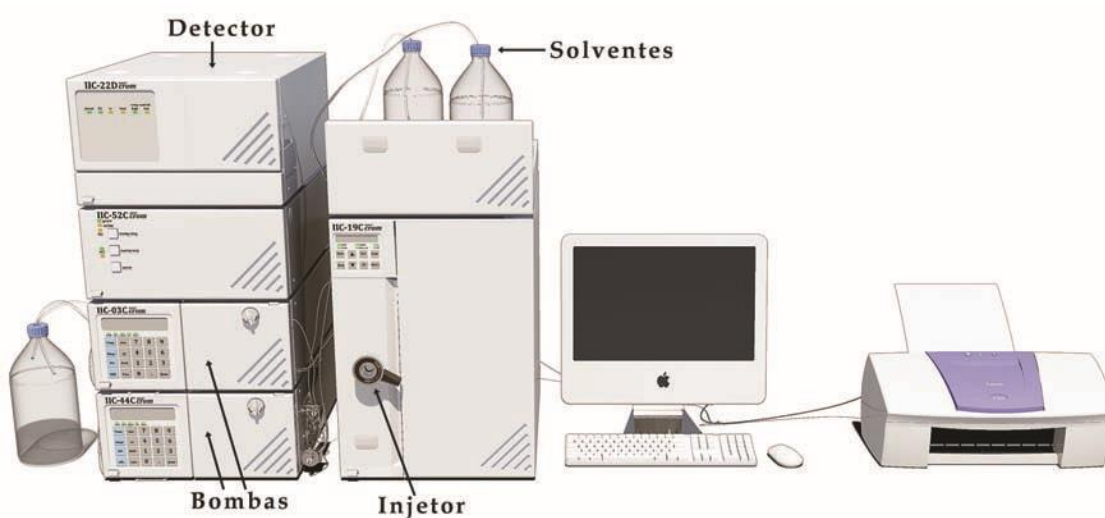


Fig. 3 Diagrama ilustrativo de las principales partes de un cromatógrafo líquido moderno [22].

### 2.3 Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son aquellas sustancias que tienen la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento de diversos microorganismos y pueden ser de origen microbiano o plantas. Los agentes antimicrobianos se han usado a lo largo del tiempo con el fin de combatir procesos infecciosos, pero en los últimos años se ha detectado resistencia a distintas clases de antibióticos. La resistencia implica que los tratamientos existentes sean ineficaces y que las opciones

clínicas y terapéuticas que existen para estas infecciones se reduzcan considerablemente.

Las bacterias aisladas de suelos son fuentes importantes de metabolitos especializados, incluidos antibióticos y otros compuestos de valor clínico que probablemente moldean las interacciones entre los miembros de la comunidad microbiana e impactan los ciclos biogeoquímicos [43].

Cientos de metabolitos secundarios que presentan actividad antimicrobiana han sido aislados y caracterizados por medio de cultivos *in vitro* de microorganismos y de plantas en diferentes laboratorios de investigación. Algunos de los antibióticos que se utilizan actualmente en el área de salud son metabolitos secundarios (Tabla 1) [21].

Tabla 1 Metabolitos secundarios con actividad antibiótica.

| <b>Metabolito</b> | <b>Producto Comercial</b>                                          | <b>Mecanismo de acción</b>                                                                        | <b>Referencia</b> |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Penicilinas G y V | Benzilpenicilina, fenoximetilpenicilina, amoxicilina y ampicilina. | Interfiere con la biosíntesis de los peptidoglicanos de la pared celular.                         | 5                 |
| Polimixina        | Colistina                                                          | Se une a la membrana externa de bacterias Gram negativas y provoca lisis de la célula bacteriana. | 21                |

|              |                    |                                                                                                    |    |
|--------------|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gentamicina  | Genkova y Gentamax | inhibe la síntesis de proteínas bacterianas, lo que conduce a la muerte de las bacterias.          | 21 |
| Bacitracina  | Bacitracina        | Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana.                                                 | 45 |
| Tetraciclina | Terramicina        | Inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. | 17 |

### 2.3.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos que los producen organismos como plantas, bacterias u hongos, los cuales no son requeridos para lograr su desarrollo, crecimiento o reproducción [21]. Sin embargo, estos compuestos desempeñan funciones cruciales en la interacción de los organismos con su entorno, particularmente en funciones de defensa y adaptación al estrés ambiental. Muchos metabolitos actúan como mecanismos de defensa química, protegiendo a las plantas de herbívoros y patógenos. Los metabolitos secundarios ofrecen ventajas adaptativas a los organismos que los producen, las cuales les permiten sobrevivir y competir en entornos desafiantes [31].

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse en función de su estructura química (por ejemplo, si tienen anillos o contienen un azúcar), composición (si contienen nitrógeno o no), su solubilidad en diversos disolventes, o la vía por la cual se sintetizan (por ejemplo, los fenilpropanoides, que producen taninos) [50].

Una clasificación sencilla de los metabolitos secundarios incluye los principales grupos:

- Terpenos: como volátiles de plantas, glucósidos cardíacos, carotenoides y esteroides.
- Fenólicos: como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, estilbenos, flavonoides, taninos y lignina.
- Compuestos que contienen nitrógeno: como alcaloides y glucosinolatos [31].

## **2.4 *Bacillus subtilis***

*B. subtilis*, una bacteria Gram positiva identificada por primera vez por Ferdinand Cohn en 1872 y ampliamente presente en diversos entornos como suelos, plantas y tractos digestivos de animales, ha sido estudiada por científicos durante más de 100 años [2].

Es no patógena y presenta una notable diversidad genética que le permite adaptarse a diversos nichos ecológicos, que van desde respiraderos hidrotermales en aguas profundas hasta el suelo y el tracto gastrointestinal humano. Su capacidad para formar esporas resistentes a condiciones adversas contribuye aún más a la supervivencia de *B. subtilis* en estos entornos desafiantes. Para obtener una ventaja selectiva en su hábitat particular, *B. subtilis* también produce un extenso repertorio de metabolitos bioactivos, incluidos poliketidos (PKs), péptidos no ribosomales (NRPs), péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados post-traduccionalmente (RiPPs) y terpenos con potentes propiedades antimicrobianas (Fig. 4). La especie también se utiliza como agente de biocontrol en la agricultura para combatir patógenos de plantas y promover el crecimiento vegetal [36].

Con el tiempo, se han descrito numerosas nuevas especies y subespecies basadas en la evolución molecular, fisiología y caracterización quimotaxonómica [18].

*B. subtilis* es un organismo modelo utilizado para investigar la motilidad celular, la formación de biopelículas, la secreción de proteínas, la división celular, la

biosíntesis de metabolitos secundarios, la adherencia a raíces de plantas y hifas fúngicas, y la alteración del citoplasma [18].

*B. subtilis* comparte similitudes tanto genéticas como fenotípicas con sus parientes cercanos, como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus megaterium*, en términos de genes y características físicas, lo que hace que los estudios comparativos sean útiles para obtener una comprensión más profunda de la diversidad de bacilos. *B. amyloliquefaciens* es uno de los parientes más cercanos de *B. subtilis* en términos de similitud genética y capacidades metabólicas, compartiendo muchas características, como la producción de antimicrobianos [2].

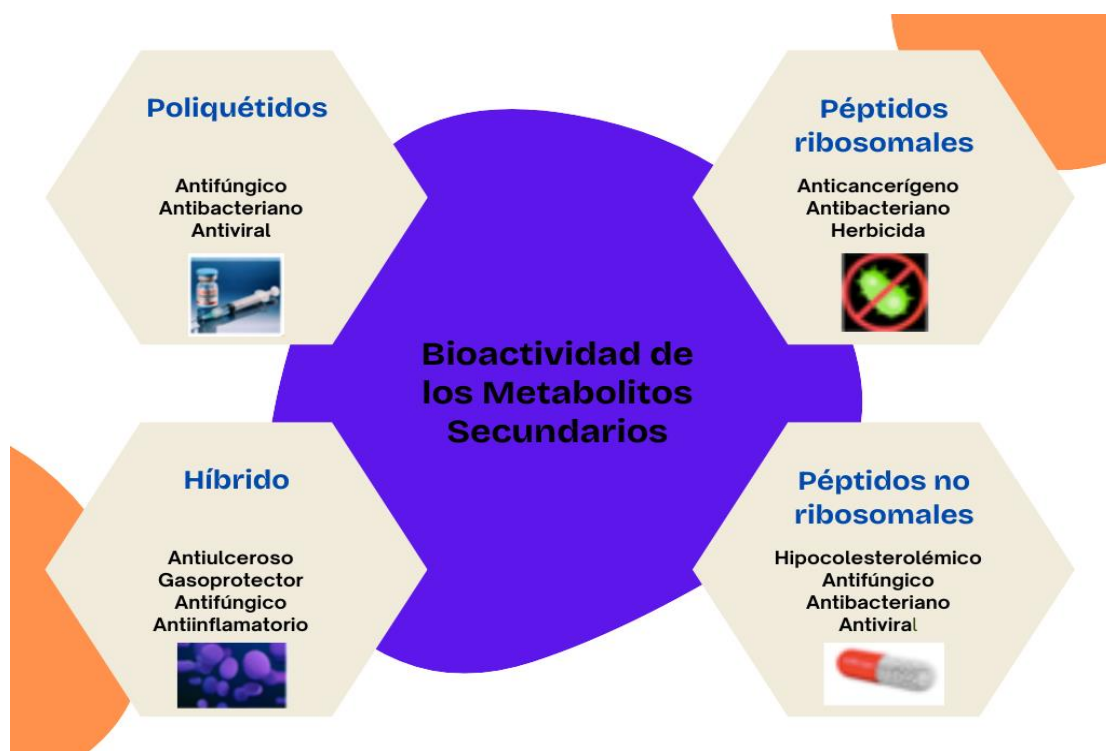


Fig. 4 Aplicación potencial de metabolitos secundarios sintetizados por *B. subtilis* [18].

Es procariota, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, que se puede aislar de distintos ambientes. Tiene forma bacilar con diámetro promedio de 850 nm, generalmente móvil con flagelos peritricos, se considera aerobia y

anaerobia facultativa, catalasa positiva que puede degradar el almidón. Crece en un pH de 4.9 a 9.3, a temperaturas entre 10 y 48°C y un óptimo de 28 a 35°C, con capacidad para formar endosporas.

La bacteria *B. subtilis*, clasificada taxonómicamente como perteneciente al phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus* y especie *subtilis*, tiene un ciclo de vida caracterizado por dos fases principales.

Durante su fase de crecimiento vegetativo o somático, que ocurre en condiciones favorables, la bacteria experimenta un rápido crecimiento mediante la fisión binaria, multiplicándose exponencialmente.

Sin embargo, cuando se enfrenta a condiciones adversas como la escasez de nutrientes, la bacteria entra en la fase de esporulación, en la cual tiene más probabilidad de producir metabolitos secundarios. Durante este proceso, forma endosporas, estructuras de resistencia que pueden sobrevivir en condiciones extremas durante períodos prolongados. Estas endosporas son una forma latente de la bacteria que puede volver a germinar cuando las condiciones ambientales son favorables para el crecimiento vegetativo.

El desplazamiento celular en *B. subtilis* se ve facilitado por la producción de agentes surfactantes, como las surfactinas, que reducen la tensión superficial y promueven el movimiento, se reconoce que *B. subtilis* produce iturinas, fengicinas y bacteriocinas [15]. Las bacteriocinas presentan un peso molecular de acuerdo a la forma que se clasifican: los lantibióticos, péptidos policíclicos y termoestables, tienen un tamaño menor a 3.4 kDa, los no lantibióticos, péptidos lineales termoestables son menores a 10 kDa y los péptidos termolábiles son menores a 30 kDa [6]. La surfactina es un lipopéptido cíclico anfipático con un peso molecular de 1.036 kDa [3].

## **2.5 Patógenos oportunistas**

Hay bacterias que se adaptan a diversos entornos y hospedadores, incluyendo tanto a humanos como a animales, con los que pueden formar relaciones simbióticas. No obstante, en ciertas circunstancias, pueden actuar como

patógenos oportunistas, causando infecciones que se consideran zoonóticas [32].

Los patógenos oportunistas son microorganismos que, en condiciones normales, no enferman a personas sanas, pero pueden causar infecciones severas en aquellos con sistemas inmunitarios debilitados o con otras enfermedades [37].

Estos microorganismos son parte normal de la flora microbiana presente en el huésped o en el entorno que lo rodea, pero no son capaces de causar daño en individuos con un sistema inmunitario competente.

La secuenciación de genomas completos ha mostrado características genómicas relacionadas con la adaptación patogénica, que en ciertos casos, son compartidas por patógenos oportunistas que habitan diferentes nichos en el mismo hospedador, lo que da lugar a similitudes biológicas y evolutivas muy interesantes [10].

### **2.5.1 *Escherichia coli***

*E. coli* es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa, con forma de bastón y que no forma esporas (Fig. 5). Se ha estudiado ampliamente por su alta presencia en el organismo humano y la facilidad con la que se cultiva en laboratorio. La mayoría de las especies de *E. coli* se encuentran en el intestino de los animales de sangre caliente. Esta bacteria es el comensal anaerobio facultativo más abundante en la microbiota del tracto gastrointestinal y, junto con otros microorganismos, es crucial para el correcto funcionamiento del proceso digestivo. Se le considera una bacteria "buena" porque la mayoría de sus especies no son patógenas y ayudan a prevenir la colonización por bacterias dañinas. Sin embargo, hay especies *coli* que causan diversas complicaciones, incluyendo infecciones relacionadas con dispositivos médicos, como catéteres uretrales e intravasculares, así como articulaciones y prótesis. Las cepas responsables de infecciones gastrointestinales se conocen como *E. coli* diarreogénicas o intestinales, mientras que las que provocan infecciones en otros sistemas, como el tracto urinario, sanguíneo y nervioso, se denominan *E. coli* patogénicas extraintestinales (ExPEC). Debido a su capacidad para formar biofilm, estas infecciones son difíciles de tratar farmacológicamente [15].



Fig. 5 Crecimiento bacteriano de *E. coli* en agar Luria Bertani [15].

Las cepas *shigatoxigénicas* y *verotoxigénicas* de *E. coli* (STEC y VTEC) son conocidas por producir toxina Shiga y toxina similar a Shiga (verotoxina), respectivamente. Las cepas de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) aunque causan enfermedades en los humanos, no siempre resulta en daño. El serotipo EHEC O157 es un patógeno humano que se ha encontrado responsable de brotes de diarrea con sangre y síndrome urémico hemolítico (SUH) a nivel mundial [41].

Una preocupación significativa radica en la posibilidad de que *E. coli* virulenta y/o resistente se transmita entre animales y humanos a través de diversas vías, como el contacto directo, la exposición a excrementos animales o mediante la cadena alimentaria. Además, esta bacteria representa un reservorio clave de genes de resistencia, los cuales pueden provocar fallos en el tratamiento médico tanto en humanos como en veterinaria. En las últimas décadas, se ha observado un aumento en la identificación de genes de resistencia en aislamientos de *E. coli*, muchos de los cuales se adquirieron mediante transferencia horizontal de genes. En el conjunto genético de las enterobacterias, *E. coli* desempeña un papel tanto como donante como receptor de genes de resistencia, lo que le permite adquirir genes de otras bacterias y transmitir sus propios genes de resistencia [38].

### **2.5.1.1 Infección del sistema urinario**

La infección del tracto urinario se caracteriza por la invasión de microorganismos en el sistema urinario, superando la capacidad de defensa del organismo. Esto provoca una respuesta inflamatoria y, eventualmente, cambios morfológicos o funcionales, generando síntomas clínicos que pueden afectar con mayor o menor frecuencia a personas de ambos sexos y a diferentes grupos poblacionales [25].

