



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
MICROPARTÍCULAS COMPUESTAS DE QUITOSANO Y
EXTRACTO CON SAPONINAS DE *Yucca baccata***

Por:

Claudia Nayelli Ponce Acosta

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

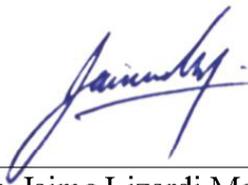
MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Claudia Nayelli Ponce Acosta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



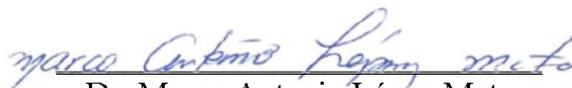
Dr. Luis Quihui Cota
Director de tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza
Integrante del comité de tesis



M.C Gloria Gpe. Morales Figueroa
Integrante del comité de tesis



Dr. Marco Antonio López Mata
Integrante del comité de tesis

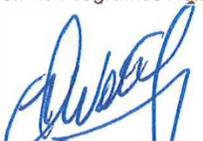
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Caracterización y Actividad Antibacteriana de Micropartículas Compuestas de Quitosano y Extracto con Saponinas de *Yucca baccata*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Claudia Nayelli Ponce Acosta, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero proporcionado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por permitirme continuar mi formación en tan admirable institución.

A todas las personas que fueron una parte importante en este proyecto, iniciando por los miembros de mi comité, agradezco todos los conocimientos que compartieron conmigo, por su paciencia, por sus recomendaciones y su guía que siempre estuvo para mí. Gracias Dr. Luis Quihui Cota, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, M.C Gloria Gpe. Morales Figueroa y al Dr. Marco Antonio López Mata; de todos me llevo una parte muy importante en mi ser.

También agradezco profundamente a dos personas por su apoyo técnico en la realización de este trabajo a M.C. Karla Guadalupe Martínez y M.C. Rosalva Pérez Morales. Muchas gracias porque siempre, siempre estuvieron para mí, me guiaron y apoyaron en los laboratorios, respondieron mis dudas a todas horas y a pesar de todo, siempre me brindaron una sonrisa, por siempre estaré agradecida con su gran labor, no solo hacía mí, si no hacia todos los estudiantes que tienen la dicha de cruzarse en su camino.

Gracias especiales a Cristina Acuña, porque me diste una cálida bienvenida, me acompañaste, me escuchaste en mis problemas y me ayudaste a solucionarlos, aún en la distancia; en ti encontré a una gran amiga y ser muy valioso.

Agradezco a Julio, Adrián, Manuel y Francisco ya que su ayuda fue esencial para mí, gracias por hacer el laboratorio más ameno y por compartir su conocimiento conmigo; gracias Julio porque siempre me recibiste con tu mejor sonrisa (y desayuno), tienes un gran corazón.

Gracias a mis amigos, a los que hice en CIAD y a los que ya lo eran: Bere, Abraham, Sayra, Alberto, Isasi, Regina, Selene, Melina, Robinson, Leo; en cada momento los llevaba en mi corazón.

Agradezco a Gil, porque me apoyaste en cada una de las decisiones que tomé, me ayudaste en todo aún sin comprender completamente lo que hacía, porque me motivaste cada día y viviste esta experiencia conmigo.

Agradezco por todos y cada una de las personas que conocí en este trayecto.

DEDICATORIA

Dedico esto a Dios, gracias a Él he podido realizar todo esto pues es quien me dio la fuerza, la sabiduría y la perseverancia para completar esta etapa de mi vida. Todo lo bueno y lo malo que sucedió en esta trayecto fue su plan perfecto para mí y le agradezco. También le agradezco por la familia en la que me permitió crecer, son un regalo muy grande para mí; a ellos también les dedico todo el esfuerzo realizado en este posgrado, todos fueron una fuente muy importante de amor en ésta y en todas las etapas de mi vida.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE ECUACIONES	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. La Contaminación del Agua.....	14
2.1.1. Bacterias Presentes en el Agua Contaminada.....	15
2.1.2. Enfermedades Asociadas al Agua Insalubre.....	16
2.2. Saponinas.....	17
2.2.1. Actividad Antibacteriana Intrínseca	19
2.2.2. Mecanismo de Acción Antimicrobiano	20
2.3. Quitosano.....	21
2.3.1. Actividad Antibacteriana Intrínseca	23
2.3.2. Mecanismo de Acción Antimicrobiano	24
2.4. Interacción Saponinas y Quitosano	25
2.4.1. Micropartículas Compuestas de Saponinas y Quitosano.....	26
2.4.2. Actividad Antibacteriana	28
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Específicos	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. Extracción de Saponinas de la Planta <i>Yucca baccata</i>	31
5.1.1. Método de Secado del Tallo de <i>Yucca baccata</i>	31
5.1.2. Obtención del Extracto del Tallo de <i>Yucca baccata</i>	32
5.1.3. Cuantificación de Saponinas en el Extracto de <i>Yucca baccata</i>	33
5.2. Elaboración de Micropartículas Compuestas	35
5.2.1. Preparación de las Soluciones con Quitosano y Extracto con Saponinas.....	35
5.2.2. Elaboración de Micropartículas Compuestas	35

CONTENIDO (continuación)

5.2.3. Caracterización de las Micropartículas Compuestas	36
5.3. Evaluación Antibacteriana “ <i>in vitro</i> ”	38
5.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida	39
5.3.2. Cinética de Crecimiento.....	40
5.4. Análisis Estadístico	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. Extracto con Saponinas de <i>Yucca baccata</i>	41
6.1.1. Rendimiento de Extracción.....	41
6.1.2. Cuantificación de Saponinas.....	42
6.2. Elaboración y Caracterización de Mp Compuestas de Quitosano y Extracto con Saponinas.....	44
6.2.1. Tamaño de Micropartículas	44
6.2.2. Morfología de las Micropartículas.....	45
6.2.3. Eficiencia de Asociación	47
6.3. Actividad Antibacteriana de Micropartículas.....	50
6.3.1. Concentraciones Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB).....	50
6.3.2. Cinética de Crecimiento.....	52
7. CONCLUSIÓN.....	56
8. RECOMENDACIONES.....	57
9. BIBLIOGRAFÍA.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructura de saponina triterpénica (A) y esteroideal (B)	18
2 Características de la Pared celular de bacterias Gram positiva (A) y Gram negativa (B)	21
3 Estructura del quitosano.....	22
4 Esquema general de la cuantificación de saponinas del tallo de <i>Yucca baccata</i>	34
5 Curva estándar de diosgenina 93% utilizada para la cuantificación de saponinas esteroidales del extracto del tallo de <i>Yucca baccata</i>	34
6 Sistema de elaboración de micropartículas.....	36
7 Curva de calibración UV-visible para la medición de eficiencia de asociación y liberación del extracto con saponinas de las micropartículas compuestas	38
8 Espectro FTIR del Extracto con saponinas de <i>Yucca baccata</i> y Sigma diosgenina	43
9 Distribución de tamaños de micropartículas.....	44
10 Imágenes de microscopia con objetivo 4x de las micropartículas de quitosano (A) y compuestas (B) realizadas mediante gelificación iónica	46
11 Micrografía de las Mp liofilizadas de Qs/Extsap (A) y Qs (B) utilizando aumento de 35X por microscopía electrónica de barrido	46
12 Micrografía de las Mp liofilizadas de Qs/Extsap (A) y Qs (B) utilizando aumento de 500X por microscopía