*E. coli* es la causa más común de infecciones del tracto urinario. Los síntomas típicos incluyen micción frecuente, dolor al orinar, presencia de sangre en la orina y presencia de pus en la orina. El dolor en la región lumbar puede indicar una infección del tracto urinario superior. Sin embargo, ninguno de estos síntomas es específico de la infección causada por *E. coli*. La infección del sistema urinario puede llevar a una bacteriemia, manifestando signos clínicos de septicemia.

La mayoría de las infecciones urinarias que afectan la vejiga o el riñón en individuos por lo demás sanos son causadas por un pequeño número de cepas de *E. coli* que han desarrollado factores de virulencia específicos que facilitan la colonización y las infecciones clínicas subsiguientes. Estas cepas se conocen como *E. coli* uropatógena. Usualmente, estas cepas producen hemolisina, que es citotóxica y facilita la invasión de los tejidos. Las cepas que causan pielonefritis expresan el antígeno K y elaboran fimbrias P, las cuales se unen al antígeno del grupo sanguíneo P [33].

### **2.5.1.2 Enfermedades diarreicas relacionadas con *E. coli***

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diarrea se define como “la aparición de evacuaciones sueltas o líquidas, con al menos tres o más episodios en un periodo de 24 horas”. Estas evacuaciones suelen tener una consistencia acuosa y continua, a veces con presencia de sangre, y pueden durar hasta 14 días o más.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y habitan en el intestino sin causar enfermedades en personas sanas. Sin embargo, algunas cepas patógenas pueden provocar diarrea y otras infecciones, especialmente en

individuos inmunocomprometidos. Estas cepas han evolucionado mediante la transferencia de genes, adquiriendo características que les permiten sobrevivir en el huésped. Las combinaciones de factores de virulencia han dado lugar a diversos patotipos de *E. coli*, conocidos como *E. coli* diarreagénicos [55].

La presencia de *E. coli* que provoca diarrea es muy común a nivel mundial. Estas cepas de *E. coli* se dividen en distintos grupos según las características de sus propiedades de virulencia, y cada grupo ocasiona enfermedad mediante mecanismos diferentes. Los genes que codifican las propiedades de adherencia a las células epiteliales del intestino delgado o grueso suelen encontrarse en plásmidos. Además, las toxinas suelen estar mediadas por plásmidos o fagos [33].

La *E. coli* enteropatógena (EPEC) es la forma más antigua de *E. coli* asociada a diarrea, identificada en estudios de 1940 y 1950 relacionados con brotes en recién nacidos y lactantes. Aunque ha disminuido como causa de diarrea en lactantes en Estados Unidos, Canadá y Europa desde finales de los años 60, sigue siendo un problema significativo en regiones en desarrollo, como América Latina, el sur de África y Asia. Inicialmente, las cepas de EPEC se definieron por su incapacidad para producir enterotoxinas o ser invasivas como *Shigella*. Sin embargo, en años recientes, se ha mejorado la comprensión de sus mecanismos de virulencia mediante avances en biología molecular y celular [11].

La *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) es una causa común de la "diarrea del viajero" y una preocupación significativa en lactantes de países en desarrollo [33].

La patogénesis de ETEC, al igual que la de otros microorganismos, implica la colonización o infección seguida de la liberación de sus mediadores para que afecten a las células del huésped. ETEC se caracteriza por la producción de toxinas termolábil (LT) y termoestable (ST), que están codificadas en plásmidos, cuyas estructuras y mecanismos de acción son bien conocidos. La adherencia de ETEC a los enterocitos se lleva a cabo a través de fimbrias, también codificadas en plásmidos; en las cepas de ETEC que afectan a humanos, estas fimbrias se conocen como factores de colonización [42].

Estas toxinas son antigénicas y pueden inducir la producción de anticuerpos que ofrecen cierta protección. No hay una relación definida entre ETEC y otras cepas de *E. coli* que causan diferentes tipos de diarrea. Es importante tomar precauciones con la ingesta de alimentos potencialmente contaminados para evitar la infección. Aunque la profilaxis antimicrobiana puede ser útil, puede aumentar la resistencia bacteriana a los antibióticos. Sin embargo, una vez que se desarrolla la diarrea, el tratamiento con antibióticos puede acortar su duración [33].

Las *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) son denominadas así debido a las toxinas citotóxicas que producen, conocidas como toxina similar a Shiga 1 y toxina similar a Shiga 2. Estas bacterias están asociadas con colitis hemorrágica y el síndrome hemolítico urémico (SHU). El serotipo O157:H7 es el más común y se identifica en muestras clínicas, siendo negativo para sorbitol y para las pruebas MUG. Otros serotipos no - O157 pueden fermentar sorbitol. Se utilizan métodos como ensayos de inmunoanálisis enzimático y pruebas de citotoxicidad en células Vero, además de la PCR para detectar los genes de la toxina en muestras fecales. La cocción completa de la carne molida puede prevenir la infección por STEC y sus complicaciones [33].

La patogenicidad de STEC está estrechamente vinculada a la actividad de sus toxinas. No obstante, la capacidad de la bacteria para colonizar el epitelio intestinal del huésped es fundamental para el proceso patogénico, y este aspecto se ha considerado el "primer eslabón" en el desarrollo de la enfermedad [55].

La *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) causa una enfermedad similar a la shigelosis, siendo más común en niños de países en desarrollo y en viajeros a estas regiones. Al igual que *Shigella*, las cepas de EIEC no fermentan lactosa y no son móviles, provocando enfermedad al invadir las células del intestino [33].

La EIEC se distingue por su capacidad de penetrar en la mucosa intestinal entre 6 y 12 horas después de la ingestión oral. La bacteria se adhiere, invade y destruye las células intestinales. Esta cepa invasiva puede generar pequeñas cantidades de enterotoxinas que están codificadas en un plásmido. Muchas de las cepas de este grupo son inmóviles (sin antígeno H) y fermentan la lactosa

muy lentamente o no la fermentan en absoluto. Los casos de infección son poco frecuentes y se caracterizan por fiebre, dolor abdominal y diarrea con moco y sangre [10].

Por otro lado, la *E. coli* enteroagregativa (EAEC) produce diarrea aguda y crónica, especialmente en personas de países en desarrollo, siendo también una causa de enfermedades transmitidas por alimentos en países industrializados. Estos microorganismos se caracterizan por adherirse a células humanas de manera específica y producen toxina similar a una hemolisina [33].

EAEC es un patógeno que, hasta ahora, solo ha sido detectado en humanos. Se distingue por su formación en grupos que recuerdan a ladrillos apilados, tanto sobre las células epiteliales como sobre el cristal.

La patogénesis de EAEC se puede dividir en tres fases:

1. La adherencia a la mucosa intestinal, que es principalmente facilitada por las fimbrias de adherencia agregativa.
2. La liberación de enterotoxinas y citotoxinas.
3. La inducción de inflamación en la mucosa.

EAEC genera otras toxinas con efectos citotóxicos, como las toxinas ShET1 (shigella enterotoxin 1) y Pic (proteasa involucrada en la colonización intestinal), las cuales están codificadas en el cromosoma bacteriano. Hasta ahora, no se han encontrado moléculas que se asocien exclusivamente con cepas de EAEC obtenidas de casos de diarrea, lo que hace que la búsqueda de moléculas que distingan cepas virulentas siga siendo un área de gran interés para la investigación científica [42].

### **2.5.2 *Staphylococcus epidermidis***

*S. epidermidis* es una bacteria grampositiva, coagulasa-negativa, que presenta forma de cocos agrupados en racimos. También es catalasa-positiva y anaerobia facultativa. Es la especie de *Staphylococcus* coagulasa-negativa más común en la piel humana. En su hábitat natural, como la piel y las mucosas, generalmente son inofensivas. Sin embargo, a menudo estas bacterias invaden el organismo

a través de dispositivos protésicos, permitiendo que una pequeña cantidad de microbios acceda al torrente sanguíneo. Pueden formar biofilms que les brindan protección contra las defensas del huésped y los antimicrobianos [23].

Los estafilococos coagulasa-negativo, especialmente el *S. epidermidis*, son comúnmente encontrados en laboratorios microbiológicos. A pesar de haber sido considerados como contaminantes culturales, se reconocen ahora como patógenos importantes, causantes de diversas condiciones clínicas, como infecciones urinarias intrahospitalarias, osteomielitis, endocarditis, bacteriemia en pacientes inmunosuprimidos, endoftalmitis postoperatoria y otras infecciones asociadas a dispositivos médicos.

El *S. epidermidis* ha adquirido resistencia a la meticilina de manera simultánea al *Staphylococcus aureus*, aunque con tasas considerablemente más altas. Esta resistencia ha aumentado significativamente en las últimas dos décadas [47].

## **2.6 Microbiota intestinal de las abejas**

Las abejas, *Apis mellifera*, son uno de los insectos más significativos en el ecosistema terrestre, no solo por la producción de miel, que tiene propiedades nutritivas y terapéuticas, sino también por su función crucial como polinizadores de diversas especies de plantas que dependen de los insectos para su reproducción [13].

La microbiota es fundamental para la salud de las abejas debido a sus efectos metabólicos y su capacidad para regular el sistema inmunológico, actuando como una barrera contra microorganismos patógenos. El sistema digestivo de las abejas melíferas contiene los siguientes géneros bacterianos predominantes, *Bombilacto-bacillus* (previamente conocido como *Lactobacillus* Firm-4 phylotype), *Lactobacillus* (Firm-5 phylotype), *Bifidobacterium*, *Gilliamella*, *Snodgrassella*, *Frischella*, *Bartonella* y *Commensalibacter* [57].

## Capítulo III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material biológico

La bacteria antagónica *B. subtilis* aislada de intestino de abejas proporcionada de la colección de microorganismos del Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional de Tepetitla Tlaxcala (CIBA-IPN). Los patógenos oportunistas de humanos: *E. coli* y *S. epidermidis* fueron proporcionados por el Laboratorio de Terapia Fotodinámica del Instituto Nacional de Astrofísica, Óptica y electrónica (INAOE).

#### 3.2 Crecimiento del microorganismo antagónico

Se realizó el crecimiento de la bacteria antagónica *B. subtilis*, utilizando el medio de agar Luria Bertani de Sigma Aldrich, tomando una asada de la caja Petri con la bacteria antagónica proporcionada por CIBA-IPN y realizando una siembra masiva, dejando crecer durante 24 horas a 37°C. Pasado ese tiempo se colocaron 5 ml de solución tampón salino fosfato (PBS) de MCD LAB, para levantar la bacteria usando un asa bacteriológica para remover la placa, quedando una solución blanquecina con la bacteria antagónica (solución stock).

#### 3.3 Prueba de sensibilidad antimicrobiana con sobrenadante contra *E. coli* y *S. epidermidis*

Se realizó la recuperación de *E. coli* y *S. epidermidis* en medio agar Luria Bertani de Sigma Aldrich, tomando 30 µL del vial que contenía *E. coli* y colocándolo en la caja Petri para posteriormente expandir de forma masiva con un asa bacteriológica, análogamente se sembró la bacteria *S. epidermidis* para su recuperación. Se incubó por 24 horas a 37°C, pasado ese tiempo se realizó una resiembra en placa de forma masiva de los patógenos oportunistas incubando 24 horas a 37°C (Fig. 6), posteriormente se colocaron 5 ml de PBS de MCD LAB, para levantar los patógenos usando un asa bacteriológica para remover cada una de las placas, la solución formada se colocó en tubos Eppendorf de, de cada

tubo se tomaron 100  $\mu$ L y se colocaron por triplicado en microplacas para leer densidad óptica de cada patógeno en lector de microplacas BIO RAD a 595 nm.

Se sembraron en cajas Petri por triplicado cada uno de los patógenos con densidad óptica de 0.1 tomando 30  $\mu$ L del tubo Eppendorf que contiene *E. coli* y se realiza un estriado masivo de la bacteria en la placa que contiene agar Luria Bertani. Análogamente se realizó un estriado masivo de *S. epidermidis*, dejando incubar 24 horas a 37°C.



Fig. 6 Crecimiento bacteriano de los patógenos en agar Luria Bertani.

Se realizaron fermentaciones de la cepa antagonista *B. Subtilis* inoculando 1ml de la solución stock en 9ml de medio líquido Luria Bertani en matraz Erlenmeyer de 50 ml incubando a 37°C por 24 horas, los cultivos se centrifugaron a 9000 rpm por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante colocándolo en tubos Eppendorf, el sobrenadante se filtró usando una membrana de poro de 0.22  $\mu$ m para que quedara libre de células (Fig. 7). Se mantuvo una cinética de crecimiento de los patógenos, probando inhibición cada 48 horas colocando por triplicado discos de papel filtro Whatman de 6 mm agregando de 15 a 20  $\mu$ L de sobrenadante en cada disco sobre los patógenos previamente sembrados de *E. coli* y *S. epidermidis* (Fig. 8), los halos formados se midieron utilizando el programa Image J.



Fig. 7 Obtención de sobrenadantes para prueba de sensibilidad antimicrobiana.

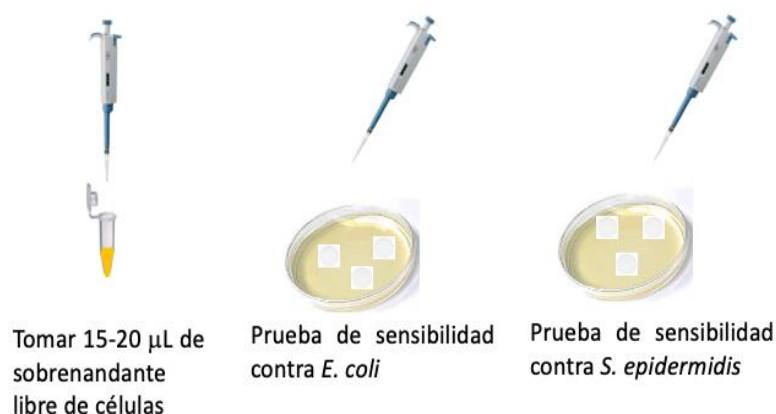


Fig. 8 Prueba de sensibilidad antimicrobiana.

### 3.4 Producción de sobrenadante de la bacteria antagonista para extracción de compuestos antimicrobianos

Se realizó la siembra de *B. subtilis*, en medio sólido de Luria Bertani (Sigma Aldrich), tomando una asada de la caja Petri que contiene la bacteria antagonista y realizando un estriado masivo en 5 placas Petri, se incubó durante 24 horas a 37°C. Después de ese tiempo se colocaron 5 ml de PBS de MCD LAB en cada una de las placas, obteniendo de esa manera la solución stock.

Se inoculó la cepa antagonista en medio de cultivo líquido Luria Bertani (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona de caseína, 10 g/L de cloruro de sodio) inoculando aproximadamente  $9 \times 10^5$  UFC/ml de *B. subtilis* en 500 ml del medio de cultivo, realizando la inoculación por triplicado en tres matraces Erlenmeyer de un litro y dejando incubarlo por 48 horas a 37°C, análogamente se repitieron los procedimientos para inocular a 96 y 240 horas.

Después del tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 9000 rpm por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante, se filtraron empleando una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (LUZEREN) para asegurarnos de tener el sobrenadante libre de células.

### 3.5 Extracción de compuestos antimicrobianos

Se utilizaron solventes de polaridad media para extraer compuestos con actividad antimicrobiana contra los patógenos *E. coli* y *S. epidermidis* a partir de los sobrenadantes. Las extracciones se llevaron a cabo con diclorometano y acetato de etilo en proporción 1:1 de fase acuosa y fase orgánica, agregando al embudo de decantación 50 ml de sobrenadante y 50 ml del solvente, se agitó vigorosamente abriendo y cerrando la llave de paso para liberar presión gaseosa que genera el solvente. Se realizaron dos extracciones recuperando la fase acuosa y fase orgánica por medio de la decantación (Fig. 9).

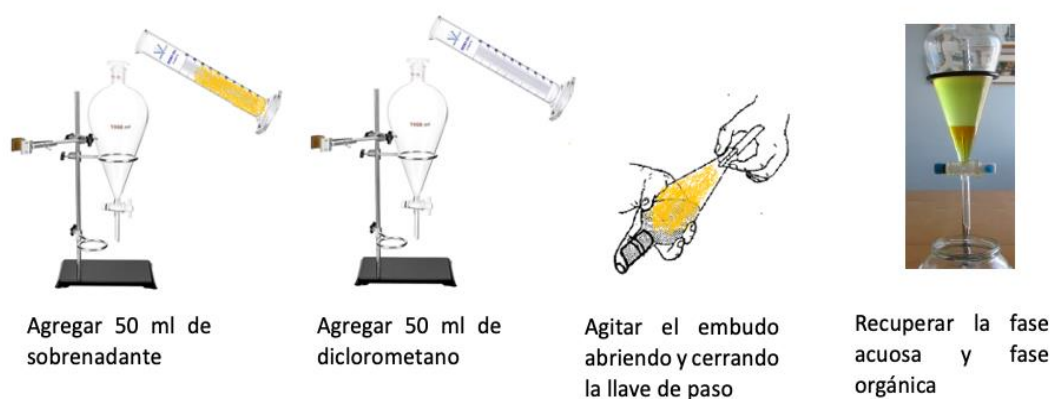


Fig. 9 Proceso de extracción con diclorometano.

Se evaporó la fase orgánica para lograr la recuperación del solvente colocando la fase orgánica en un matraz bola de 250 ml y colocándolo en un rotoevaporador (BUCHI), el primer extracto obtenido de la evaporación de diclorometano fue resuspendido en 1.5 ml de metanol y agregado a un vaso de precipitado de 10 ml previamente tarado (Fig. 10). Después de evaporarse el metanol, se determinó el peso del extracto y se probó su actividad disolviéndolo en metanol y usando la prueba de sensibilidad antimicrobiana en discos contra *E. coli* y *S. epidermidis*.

A un segundo extracto obtenido de la evaporación de acetato de etilo, se le realizó análogamente los pasos anteriores resuspendiendo en metanol y dejándolo secar para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana contra los patógenos oportunistas ya mencionados.



Fig. 10 Evaporación del solvente y obtención del extracto seco.

Partiendo de 50 ml de sobrenadante del cultivo líquido antagonista después de 48 horas de fermentación, se extrajeron compuestos antimicrobianos contra *E. coli* y *S. epidermidis* utilizando solventes orgánicos de polaridad media. Se selecciono acetato de metilo como el mejor sistema de extracción. La mayor cantidad de extracto seco que se obtuvo fue de 30 mg, la proporción de la fase acuosa con respecto a la orgánica fue de 1:1, utilizando 50 ml de acetato de etilo por 50 ml del sobrenadante para obtener dicho extracto.

### 3.6 Cromatografía de capa fina (TLC)

Los extractos se sometieron a cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica (Merck) de 5x10 cm empleando como fase móvil acetato de etilo/metanol en proporción 95:5. Se realizó una aplicación de aproximadamente 15 µL de extractos diluidos en metanol.

### 3.7 Prueba de sensibilidad antimicrobiana con extractos contra *E. coli* y *S. epidermidis*

Se sembraron los patógenos en placas Petri con medio Luria Bertani mediante estriado masivo, 24 horas antes de realizar el experimento. Transcurrido este tiempo, se colocaron discos de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro sobre las placas. A continuación, se aplicaron 15 a 20 µL de extracto seco diluido en

metanol sobre cada disco, con el fin de tratar los patógenos previamente sembrados, *E. coli* y *S. epidermidis*. Como control positivo, se utilizó el antibiótico ciprofloxacino (Laboratorios BEST) contra *E. coli* y la combinación de sulfametoxazol y trimetoprima (Laboratorios BEST) contra *S. epidermidis*. El metanol se utilizó como control negativo utilizando 20 µL por cada disco. Las concentraciones de los antibióticos fueron de 0.1 mg/mL, utilizando 20 µL de cada uno al colocarlos en los discos. Esta prueba de sensibilidad se llevó a cabo para evaluar la actividad del extracto a una concentración de 30 mg/mL.

### **3.8 Elución del extracto obtenido con acetato de etilo**

Para realizar la extracción en fase sólida (Fig. 11) se siguieron los siguientes pasos:

1. Se seleccionó el cartucho C18 que contiene la fase sólida (sílica) de la marca SILICYCLE.
2. Se acondicionó el cartucho agregando 6 ml de metanol para activar la fase sólida. Una vez agitado el metanol, se agregaron 6 ml de agua destilada para equilibrar el cartucho.
3. Una vez agotada el agua destilada se cargó la muestra agregando 1 ml de extracto seco diluido en acetonitrilo y agua a una concentración de 80:20 (800: 200 µL). De esta manera, el cartucho atrapó los compuestos de interés (analitos) mientras que las impurezas pasaron a través del cartucho.
4. Después de cargar la muestra, se realizó un lavado para eliminar las impurezas. Se agregaron 2 ml de metanol al 5%.
5. Una vez lavado el cartucho, se agregaron 2 ml de metanol para eluir los analitos (separarlos de la fase sólida).
6. Finalmente, se recuperó el eluido y se colocó en viales de la marca KIMAX para HPLC y posterior prueba de actividad antimicrobiana contra los patógenos.

Los pasos se repitieron para obtener 2 fracciones más del compuesto eluído, haciendo un cambio en el paso 3 utilizando concentraciones de acetonitrilo y agua de 90:10 (900: 100  $\mu$ L) y 95:5 (950: 50  $\mu$ L).

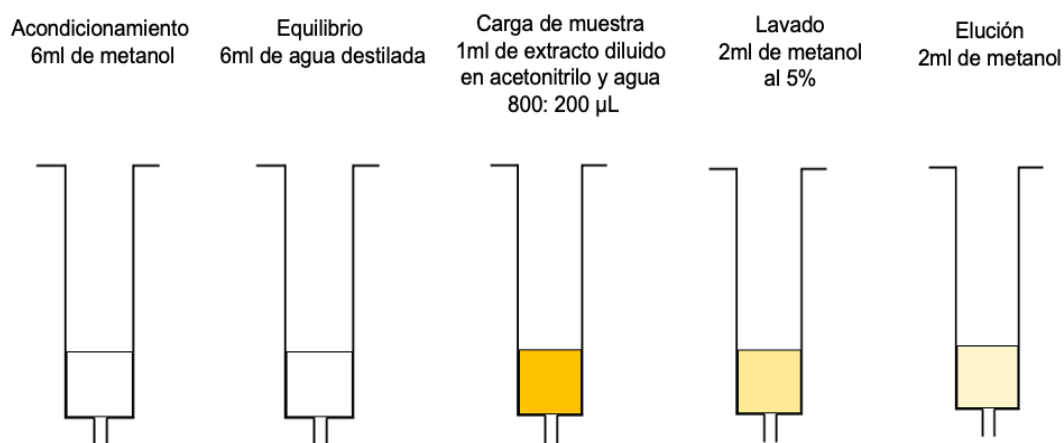


Fig. 11 Extracción en fase sólida.

El extracto eluído fue dializado utilizando una membrana de celulosa (Sigma Aldrich) de 2 kDa de tamaño de poro usando PBS con pH de 7 a 4°C durante 24 horas. El extracto dializado se fraccionó empleando una membrana de filtración centrífuga de 10kDa, agregando 1 ml de extracto dializado y 4 ml de buffer fosfatos de 50 mM con pH 7, a 9000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el filtrado para someterlo a prueba de sensibilidad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. epidermidis* y para la determinación de concentración de proteínas por el método Bradford.

### 3.9 Método Bradford para la cuantificación de proteínas

Se realizó el método Bradford al extracto eluído 80:20 (800:200  $\mu$ L acetonitrilo / agua) y la fracción proteica (extracto eluído < 10kDa) obtenida con membrana de filtración de 10 kDa de la misma concentración 80:20.

Se prepararon 8 tubos Eppendorf con los estándares y el blanco, siguiendo los pasos de las instrucciones del manual: Quick Start Bradford Protein Assay de BIO RAD como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Procedimiento para la cuantificación de proteínas.

| # Tubo | Volumen estándar (μL) | Fuente de estándar | Volumen del diluyente: agua estéril inyectable (μL) | Proteína final (μg/ml) |
|--------|-----------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|
| 1      | 300                   | BSA: 2 mg/ml stock | 0                                                   | 2,000                  |
| 2      | 375                   | BSA: 2 mg/ml stock | 125                                                 | 1500                   |
| 3      | 325                   | BSA: 2 mg/ml stock | 325                                                 | 1000                   |
| 4      | 175                   | Tubo 2             | 175                                                 | 750                    |
| 5      | 325                   | Tubo 3             | 325                                                 | 500                    |
| 6      | 325                   | Tubo 5             | 325                                                 | 250                    |
| 7      | 325                   | Tubo 6             | 325                                                 | 125                    |
| 8      | -                     | -                  | 325                                                 | 0                      |

BSA: albúmina sérica bovina

En una microplaca de 96 pozos se agregaron por duplicado 100 μL de la solución estándar de cada tubo en cada pozo y se colocan 100 μL de reactivo de Bradford.

Una vez preparada la placa se dejó incubar a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Después de este tiempo de incubación, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific).

Una vez obtenido los datos se realizó la construcción de la curva estándar (absorbancia vs concentración).

Para la preparación de la placa que contenía la muestra (extractos eluidos) se pipetearon 100  $\mu$ L de los viales para HPLC que contenía el extracto y se colocaron en cada pozo de la placa y se adicionaron 100  $\mu$ L de reactivo de Bradford. Se dejó incubar a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos para después medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro.

Una vez que se tuvieron las lecturas de absorbancia se utilizó la ecuación de la curva estándar (ecuación de regresión lineal) que se obtuvo con los datos de la Tabla 2 para calcular la concentración de proteínas en nuestras muestras (extractos eluidos). Se realizó mediante la interpolación de las absorbancias de las muestras en la curva estándar.

### **3.10 Cuantificación de proteínas**

Las absorbancias de los estándares, las cuales fueron utilizadas para construir la curva estándar, se presentan en la Tabla 3. Estos estándares fueron preparados en concentraciones conocidas para permitir la correlación entre la concentración de la sustancia de interés y su absorbancia en un espectrofotómetro. La curva estándar resultante (Fig. 12) , se obtuvo al graficar las absorbancias de los diferentes estándares contra sus concentraciones respectivas.

Tabla 3. Absorbancias de los estándares.

| Concentración $\mu\text{g/ml}$ | Absorbancia |
|--------------------------------|-------------|
| 125                            | 0.224       |
| 250                            | 0.270       |
| 500                            | 0.321       |
| 750                            | 0.347       |
| 1000                           | 0.526       |
| 1500                           | 0.596       |
| 2000                           | 0.650       |

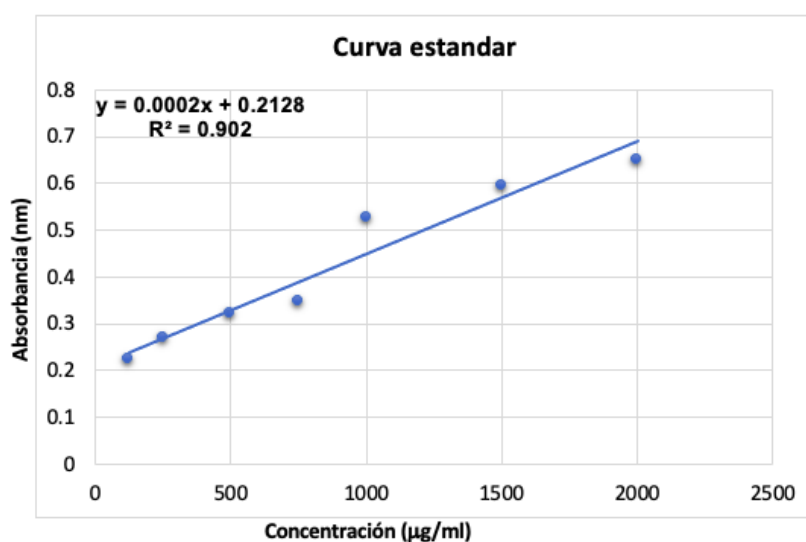


Fig. 12 Absorbancias vs concentraciones de los estándares.

Las absorbancias obtenidas del extracto eluido con la mezcla acetonitrilo/agua (80:20) a 595 nm se presentan en la Tabla 4. Estas mediciones se realizaron para evaluar la concentración de proteínas en el extracto, utilizando este valor específico de longitud de onda, que es óptimo para la detección de las sustancias de interés.

Tabla 4. Absorbancias del extracto eluido 80:20.

| <b>Número de pozo</b> | <b>Absorbancia</b> |
|-----------------------|--------------------|
| 1                     | 0.308              |
| 2                     | 0.319              |
| 3                     | 0.321              |
| 4                     | 0.347              |
| 5                     | 0.325              |

En la tabla 5 se presentan las absorbancias correspondientes a la fracción extracto eluido 80:20 < 10kDa obtenida mediante el uso de una membrana de filtración de 10 kDa. Estas absorbancias se realizaron para evaluar la concentración de proteínas en la fracción < 10 kDa.

Para sacar un promedio estimado eliminamos el valor más pequeño y el más grande y de esta manera obtenemos un promedio de absorbancia de: 0.322 para el extracto eluido 80:20 y 0.238 para el extracto eluido <10 kDa.

Tabla 5. Absorbancias extracto eluído 80:20 < 10kDa.

| Número de pozo | Absorbancia |
|----------------|-------------|
| 1              | 0.236       |
| 2              | 0.240       |
| 3              | 0.238       |
| 4              | 0.229       |
| 5              | 0.270       |

### 3.11 Prueba de sensibilidad antimicrobiana con extractos eluídos contra *E. coli* y *S. epidermidis*

Los patógenos fueron inoculados en placas Petri con medio Luria Bertani utilizando el método de estriado masivo, 24 horas antes de realizar el experimento. Después de este tiempo, se colocaron discos de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro sobre las placas. Posteriormente, se aplicaron entre 15 y 20 µL del extracto eluído sobre cada disco para evaluar su actividad antimicrobiana frente a los patógenos previamente inoculados, *E. coli* y *S. epidermidis*. Como control positivo, se utilizó ciprofloxacino (Laboratorios BEST) para *E. coli* y una combinación de sulfametoxazol y trimetoprima (Laboratorios BEST) para *S. epidermidis*. El acetonitrilo se empleó como control negativo, aplicando 20 µL sobre cada disco. Las concentraciones de los antibióticos fueron de 0.1 mg/mL, utilizando 20 µL de cada uno sobre los discos. Esta prueba de sensibilidad se realizó para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto eluído a una concentración de 30 mg/mL.

### **3.12 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Se realizó la cromatografía de acuerdo a los siguientes pasos:

1. Se realizó una limpieza del sistema empleando metanol y agua para evitar una contaminación cruzada entre análisis previos.
2. Se seleccionó la columna C18 de 20 cm de longitud de la marca Agilent ZORBAX en la cual la fase estacionaria separa los compuestos de la muestra.
3. Para la fase móvil se emplearon los disolventes agua, metanol y acetonitrilo y una mezcla de acetonitrilo y agua a razón de 80:20, 90:10 y 95:5. Se utilizaron 500 ml de cada disolvente. Los solventes se colocaron en el rack de solventes en frascos de la marca KIMAX de 1 litro de volumen.
4. Se colocaron los viales con 500  $\mu$ L de la muestra en el muestreador automático (autosampler).
5. Se ajustó la bomba empleando un flujo de la fase móvil de 1 mL/min.
6. Se programó el equipo para que inyecte la muestra con un volumen de 20  $\mu$ L, de esta manera se evita sobrecargar la columna.
7. El proceso de inyección se llevó al detector para obtener un cromatograma, donde cada pico correspondió a un compuesto separado.

### **3.13 Análisis estadístico**

Se realizó el análisis estadístico empleando la prueba t Student para la comparación de las medias del extracto eluído y el antibiótico y extracto crudo y antibiótico, utilizando cálculos numéricos detallados (Anexo 1). Este análisis estadístico tiene como objetivo determinar si existen diferencias significativas entre ambos compuestos en términos de su eficacia e inhibición contra los patógenos oportunistas. Para realizar la prueba, se estableció un nivel de significancia del 5%. Los resultados obtenidos permitieron evaluar la efectividad relativa del extracto eluído frente al antibiótico en cuestión.

Se optó por utilizar la prueba t de Student debido a su capacidad para comparar las medias de dos grupos con actividad antimicrobiana contra los patógenos

oportunistas. Esto permitió obtener y conocer las diferencias significativas entre el extracto eluido y los antibióticos analizados en esta tesis.

Se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA de un factor para comparar las medias de inhibición de tres tratamientos: sobrenadante, extracto crudo y extracto eluido, frente a *E. coli* (Anexo 2). El objetivo fue determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana entre los grupos evaluados. Se estableció un nivel de significancia del 5%. Tras obtener un valor de  $p$  menor a 0.05 en el ANOVA, se aplicó la prueba post hoc de Tukey para identificar las comparaciones específicas con diferencias significativas. Los resultados mostraron diferencias significativas entre todos los grupos: entre el extracto crudo y el eluido ( $p < 0.0001$ ), entre el extracto crudo y el sobrenadante ( $p = 0.0008$ ), y entre el extracto eluido y el sobrenadante ( $p < 0.0001$ ). Estos hallazgos evidencian que cada tratamiento presenta una eficacia diferencial significativa frente a *E. coli*, siendo el extracto eluido el de mayor potencia antimicrobiana entre los tres.

Se realizó un análisis estadístico mediante ANOVA de un factor con el objetivo de comparar la actividad antimicrobiana del sobrenadante, extracto crudo y extracto eluido frente a *S. epidermidis* (Anexo 2). Se utilizó un nivel de significancia del 5%. Al obtener un valor de  $p$  significativo en el análisis global, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para identificar las diferencias específicas entre tratamientos. Los resultados indicaron que tanto el extracto crudo como el extracto eluido presentaron diferencias significativas en comparación con el sobrenadante ( $p = 0.0001$  y  $p < 0.0001$ , respectivamente), lo que sugiere una mayor eficacia antimicrobiana de estos dos últimos. Sin embargo, no se observó una diferencia significativa entre el extracto crudo y el eluido ( $p = 0.4061$ ), lo cual indica que su actividad frente a *S. epidermidis* es estadísticamente similar.

## **Capítulo IV**

### **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos en este estudio confirmaron la capacidad de *B. subtilis* para producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. El sobrenadante del cultivo de *B. subtilis* en caldo Luria Bertani mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. epidermidis*. Se observó la formación de halos de inhibición en ambos cultivos bacterianos, lo que indicó la presencia de compuestos antimicrobianos en el medio de cultivo.

Los extractos obtenidos por extracción con acetato de etilo del sobrenadante de *B. subtilis* también presentaron actividad antimicrobiana, aunque de mayor intensidad comparado con el sobrenadante.

A pesar de esta diferencia en la magnitud de la actividad antimicrobiana, tanto los sobrenadantes como los extractos demostraron efectividad contra las cepas de *E. coli* y *S. epidermidis*. Estos resultados destacan la capacidad de *B. subtilis* para producir compuestos antimicrobianos, lo que refuerza la hipótesis de que los compuestos antimicrobianos extraídos de *B. subtilis* aislada del intestino de abejas tienen actividad bacteriostática y/o bactericida contra microorganismos como *E. coli* y *S. epidermidis*.

#### **4.1 Inhibición de sobrenadante en cepas de *E. coli* y *S. epidermidis***

En el análisis de los halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* (Tabla 6), se observó que los halos de mayor tamaño se generaron a las 48 y 240 horas de incubación (Fig. 14). Estos resultados indican que la actividad antimicrobiana exhibida por las muestras de sobrenadante es particularmente eficaz en estos intervalos de tiempo. A las 48 horas, la inhibición del crecimiento de *E. coli* fue notablemente amplia, lo que sugiere una liberación del agente antimicrobiano que alcanza su máxima eficacia en este periodo inicial. Sin embargo, a las 240 horas, aunque los halos de inhibición fueron menores en tamaño en comparación con el observado a las 48 horas.

Por otro lado, en el caso de *S. epidermidis* (Fig. 16 y Tabla 7), los halos de inhibición de mayor tamaño se observaron a las 48 y 96 horas. Sin embargo, en este caso, la mayor inhibición se alcanzó a las 48 horas. A las 96 horas, aunque se observó inhibición, su extensión fue significativamente menor.

Tabla 6. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* empleando sobrenadante de medio de cultivo de *B. subtilis*.

***E. coli* (área en mm<sup>2</sup>)**

| Tiempo | Dato 1 | Dato 2 | Dato3 | Dato 4 | Dato 5 | Dato 6 | Dato 7 | Promedio | D.E. |
|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|----------|------|
| 48     | 54.39  | 52.11  | 58.50 | 62.61  | 61.70  | 52.33  | 60.10  | 57.39    | 4.41 |
| 96     | 43.88  | 49.36  | 48.91 | 52.10  | 50.42  | 43.88  | 42.74  | 47.33    | 3.74 |
| 144    | 47.31  | 43.88  | 47.53 | 47.31  | 35.65  | 40.22  | 41.23  | 43.30    | 4.52 |
| 192    | 33.37  | 31.99  | 31.08 | 34.65  | 34.37  | 40.35  | 35.15  | 34.42    | 3.00 |
| 240    | 45.71  | 43.42  | 54.37 | 58.50  | 47.31  | 49.36  | 43.32  | 48.86    | 5.72 |
| 288    | 33.40  | 33.46  | 34.36 | 32.99  | 35.65  | 31.32  | 33.16  | 33.48    | 1.32 |
| 336    | 35.65  | 32.36  | 34.35 | 31.08  | 33.36  | 31.30  | 30.29  | 32.63    | 1.93 |

D.E: Desviación estándar

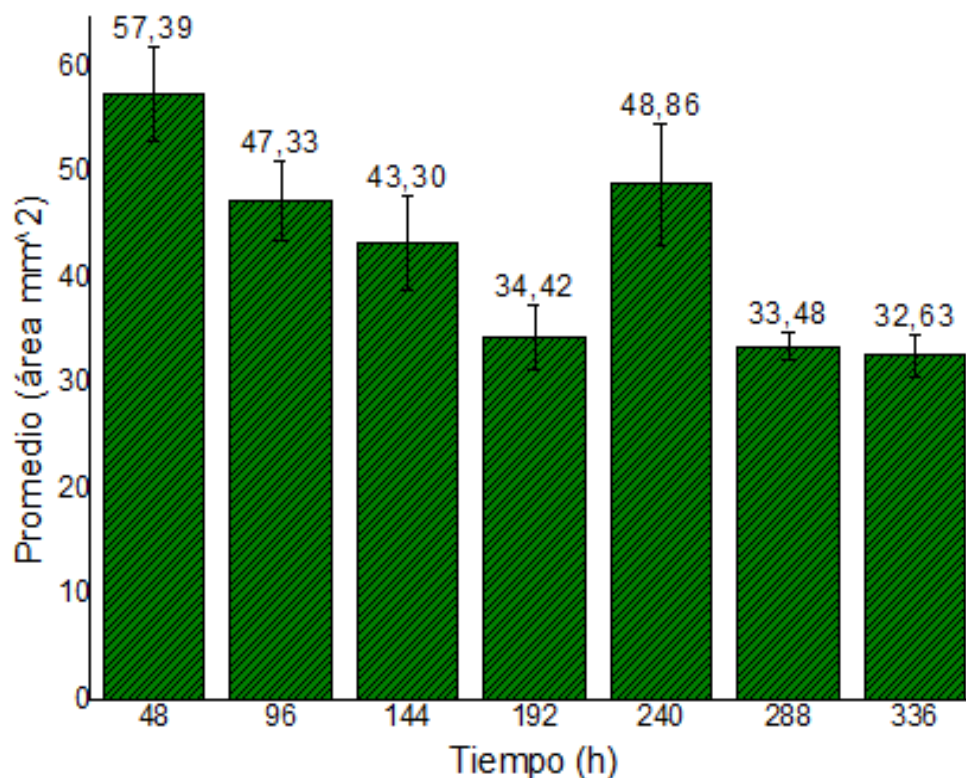


Fig. 13 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* empleando sobrenadante de medio de cultivo de *B. subtilis*.

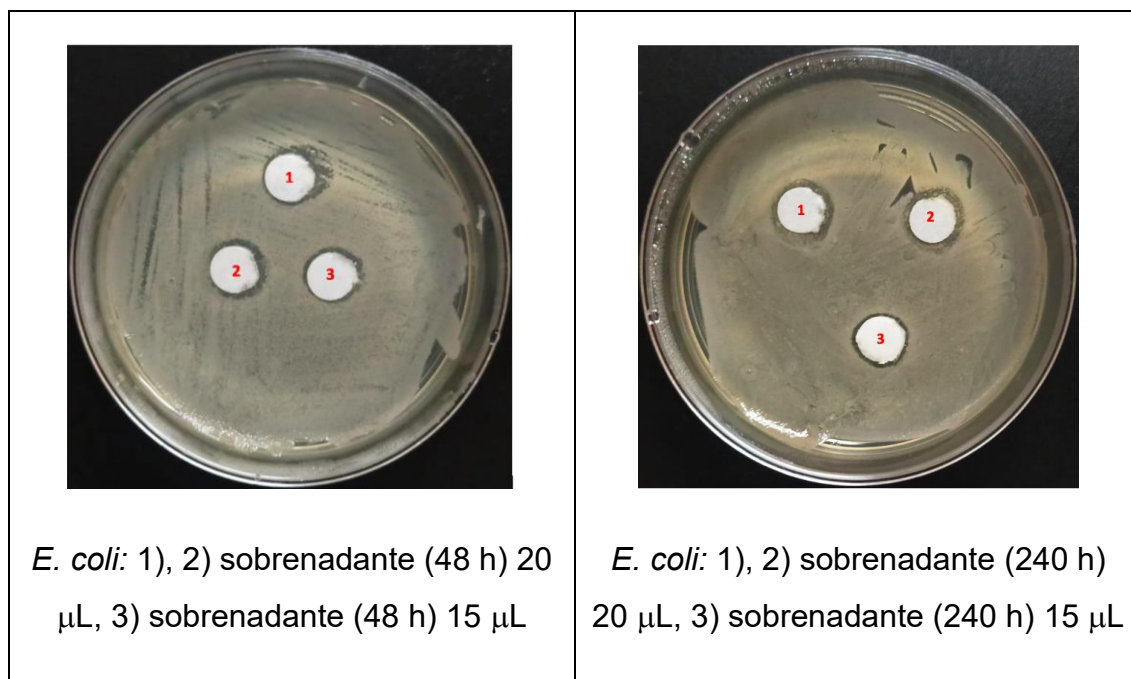


Fig. 14 Producción de halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* empleando sobrenadante de medio de cultivo de *B. subtilis* de 48 y 240 h.

Tabla 7. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* empleando sobrenadante de medio de cultivo de *B. subtilis*.

| <b><i>S. epidermidis</i> (área en mm<sup>2</sup>)</b> |        |        |       |        |        |        |        |          |      |
|-------------------------------------------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|----------|------|
| Tiempo                                                | Dato 1 | Dato 2 | Dato3 | Dato 4 | Dato 5 | Dato 6 | Dato 7 | Promedio | D.E. |
| 48                                                    | 47.43  | 49.38  | 43.89 | 38.46  | 47.54  | 46.42  | 47.31  | 45.78    | 3.62 |
| 96                                                    | 43.89  | 47.53  | 43.42 | 43.87  | 40.28  | 42.22  | 39.52  | 42.96    | 2.66 |
| 144                                                   | 43.85  | 43.42  | 33.36 | 37.93  | 37.87  | 35.67  | 43.87  | 39.42    | 4.30 |
| 192                                                   | 32.08  | 33.36  | 34.51 | 37.94  | 37.12  | 32.36  | 35.21  | 34.65    | 2.26 |
| 240                                                   | 35.65  | 31.74  | 31.12 | 34.14  | 33.38  | 33.86  | 31.89  | 33.11    | 1.61 |
| 288                                                   | 33.37  | 32.99  | 28.34 | 27.29  | 31.31  | 34.36  | 32.01  | 31.38    | 2.64 |
| 336                                                   | 25.60  | 33.40  | 28.43 | 33.36  | 31.32  | 29.25  | 25.62  | 29.57    | 3.29 |

D.E: Desviación estándar

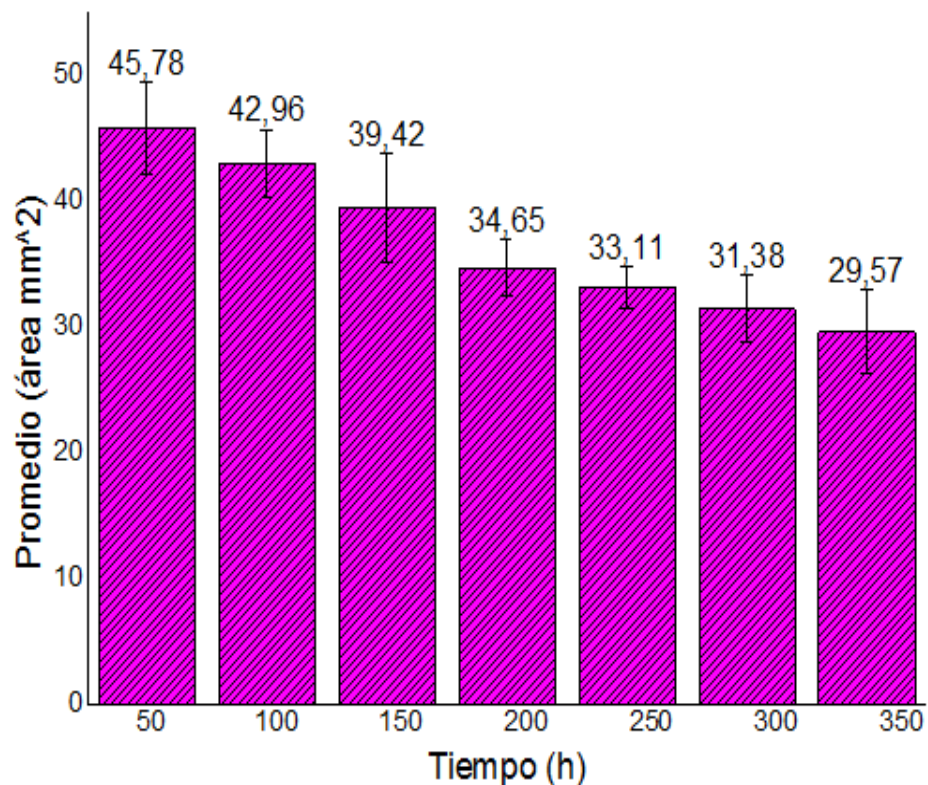


Fig. 15 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* empleando sobrenadante de medio de cultivo de *B. subtilis*.

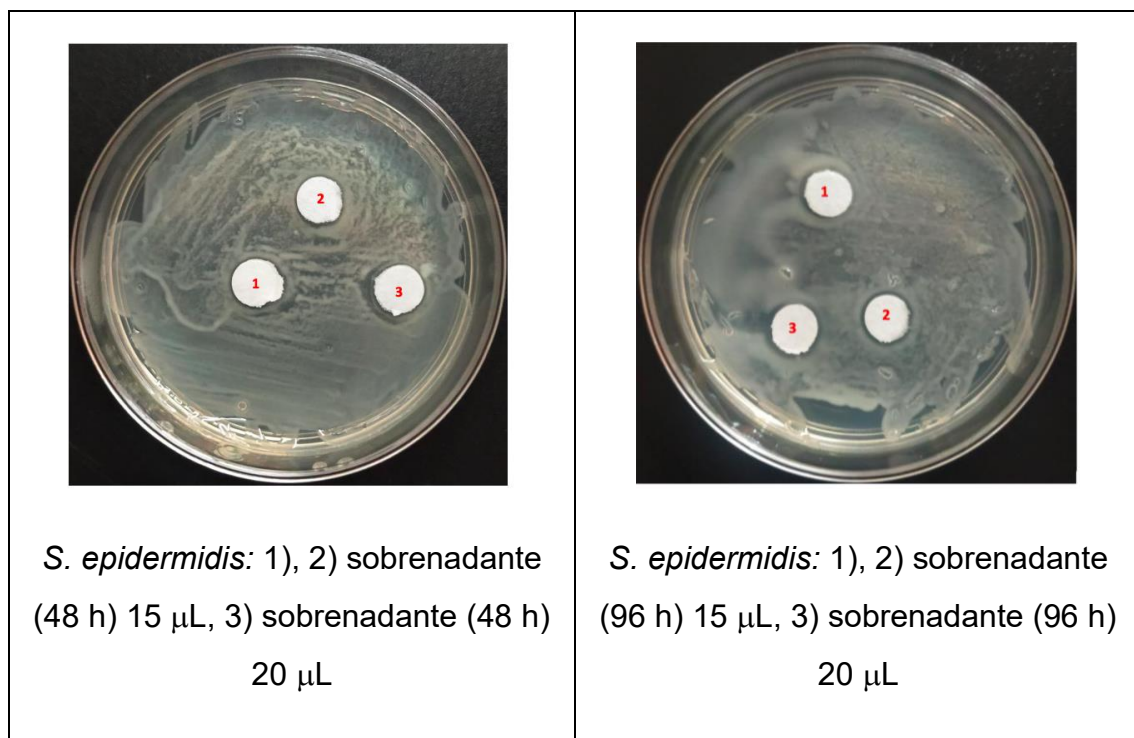


Fig. 16 Producción de halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* empleando sobrenadante de medio de cultivo de *B. subtilis* de 48 y 96 h.

## 4.2 Inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. epidermidis* con extracto obtenido con diclorometano

Después de aplicar extractos obtenidos mediante diclorometano de los sobrenadantes de crecimiento de *B. subtilis* a las 48 y 240 horas, no se observó la formación de halos de inhibición contra *E. coli* (Fig. 19). Esta falta de actividad antimicrobiana fue consistente en ambas condiciones de tiempo. De manera similar, cuando se utilizaron extractos procedentes del sobrenadante de *B. subtilis* a las 48 y 96 horas para probar su actividad contra *S. epidermidis*, no se observaron halos de inhibición que pudieran considerarse con actividad antimicrobiana (Fig. 19).

## 4.3 Inhibición del extracto obtenido con acetato de etilo en cepas de *E. coli* y *S. epidermidis*

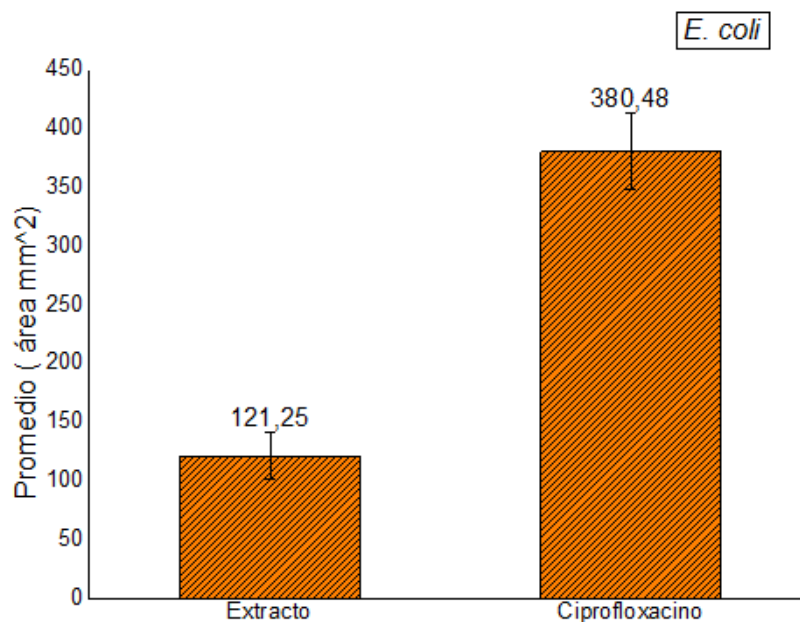
Tras aplicar los extractos obtenidos con acetato de etilo de los sobrenadantes a las 48 y 240 horas. En el caso de *E. coli*, se observó inhibición con el extracto del sobrenadante del cultivo a las 48 horas (Fig. 20), mientras que el extracto de las 240 horas no mostró actividad inhibitoria. El halo de inhibición promedio para el extracto de 48 horas fue de 121.25 mm<sup>2</sup>, en comparación con los 380.48 mm<sup>2</sup> del obtenido con el antibiótico ciprofloxacino (Tabla 8). De manera similar, el extracto del sobrenadante a las 48 horas también presentó inhibición contra *S. epidermidis* (Fig. 20), con un halo promedio de 78.76 mm<sup>2</sup>, mientras que el antibiótico sulfametoxazol y trimetoprima generó un halo de 213.43 mm<sup>2</sup> (Tabla 8). En contraste, el extracto obtenido del cultivo a las 96 horas no mostró ninguna actividad inhibitoria contra este patógeno.

Tabla 8. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* y *E. coli* con extracto obtenido por medio de acetato de etilo.

| (Área en mm <sup>2</sup> ) |                |        |        |        |        |        |          |       |
|----------------------------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|-------|
|                            |                | Dato 1 | Dato 2 | Dato 3 | Dato 4 | Dato 5 | Promedio | D.E.  |
| <i>E. coli</i>             | Extracto       | 127.29 | 102.31 | 107.31 | 94.93  | 126.34 | 121.25   | 20.27 |
|                            | Ciprofloxacino | 324.66 | 378.79 | 413.29 | 395.69 | 394.02 | 380.48   | 32.17 |
|                            |                | Dato 6 | Dato 7 |        |        |        |          |       |
|                            | Extracto       | 146.57 | 143.97 |        |        |        |          |       |

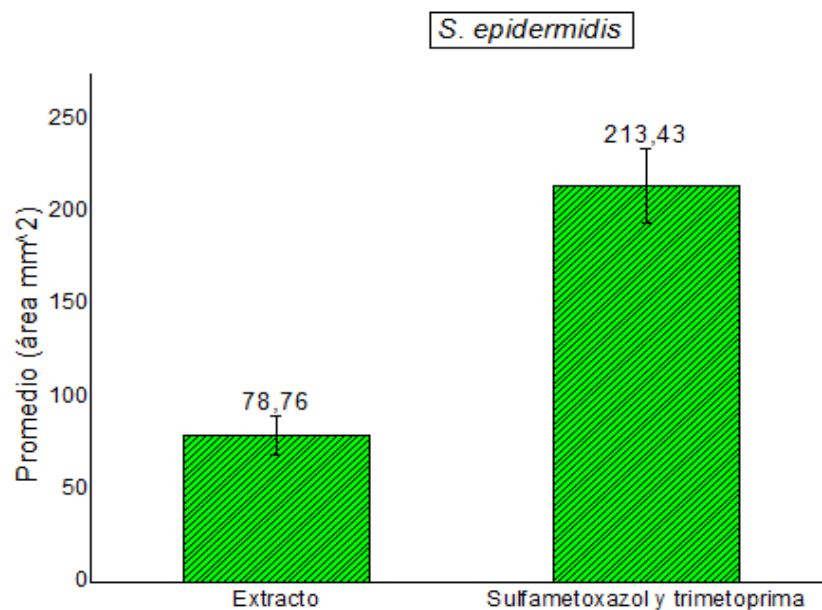
|                       |                                     |        |        |        |        |        |          |       |
|-----------------------|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|-------|
|                       | Ciprofloxacino                      | 350.24 | 406.64 |        |        |        |          |       |
|                       |                                     |        |        |        |        |        |          |       |
|                       |                                     | Dato 1 | Dato 2 | Dato 3 | Dato 4 | Dato 5 | Promedio | D.E.  |
| <i>S. epidermidis</i> | Extracto                            | 81.85  | 81.13  | 74.95  | 98.27  | 65.20  | 78.76    | 10.40 |
|                       | Sulfametoxazol<br>y<br>trimetoprima | 220.33 | 204.86 | 188.44 | 224.37 | 187.29 | 213.43   | 20.23 |
|                       |                                     | Dato 6 | Dato 7 |        |        |        |          |       |
|                       | Extracto                            | 71.38  | 78.52  |        |        |        |          |       |
|                       | Sulfametoxazol<br>y<br>trimetoprima | 230.56 | 238.18 |        |        |        |          |       |

D.E: Desviación estándar



Nota: \*p < 0.05

Fig. 17 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* empleando extracto obtenido por medio de acetato de etilo en comparación con el obtenido con el antibiótico ciprofloxacino.



Nota: \*p < 0.05

Fig. 18 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* empleando extracto obtenido por medio de acetato de etilo en comparación con el obtenido con el antibiótico sulfametoxazol y trimetoprima.

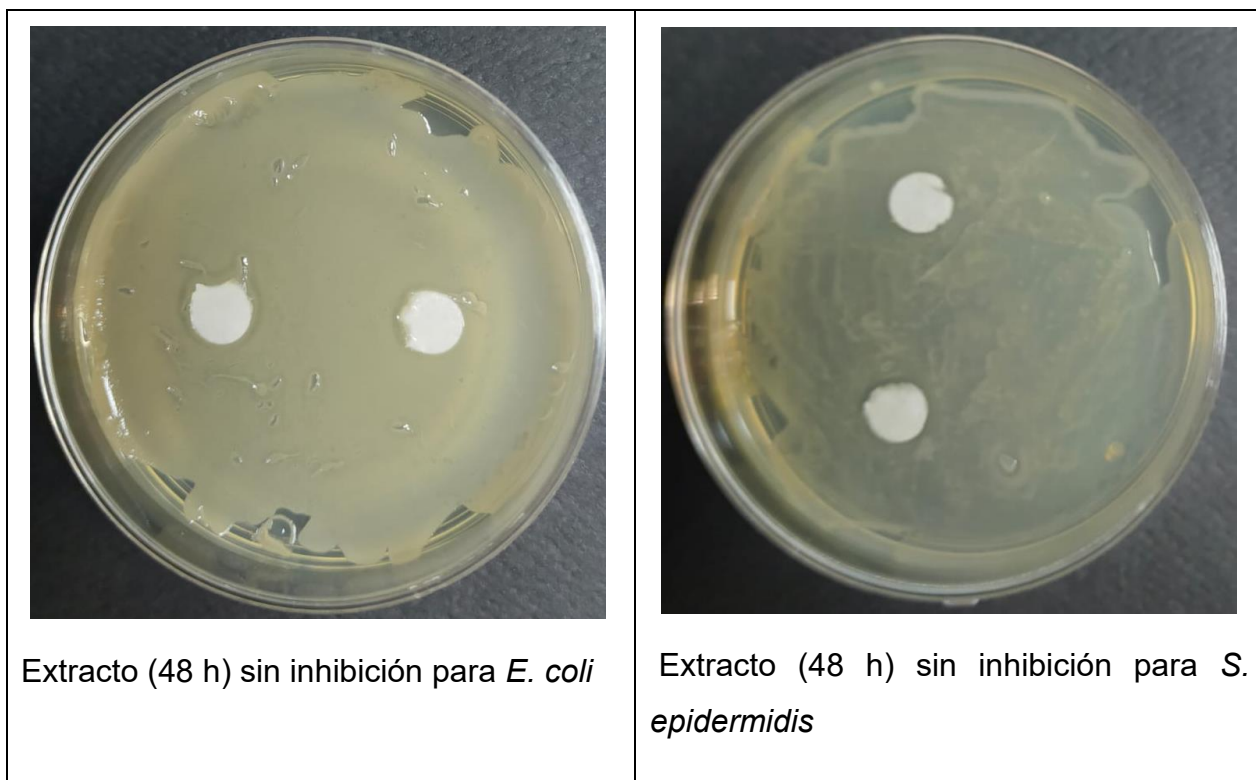


Fig. 19 Prueba de inhibición del extracto del sobrenadante del medio de cultivo obtenido con diclorometano.

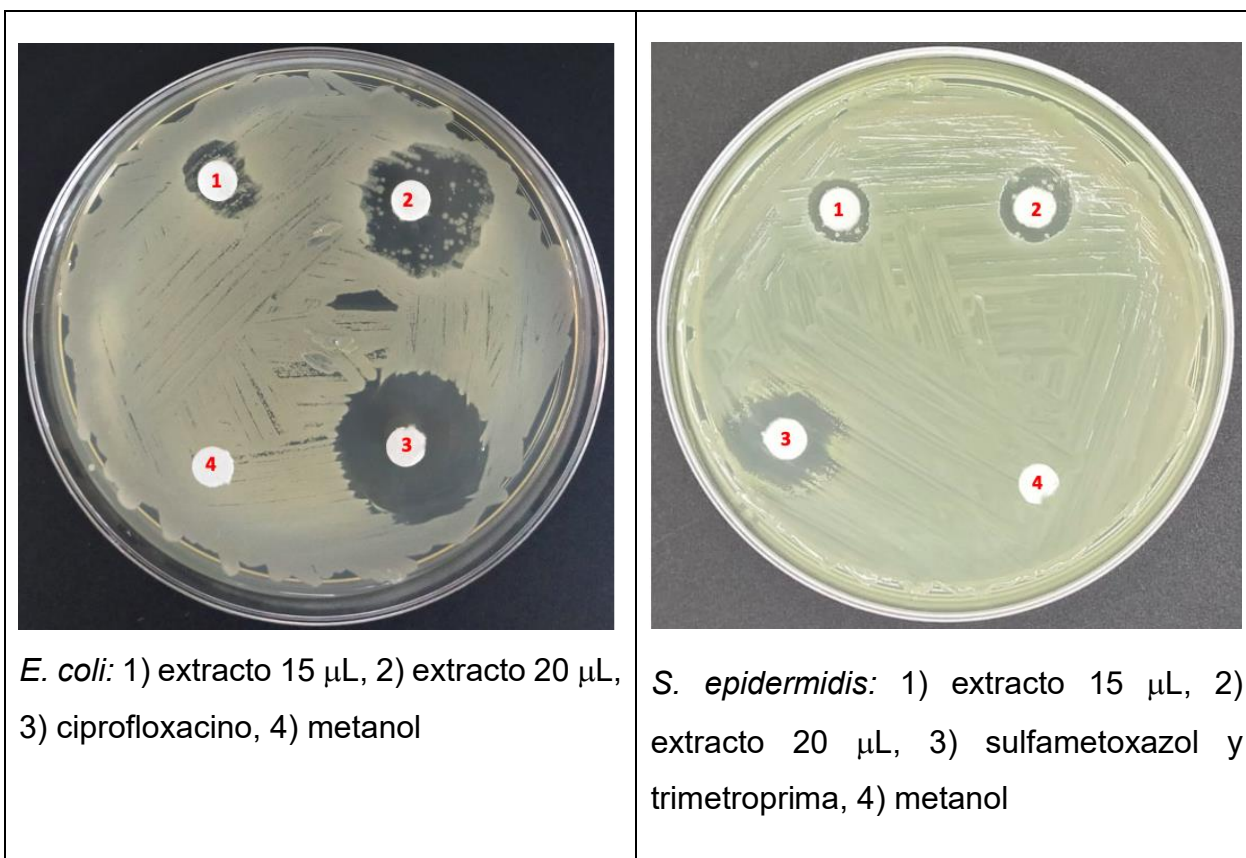


Fig. 20 Producción de halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* y *S. epidermidis* empleando extracto obtenido con acetato de etilo.

#### 4.4 Inhibición del crecimiento de *E. coli* y *S. epidermidis* con extracto obtenido con acetato de etilo y eluído con acetonitrilo

Después de aplicar los extractos eluídos del cultivo de 48 horas, se observó actividad contra *E. coli* (Fig. 21) empleando la fracción obtenida con concentración de acetonitrilo/agua (80:20) <10 kDa. El halo promedio obtenido con el extracto fue de 282.92 mm<sup>2</sup>, mientras que el producido por el antibiótico (ciprofloxacino) fue de 396.27 mm<sup>2</sup> (Tabla 9). De forma similar, al aplicar el extracto eluído para probar actividad contra *S. epidermidis* (Fig. 21), se obtuvo un halo promedio de 86.53 mm<sup>2</sup>, frente a 264.11 mm<sup>2</sup> del halo obtenido con el antibiótico sulfametoxazol y trimetoprima (Tabla 9).

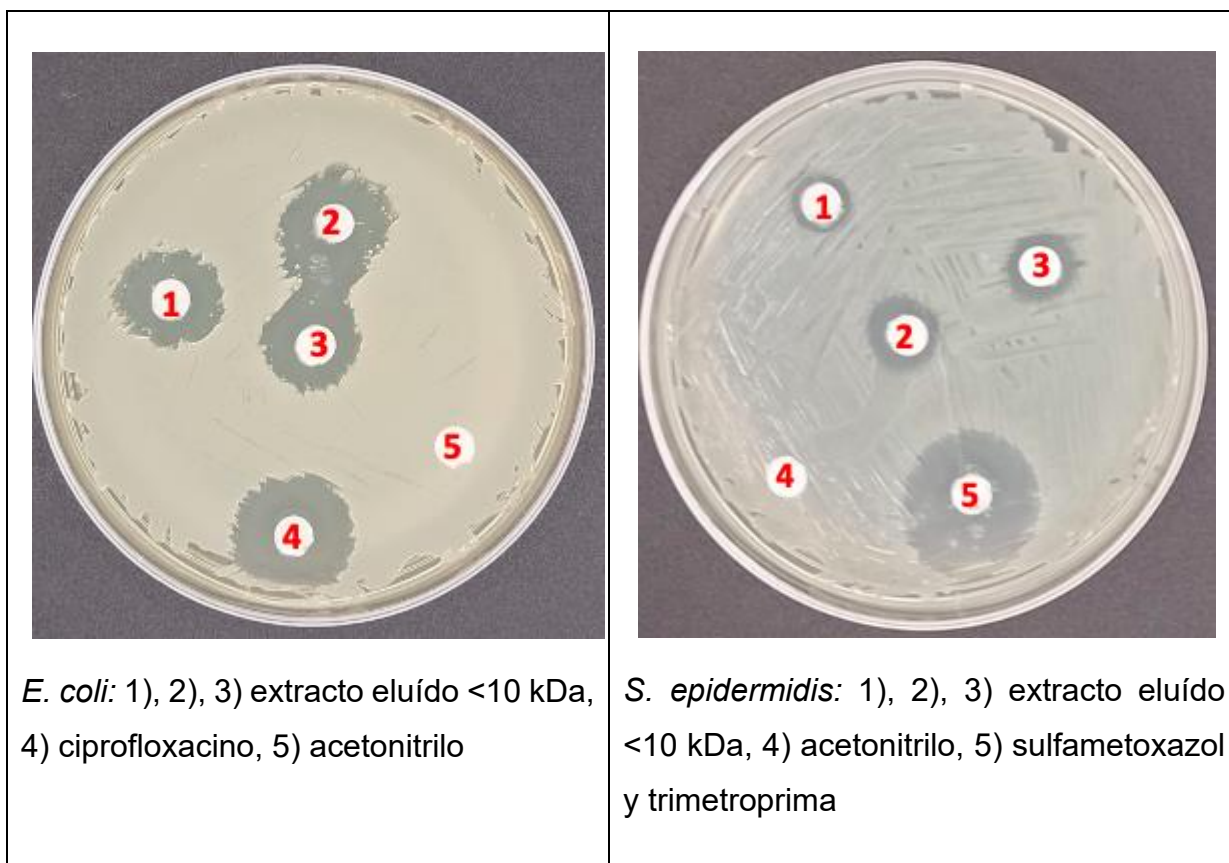


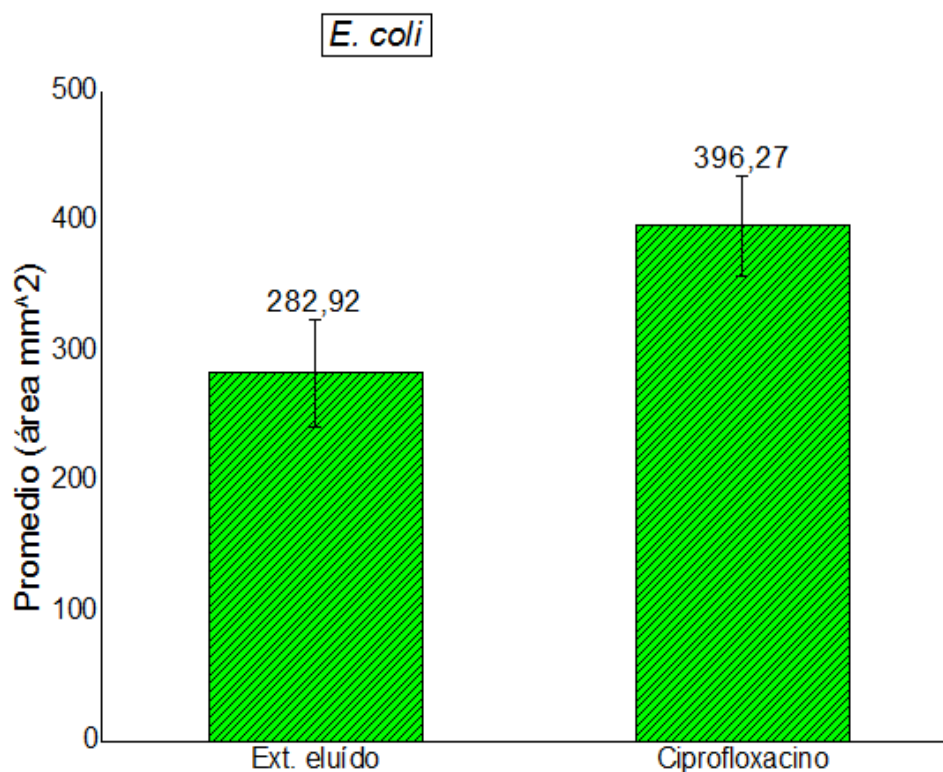
Fig. 21 Producción de halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* y *S. epidermidis* empleando extracto obtenido con acetato de etilo y eluído con acetonitrilo.

Tabla 9. Tamaño de halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* y *E. coli* con extracto obtenido por medio de acetato de etilo y eluído con acetonitrilo en comparacion con el antibiótico.

| (Área en mm <sup>2</sup> ) |                  |        |        |        |        |        |          |       |
|----------------------------|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|-------|
|                            |                  | Dato 1 | Dato 2 | Dato 3 | Dato 4 | Dato 5 | Promedio | D.E.  |
| <i>E. coli</i>             | Extracto eluído  | 210.34 | 263.63 | 314.55 | 273.25 | 283.86 | 282.92   | 41.41 |
|                            | Ciprofloxacino   | 354.53 | 374.51 | 466.12 | 370.70 | 406.63 | 396.27   | 38.41 |
|                            |                  | Dato 6 | Dato 7 |        |        |        |          |       |
|                            | Extracto eluído  | 341.67 | 293.14 |        |        |        |          |       |
|                            | Ciprofloxacino   | 422.58 | 378.79 |        |        |        |          |       |
|                            |                  |        |        |        |        |        |          |       |
| <i>S. epidermidis</i>      |                  | Dato 1 | Dato 2 | Dato 3 | Dato 4 | Dato 5 | Promedio | D.E.  |
|                            | Extracto eluído  | 81.85  | 76.14  | 75.18  | 103.41 | 100.17 | 86.53    | 15.70 |
|                            | Sulfametoxazol y | 228.42 | 338.82 | 236.51 | 266.97 | 230.98 | 264.11   | 47.83 |

|  |                                      |        |        |  |  |  |  |
|--|--------------------------------------|--------|--------|--|--|--|--|
|  | trimetroprima                        |        |        |  |  |  |  |
|  |                                      | Dato 6 | Dato 7 |  |  |  |  |
|  | Extracto eluído                      | 65.23  | 103.74 |  |  |  |  |
|  | Sulfametoxazol<br>y<br>trimetroprima | 224.40 | 322.64 |  |  |  |  |

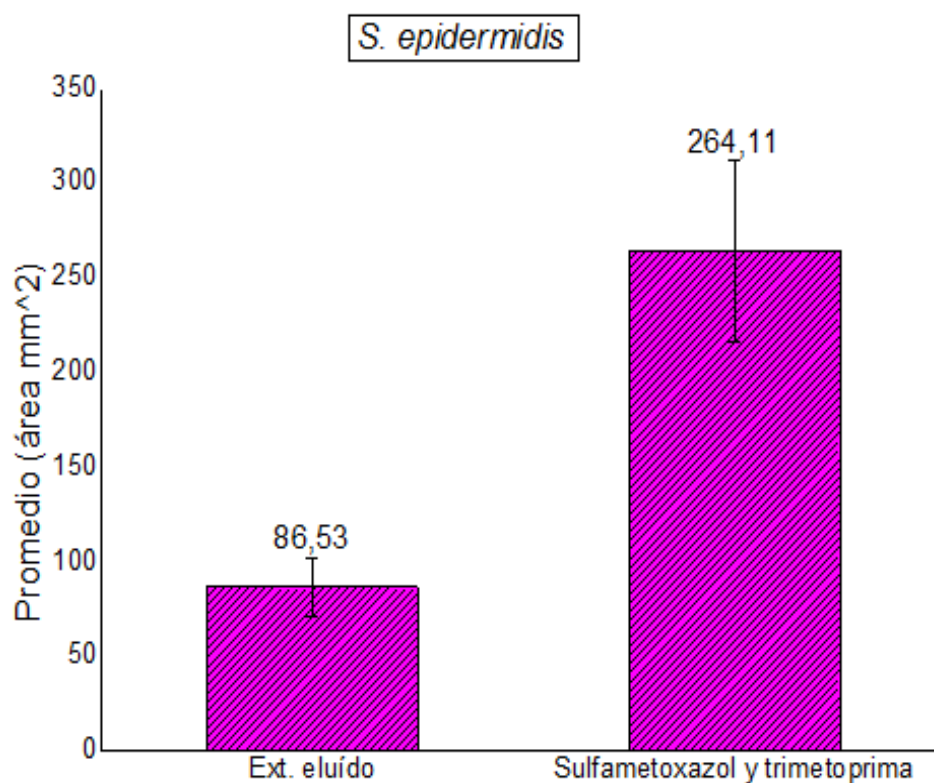
D.E: Desviación estándar



Nota: \*p < 0.05

Fig. 22 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* empleando extracto eluído con acetonitrilo en comparación con antibiótico ciprofloxacino.

De acuerdo al análisis realizado, se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en los halos de inhibición entre el extracto eluído y el antibiótico ciprofloxacino contra el crecimiento de *E. coli*.

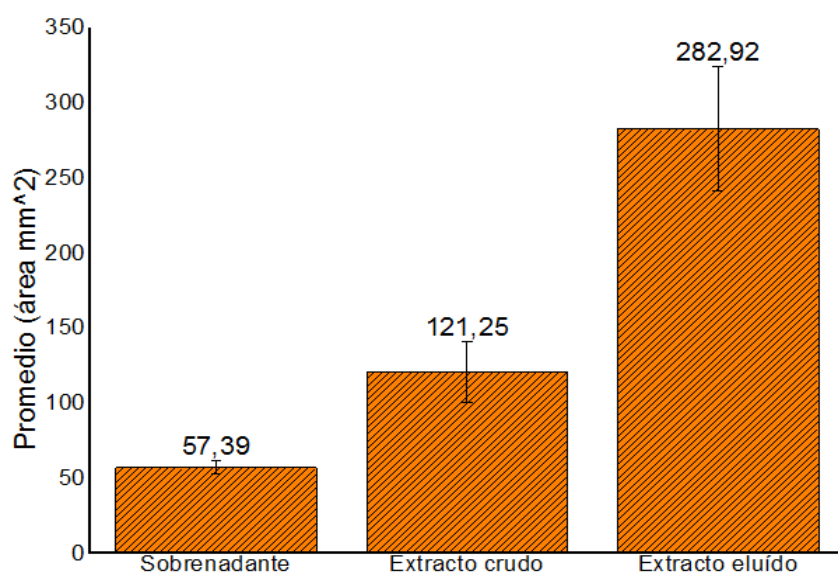


Nota: \* $p < 0.05$

Fig. 23 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* empleando extracto eluído con acetonitrilo en comparación con antibiótico ciprofloxacino sulfametoxazol y trimetoprima.

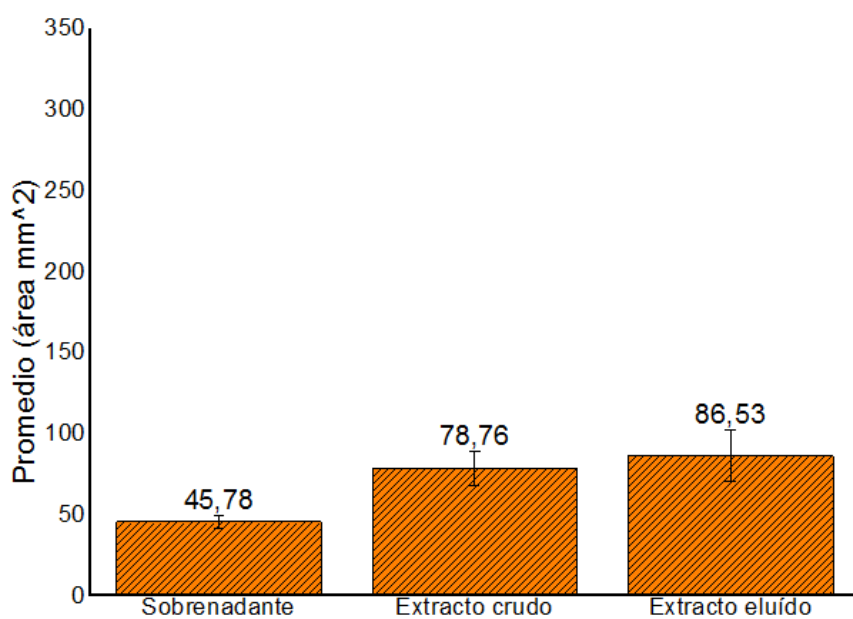
Los resultados para *S. epidermidis* nos muestra que significativamente ( $p < 0.05$ ) el halo de inhibición promedio del antibiótico sulfametoxazol y trimetoprima es mayor que el del extracto eluído con acetonitrilo.

El sobrenadante de la cepa antagonista presentó actividad antimicrobiana, el extracto sin eluir (extracto crudo) presentó una actividad más elevada que el sobrenadante. El extracto eluído  $<10$  kDa fue el que dió mejor resultado al inhibir el crecimiento de los patógenos evaluados (Fig. 24 y 25).



Nota: \*p < 0.05

Fig. 24 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *E. coli* empleando sobrenadante, extracto crudo obtenido con acetato de etilo y extracto eluido



Nota: \*p < 0.05

Fig. 25 Promedio y desviación estándar de los halos de inhibición en el crecimiento de *S. epidermidis* empleando sobrenadante, extracto crudo obtenido con acetato de etilo y extracto eluido con acetonitrilo.

#### 4.5 Cuantificación de proteínas

Se determinó que la concentración total de proteína en el extracto eluido con acetonitrilo/agua (80:20) fue de 546  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la fracción extracto eluido  $<10$  kDa presentó una concentración de 126  $\mu\text{g/ml}$ . Estos resultados reflejan la composición proteica de las muestras, destacando una mayor concentración de proteínas en el extracto total en comparación con la fracción de bajo peso molecular.

#### 4.6 Cromatografía de capa fina de extractos sin elución

Al visualizar las placas bajo luz UV a 365 nm y 254 nm, se identificaron de 6 a 7 componentes distintos en el extracto, los cuales mostraron diferentes intensidades de fluorescencia a 365 nm (Fig. 26). Estos resultados proporcionaron una base para realizar la elución del extracto y posteriormente someterlo a cromatografía líquida de alta resolución para un análisis más detallado y preciso de los componentes presentes.

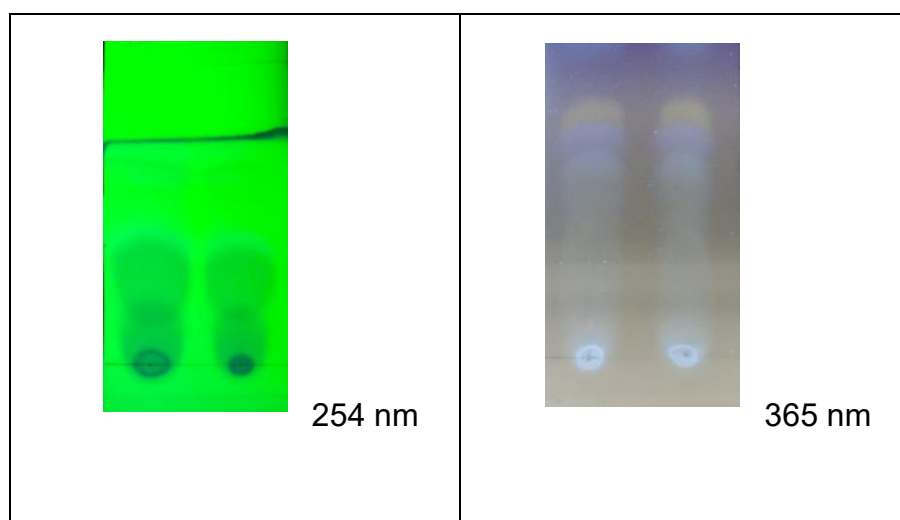


Fig. 26 TLC realizada a extractos obtenidos con acetato de etilo.

#### 4.7 Cromatografía líquida de alta resolución de extractos obtenidos con acetato de etilo eluidos con acetonitrilo

El análisis cromatográfico muestra dos picos principales en el intervalo de tiempo de retención de 1 a 2 minutos (Fig. 27). Estos picos corresponden a los compuestos o sustancias en la muestra analizada.

La presencia de dos picos principales sugiere que la muestra contiene al menos dos compuestos diferentes que fueron separados eficazmente durante el proceso de cromatografía. La resolución entre los picos es también un factor importante para asegurar que los compuestos están correctamente separados. En este caso, se observó una separación clara en los dos picos principales.

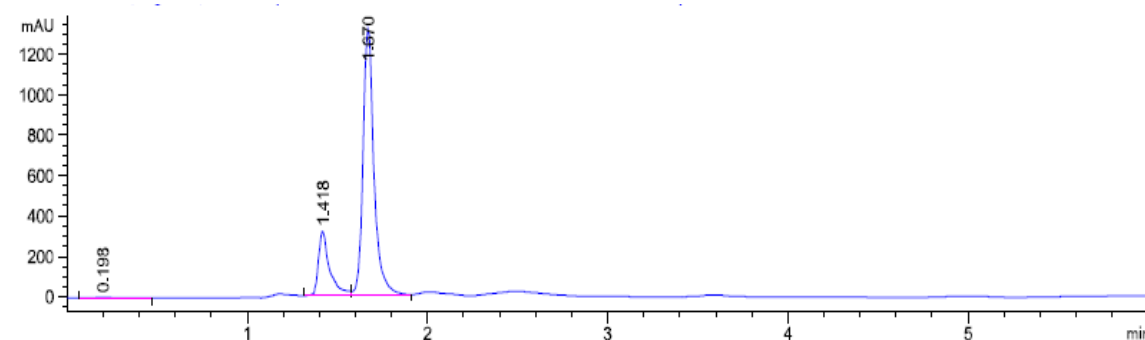


Fig. 27 Cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de extractos obtenidos con acetato de etilo eluidos con acetonitrilo. Los picos corresponden a dos compuestos presentes en la muestra, separados según sus tiempos de retención.

## Capítulo V

### DISCUSIÓN

La cepa antagonista empleada para inhibir el crecimiento de los patógenos *E. coli* y *S. epidermidis* se aisló en un medio de cultivo con nutrientes esenciales como proteínas, vitaminas y carbohidratos para promover el crecimiento bacteriano [35]. Tales características pudieron influir en su crecimiento y producción de metabolitos con actividad antimicrobiana para inhibir los patógenos. En nuestro estudio, utilizamos el medio Luria Bertani, que de acuerdo con el trabajo de Linares [24], es considerado un medio rico en nutrientes, ampliamente utilizado para el crecimiento general de bacterias.

*B. subtilis* es sin lugar a dudas un microorganismo con gran capacidad para producir metabolitos secundarios [16,18, 19, 34, 45, 46, 48, 60], los resultados de su actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. epidermidis* obtenidos en el

presente trabajo confirma que *B. subtilis* tiene un gran potencial como fuente de agentes antimicrobianos para combatir infecciones bacterianas. En el presente estudio, la actividad antimicrobiana contra los patógenos oportunistas se observó en los extractos orgánicos de polaridad media y la fracción proteica obtenida, lo que sugiere la producción de metabolitos secundarios, posiblemente de origen proteico. Esto es consistente con estudios previos que han demostrado que *B. subtilis* es capaz de sintetizar una amplia variedad de compuestos bioactivos, como péptidos antimicrobianos. Existen reportes de péptidos antimicrobianos producidos de *B. subtilis* que tienen un mecanismo de acción directo sobre las membranas celulares de las bacterias patógenas, alterando su integridad y afectando la función celular, como la reportada por Sharma et al. [48], quienes estudiaron la actividad antimicrobiana de una cepa de *B. subtilis* aislada del suelo de una granja de animales, contra *E. coli* y *S. epidermidis*, esta cepa mostró la producción de una bacteriocina con un peso molecular cercano a 6.5 kDa, empleando un ensayo en gel *in situ* revelaron una zona de inhibición que coincidía con el tamaño estimado de la banda proteica.

Otro tipo de metabolito secundario de *B. subtilis* se reportó en el trabajo de Nazari et al. [34], en donde, se mostró la capacidad de *B. subtilis* para producir surfactina, al igual que en el estudio de Sabaté y Audisio [46], que evidenció que *B. subtilis* (aislada del intestino de abejas) produce surfactina, un compuesto proteico con actividad antimicrobiana contra siete cepas diferentes de *Listeria monocytogenes*, al realizar las pruebas de antagonismo, mostrando halos de inhibición por la actividad de la surfactina sintetizada por *B. subtilis*.

El análisis cromatográfico por HPLC realizado en este estudio reveló la presencia de dos picos principales entre 1 y 2 minutos en el intervalo de retención, con intensidades de 1.445 y 1.599 mAU. Estos picos, que corresponden a compuestos producidos por *B. subtilis*, podrían representar la presencia de dos metabolitos secundarios, posiblemente diferentes a los reportados anteriormente en la literatura. En estudios previos, de Meena et al. [26], que reportan picos de 1.270 mAU y 1.088 mAU para surfactinas, Xiang et al. [61], que reportan picos de entre 800 y 1.200 mAU con un tiempo de retención entre 4 y 6 minutos para bacteriocinas.

La investigación realizada en este estudio presenta una contribución novedosa al aislamiento de *B. subtilis* del intestino de abejas de la zona de Tepetitla, Tlaxcala, lo que no solo amplía el conocimiento sobre la microbiota de estos insectos, sino que también ofrece nuevas perspectivas sobre el potencial antimicrobiano de este microorganismo. Si bien se sabe que *B. subtilis* produce compuestos bioactivos como surfactinas y bacteriocinas [46], la mayoría de los estudios se han centrado en cepas de *B. subtilis* aisladas de ambientes más comunes, como el suelo [48], otras cepas aisladas del maíz [6] y algunas más aisladas de la miel [62]. Este estudio es uno de los pocos que demuestra la capacidad de *B. subtilis* aislado del intestino de abejas para producir compuestos antimicrobianos contra *E. coli* y *S. epidermidis*.

## **Capítulo VI**

### **CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO**

#### **CONCLUSIONES**

La cepa *B. subtilis* seleccionada en este estudio mostró un gran potencial como productor de metabolitos antimicrobianos, ya que presentó actividad inhibidora contra *E. coli* y *S. epidermidis*.

Fue posible la obtención de extractos proteicos a partir de los sobrenadantes del cultivo del antagonista. El extracto crudo (sin eluir) y el extracto eluído menor a 10kDa con concentraciones de 30 mg/ml mostraron una alta actividad antimicrobiana contra los patógenos oportunistas.

Se obtuvieron 30 mg de extracto seco por cada 50 ml de sobrenadante del cultivo antagonista al realizar extracciones líquido – líquido, siendo acetato de etilo el solvente adecuado para la extracción de la fase orgánica. Estos extractos crudos presentaron conjuntos de 3 a 7 componentes a 365 nm al ser evaluados por TLC.

#### **TRABAJO A FUTURO**

La continuación de este estudio exige un esfuerzo de investigación orientado a encontrar aplicaciones relevantes en el ámbito biomédico, como el desarrollo de un nuevo antibiótico. Esto implica la purificación e identificación de los

compuestos bioactivos producidos por *B. subtilis* aislado del intestino de abejas. Para ello, se deben analizar los extractos eluidos y dializados mediante técnicas avanzadas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Paralelamente, será necesario desarrollar sistemas de formulación y métodos de preservación para estos compuestos, además de determinar sus concentraciones mínimas inhibitorias, con el objetivo de estandarizar las pruebas y validar su eficacia antimicrobiana frente a *E. coli*, *S. epidermidis* y/u otros patógenos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aguado, B. R. (2013). Química inorgánica: operaciones básicas de laboratorio. Universidad de Burgos.
- [2] Akinsemolu, A. A., Onyeaka, H., Odion, S. & Adebajo, I. (2024). Exploring *Bacillus subtilis*: Ecology, biotechnological applications, and future prospects. *Journal of Basic Microbiolog.*
- [3] Asadi, A., Abdolmaleki A., Azizi, S. S. & Gurushankar, K. (2021). Molecular Dynamics Study of Surfactin Interaction with Lipid Bilayer Membranes. *Gene Cell Tissue*, 8(2)
- [4] Basurto, C. M.G., Vázquez A. M., García, J.J., Salcedo, H. R., Bideshi, D.K. & Barboza, C. J.E. (2012). Isolation of a new Mexican strain of *Bacillus subtilis* with antifungal and antibacterial activities. *The Scientific World Journal*, 1-7.
- [5] Bills, G. F. & Gloer, J.B. (2016). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiology Spectrum*, 4(6).
- [6] Bolivar, A. H. J., González, R. V.E., Cantoral, J.M., García S. D., Collado, I.G. & Garrido, C. (2021). Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from *Zea mays*, as Potential Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 10(6), 492.

- [7] Castellano, R. J., Galvis, L. A., Pérez, P. R., Grande, M.J., Lucas, R. & Gálvez, A. (2022). Las bacteriocinas y su efecto sinérgico con tecnologías emergentes en alimentos. *Mutis*, 10(2).
- [8] Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C. & Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Front Microbiol*, (10), 302.
- [9] Cisterna, C. R. (2007). Microbiología. *Más Dermatología*, (1), 25-27.
- [10] Coll, C. F. J. (2017). Enfermedades producidas por *Escherichia coli*. *Libros de Cátedra*.
- [11] Espinoza, g. J. D. C. (2017). Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Escherichia Coli* enterotoxigénica (ETEC) y enteropatógena (EPEC) en muestras fecales de niños menores de tres años en centros de salud de Tegucigalpa y Comayagüela.
- [12] Fernández-Calvet, A., López-López, N., & Garmendia, J. Parecidos razonables entre patógenos bacterianos oportunistas: el curioso caso de *Haemophilus influenzae* y *Helicobacter pylori*.
- [13] García, H. J. E., Rodriguez, D. J. A., Frizzo, L. S., Fernandez, L. K. J., Solenzal, V. Y., Soto, L. P. & Viciado, G. D. (2020). Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas del tracto digestivo de abejas adultas *Apis mellifera*.
- [14] Gary, D. C., Dasgupta, P. K. & Schug, A. K. (2014). Química Analítica. WILEY.
- [15] González, G. J. L. (2022). Presencia del biofilm y su asociación con la resistencia de antibióticos de cepas de aislados clínicos de *Escherichia coli* de pacientes con infecciones de vías urinarias.
- [16] González, L. Y., Ortega B. J., Anducho, R. M. A. & Mercado, F. Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25, 1-14.

- [17] Hernández, M. D. A. (2015). Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de plantas con actividad antimicrobiana contra microorganismos farmacorresistentes del grupo ESKAPE (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- [18] Iqbal, S., Begum, F., Rabaan, A. A., Aljeldah, M., Al Shammari, B. R., Alawfi, A. & Khan, A. (2023). Classification and multifaceted potential of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* group: a comprehensive review. *Molecules*, 28(3), 927.
- [19] Kaspar, F., Neubauer, P. & Gimpel, M. (2019). Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products*, 82 (7), 2038-2053.
- [20] Knittelfelder, O. L. & Kohlwein, S. D. (2017). Thin-layer chromatography to separate phospholipids and neutral lipids from yeast. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(5).
- [21] Kuzhupillymyal, P. L., Martínez, M. A. & Cruz, L. F. (2023). Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. UANL.
- [22] Lanças, F. M. (2009). A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, 1(2), 35-61.
- [23] Lee, E., & Anjum, F. (2023). *Staphylococcus epidermidis* infection. In StatPearls. *StatPearls Publishing*.
- [24] Linares, O. M. V. (2024). Mecanismos de estímulo para la producción de antibióticos en Bacteroidetes.
- [25] Medina, G. A. A., Yumiseba, M. E. A., Monar, L. F. T., & Haro, T. M. B. (2020). Infección urinaria por *Escherichia coli* multirresistente. *Recimundo*, 4(1), 99-107.
- [26] Meena, K. R., Sharma, A., Kumar, R., & Kanwar, S. S. (2020). Two factors at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis* KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. *Journal of King Saud University Science*, 32(1), 337-348.

- [27] Méndez, A. M., Penieres, C. J. G., & Ortega, J. F. (2023). Cromatografía en Capa fina y Columna.
- [28] Méndez, A. M., Penieres, C. J. G., & Ortega, J. F. (2023). Extracción líquido – líquido. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
- [29] Méndez, U. J., Flores H. M. & Páramo, A. L.(2018). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2) ,96–110.
- [30] Miranda, I., Velásquez, A. & Casas, J. (2023). Técnicas básicas de separación y purificación en química orgánica. Sociedad de Doctores e Investigadores de Colombia.
- [31] Mohiuddin, A. K. (2019). Chemistry of secondary metabolites. *Ann Clin Toxicol*, 2 (1), 1014.
- [32] Morales, C. F., Gracia, R. D. C. R., Villa, E. B., Zarain, P. L., & Cortés, G. C. (2022). Staphylococcus aureus y Escherichia coli: dos Bacterias Multidrogorresistentes que Podemos Compartir con Nuestras Mascotas. *INVURNUS*, 17(1).
- [33] Morse, A. S., Carroll, C.K., Miller, S. & Mietzner, A.T. (2016). Microbiología médica. Lange.
- [34] Nazari, F., Safaie, N., Soltani, B. M., Shams-Bakhsh, M., & Sharifi, M. (2017). The effect of environmental factors on surfactin production of Bacillus subtilis. *Journal of Crop Protection*, 6(1), 89-97.
- [35] Oliveira, F. S., da Silva, R. R., Cavicchioli, V. Q., de Carvalho, A.F., & Nero, L. A. (2024). Influence of different culture media on the antimicrobial activity of *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC against *Listeria monocytogenes*. *Braz J Microbiol*, 55(3), 2539-2545.
- [36] Olmos, J. & Paniagua, M. J. (2014). *Bacillus subtilis* A Potential Probiotic Bacterium to Formulate Functional Feeds for Aquaculture. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 6: 361-365.

- [37] Ortiz, J. B. M., Mendoza, N. M. A., Ponce, M. M. P. & Macas, D. A. M. (2024). Patógenos oportunistas asociados a cuadros respiratorios severos en pacientes con comorbilidades. *Revista Investigación y Educación en Salud*, 3(1), 92-103.
- [38] Poirel, L., Yves, M. J., Lupo, A., Schink, A.K., Kieffer, P.N. & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6 (4).
- [39] Put, H., Gerstmans, H., Capelle, H. V., Fauvart, M., Michiels, J., & Masschelein, J. (2024). *Bacillus subtilis* as a host for natural product discovery and engineering of biosynthetic gene clusters. *Natural Product Reports*.
- [40] Quiroga, P. (2013). Análisis farmacéutico. Universidad Nacional de La Plata.
- [41] Rawish, F. & Aziz, M. (2019). Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* (EHEC). *StatPearls. Treasure Island (FL)*.
- [42] Ríos, M. D., Cerna, C. J. F., Morán, G. N., Meza, S. M. & Estrada, G. T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos murinos. *Gaceta médica de México*, 155(4), 410-416.
- [43] Romero, R. L. E & Rodríguez, E. B. E. (2014). Química experimental: Manual de laboratorio. Pearson.
- [44] Ruiz, D. R. F., Enríquez, M. Q., & Pérez, O. L. C. (2021). Los antibióticos y su impacto en la sociedad. *MediSur*, 19(3), 477-49
- [45] Rukmini, M., Sahoo, D., Dalei, J., & Ray, R. (2015). Production, purification and characterization of bacitracin from *Bacillus subtilis*. *The Pharma Innovation*, 3(12, Part B), 77.
- [46] Sabaté, D.C. & Audisio, M.C. (2013). Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiol Res*, 168(3), 125-9.

- [47] Seas, R. C., García, A. C. & Pardo, V. J. (2003). Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* y absceso de partes blandas en un paciente post-operado: Reporte de un caso. *Revista Médica Herediana*, 14(4), 221 – 223.
- [48] Sharma, G., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2018). Antibacterial activity, cytotoxicity, and the mechanism of action of bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. *Medical Principles and Practice*, 27(2), 186-192.
- [49] Sharrar, A. M., Crits-Christoph, A., Méheust, R., Diamond, S., Starr, E. P. & Banfield, J. F. (2020). Bacterial secondary metabolite biosynthetic potential in soil varies with phylum, depth, and vegetation type. *MBio*, 11(3), 10-1128.
- [50] Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas.
- [51] Tiwari, R. & Rana, C. S. (2015). Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- [52] Todorova, S. & Kozhuharova, L. (2010). Characteristics, and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1207-1216.
- [53] Torres, P. M. E., Pérez, G. F. J., Triana, M. J. & López, S. M. (2005). Métodos Físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- [54] Valencia, V. M. A., Sierra, Z. L. & Villegas, E. V. (2019). Bioprospección de bacterias con actividad antibacteriana para el manejo de *R. solanacearum* a nivel de microcosmos (Doctoral dissertation, Universidad EAFIT).
- [55] Vázquez-Rojas, A., & Miliar-De Jesús, R. (2020). Enfermedades. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 33(133), 1713.

- [56] Velez, M. V., Colello, R., Etcheverría, A. I., & Padola, N. L. (2023). *Escherichia coli* productora de toxina Shiga: el desafío de adherirse para sobrevivir. *Revista argentina de microbiología*, 55(1), 100-107.
- [57] Vega, M. F., Libonatti, C., Ramos, O. Y., & Basualdo, M. (2024). Caracterización de una comunidad microbiana aislada de colonias de abejas melíferas. *Revista Argentina de Microbiología*.
- [58] Vidushi, Y., Meenakshi, B. & Bharkatiya, M. (2017). A review on HPLC method development and validation. *Res J Life Sci, Bioinform, Pharm Chem Sci*, 2(6), 178.
- [59] Villarreal, D. M. F., Villa, R. E. D., Cira, C. L. A., Estrada, A. M. I., Parra, C. F. I. & Santos, V. S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130.
- [60] Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J. & Yang, L. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23(4), 744–754.
- [61] Xiang, Y. Z., Li, X. Y., Zheng, H. L., Chen, J. Y., Lin, L. B., & Zhang, Q. L. (2021). Purification and antibacterial properties of a novel bacteriocin against *Escherichia coli* from *Bacillus subtilis* isolated from blueberry ferments, 146.
- [62] Zulkhairi, A. F. A., Sabri, S., Ismail, M., Chan, K. W., Ismail, N., Mohd, E. N., & Zawawi, N. (2020). Probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey collected across Malaysia. *International journal of environmental research and public health*, 17(1), 278.

## ANEXO 1

Cálculos estadísticos para la prueba t.

### *E. coli*

Hipótesis nula

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$H_0$ : el halo de inhibición producido por el extracto eluído es igual al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

Hipotesis alternativa

$$H_a: \mu \neq \mu_0$$

$H_a$ : el halo de inhibición producido por el extracto eluído es diferente al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

Para calcular y dar una conclusión se utilizó PHYTON.

```
import scipy.stats as stats

# Datos
extracto = [210.34, 263.63, 314.55, 283.86, 273.25, 341.67, 293.14]
ciprofloxacino = [354.53, 374.51, 466.12, 422.58, 378.79, 370.70, 406.63]

# Prueba t para dos muestras independientes (Welch, no asume varianzas iguales)
t_stat, p_value = stats.ttest_ind(extracto, ciprofloxacino, equal_var=False)

# Resultados
print(f"Estadístico t: {t_stat:.4f}")
print(f"Valor p: {p_value:.4f}")

# Decisión
alpha = 0.05
if p_value < alpha:
    print("Se rechaza la hipótesis nula: hay diferencia significativa entre los grupos.")
else:
    print("No se rechaza la hipótesis nula: no hay diferencia significativa entre los grupos.")
```

```
Estadístico t: -5.3089
Valor p: 0.0002
Se rechaza la hipótesis nula: hay diferencia significativa entre los grupos.
```

```
In [2]:
```

## ***S. epidermidis***

Hipótesis nula

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$H_0$ : el halo de inhibición producido por el extracto eluído es igual al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

Hipotesis alternativa

$$H_a: \mu \neq \mu_0$$

$H_a$ : el halo de inhibición producido por el extracto eluído es diferente al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

```
import scipy.stats as stats

# Datos de los grupos
extracto = [81.85, 76.14, 75.18, 103.41, 100.17, 65.23, 103.74]
sulfametoxazol_trim = [228.42, 338.82, 236.51, 266.97, 224.40, 322.64, 230.98]

# Prueba t de Student para muestras independientes con varianzas desiguales
t_stat, p_value = stats.ttest_ind(extracto, sulfametoxazol_trim, equal_var=False)

# Nivel de significancia
alpha = 0.05

# Reporte de resultados
print("==== RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO ====\n")
print("Prueba t para muestras independientes (varianzas desiguales)")
print(f"Estadístico t: {t_stat:.4f}")

# Mostrar valor p
if p_value < 0.001:
    print("Valor p: < 0.001 (muy significativo)")
else:
    print(f"Valor p: {p_value:.4f}")
    print(f"Valor p (notación científica): {p_value:.2e}")

# Interpretación del resultado
print("\n--- DECISIÓN ---")
if p_value < alpha:
    print(f"Se rechaza la hipótesis nula (α = {alpha}): \n→ Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.")
else:
    print(f"No se rechaza la hipótesis nula (α = {alpha}): \n→ No hay evidencia suficiente para afirmar que los grupos difieren.")
```

```
Prueba t para muestras independientes (varianzas desiguales)
Estadístico t: -9.3328
Valor p: < 0.001 (muy significativo)

--- DECISIÓN ---
Se rechaza la hipótesis nula (α = 0.05):
→ Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

In [4]:
```

## ***E. coli***

Hipótesis nula

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$H_0$ : el halo de inhibición producido por el extracto crudo es igual al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

Hipotesis alternativa

$$H_a: \mu \neq \mu_0$$

$H_a$ : el halo de inhibición producido por el extracto crudo es diferente al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

```
import scipy.stats as stats

# Datos
extracto = [127.29, 102.31, 107.31, 94.93, 126.34, 146.57, 143.97]
ciprofloxacino = [378.79, 413.29, 395.69, 350.24, 406.64, 394.02, 324.66]

# Prueba t para dos muestras independientes (Welch, no asume varianzas iguales)
t_stat, p_value = stats.ttest_ind(extracto, ciprofloxacino, equal_var=False)

# Resultados
print(f"Estadístico t: {t_stat:.4f}")
print(f"Valor p: {p_value:.4f}")

# Decisión
alpha = 0.05
if p_value < alpha:
    print("Se rechaza la hipótesis nula: hay diferencia significativa entre los grupos.")
else:
    print("No se rechaza la hipótesis nula: no hay diferencia significativa entre los grupos.")
```

Estadístico t: -18.0383  
Valor p: 0.0000  
Se rechaza la hipótesis nula: hay diferencia significativa entre los grupos.

## ***S. epidermidis***

Hipótesis nula

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$H_0$ : el halo de inhibición producido por el extracto crudo es igual al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

## Hipotesis alternativa

$$H_a: \mu \neq \mu_0$$

$H_a$ : el halo de inhibición producido por el extracto crudo es diferente al halo de inhibición producido por el antibiótico de control.

```
import scipy.stats as stats

# Datos de los grupos
extracto = [81.85, 81.13, 98.27, 65.20, 71.38, 78.52, 74.95]
sulfametoxazol_trim = [220.33, 204.86, 224.37, 187.29, 230.56, 238.18, 188.44]

# Prueba t de Student para muestras independientes con varianzas desiguales
t_stat, p_value = stats.ttest_ind(extracto, sulfametoxazol_trim, equal_var=False)

# Nivel de significancia
alpha = 0.05

# Reporte de resultados
print("==== RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO ====\n")
print("Prueba t para muestras independientes (varianzas desiguales)")
print(f"Estadístico t: {t_stat:.4f}")

# Mostrar valor p
if p_value < 0.001:
    print("Valor p: < 0.001 (muy significativo)")
else:
    print(f"Valor p: {p_value:.4f}")
    print(f"Valor p (notación científica): {p_value:.2e}")

# Interpretación del resultado
print("\n--- DECISIÓN ---")
if p_value < alpha:
    print(f"Se rechaza la hipótesis nula (α = {alpha}): \n- Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.")
else:
    print(f"No se rechaza la hipótesis nula (α = {alpha}): \n- No hay evidencia suficiente para afirmar que los grupos difieren.")
```

```
Prueba t para muestras independientes (varianzas desiguales)
Estadístico t: -15.6677
Valor p: < 0.001 (muy significativo)

--- DECISIÓN ---
Se rechaza la hipótesis nula (α = 0.05):
→ Hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.
```

## ANEXO 2

### Anova para *E. coli*

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

|                 | N Analysis | N Missing | Mean      | Standard Deviation | SE of Mean |
|-----------------|------------|-----------|-----------|--------------------|------------|
| Sobrenadante    | 7          | 0         | 57,39143  | 4,41367            | 1,66821    |
| Extracto crudo  | 7          | 0         | 121,24571 | 20,271             | 7,66172    |
| Extracto eluido | 7          | 0         | 282,92    | 41,41421           | 15,6531    |

ANOVA

Overall ANOVA

|       | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value   | Prob>F     |
|-------|----|----------------|-------------|-----------|------------|
| Model | 2  | 189184,52232   | 94592,26116 | 132,26415 | 1,7294E-11 |
| Error | 18 | 12873,18346    | 715,17686   |           |            |
| Total | 20 | 202057,70578   |             |           |            |

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.  
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.  
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | Data Mean |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 0,93629  | 0,17382   | 26,74279 | 153,85238 |

Means Comparisons

Tukey Test

|                                | MeanDiff  | SEM      | q Value  | Prob       | Alpha | Sig | LCL       | UCL       |
|--------------------------------|-----------|----------|----------|------------|-------|-----|-----------|-----------|
| Extracto crudo Sobrenadante    | 63,85429  | 14,29462 | 6,31731  | 8,28427E-4 | 0,05  | 1   | 27,37231  | 100,33626 |
| Extracto eluido Sobrenadante   | 225,52857 | 14,29462 | 22,31228 | 0          | 0,05  | 1   | 189,04659 | 262,01055 |
| Extracto eluido Extracto crudo | 161,67429 | 14,29462 | 15,99496 | 0          | 0,05  | 1   | 125,19231 | 198,15626 |

Grouping Letters Table

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.  
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

|       | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Prob>F  |
|-------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| Model | 2  | 2223,58401     | 1111,79201  | 4,10255 | 0,03404 |
| Error | 18 | 4878,00663     | 271,00037   |         |         |

At the 0.05 level, the population variances are significantly different.

## Anova para *S. epidermidis*

Notes

Input Data

Descriptive Statistics

|                 | N Analysis | N Missing | Mean     | Standard Deviation | SE of Mean |
|-----------------|------------|-----------|----------|--------------------|------------|
| Sobrenadante    | 7          | 0         | 45,77571 | 3,62135            | 1,36874    |
| Extracto crudo  | 7          | 0         | 78,75643 | 10,39914           | 3,9305     |
| Extracto eluido | 7          | 0         | 86,53171 | 15,70345           | 5,93535    |

ANOVA

Overall ANOVA

|       | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value  | Prob>F     |
|-------|----|----------------|-------------|----------|------------|
| Model | 2  | 6554,87961     | 3277,43981  | 26,72883 | 4,08332E-6 |
| Error | 18 | 2207,12695     | 122,61816   |          |            |
| Total | 20 | 8762,00656     |             |          |            |

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.  
 Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.  
 At the 0.05 level, the population means are significantly different.

Fit Statistics

|  | R-Square | Coeff Var | Root MSE | Data Mean |
|--|----------|-----------|----------|-----------|
|  | 0,7481   | 0,15739   | 11,07331 | 70,35462  |

Means Comparisons

Tukey Test

|                                | MeanDiff | SEM     | q Value | Prob       | Alpha | Sig | LCL      | UCL      |
|--------------------------------|----------|---------|---------|------------|-------|-----|----------|----------|
| Extracto crudo Sobrenadante    | 32,98071 | 5,91893 | 7,8801  | 7,76938E-5 | 0,05  | 1   | 17,87473 | 48,0867  |
| Extracto eluido Sobrenadante   | 40,756   | 5,91893 | 9,73785 | 5,51867E-6 | 0,05  | 1   | 25,65002 | 55,86198 |
| Extracto eluido Extracto crudo | 7,77529  | 5,91893 | 1,85775 | 0,40604    | 0,05  | 0   | -7,3307  | 22,88127 |

Grouping Letters Table

Tukey Test

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.  
 Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

Homogeneity of Variance Test

Levene's Test(Absolute Deviations)

|       | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Prob>F  |
|-------|----|----------------|-------------|---------|---------|
| Model | 2  | 428,68219      | 214,3411    | 7,7082  | 0,00382 |
| Error | 18 | 500,52394      | 27,80689    |         |         |

At the 0.05 level, the population variances are significantly different.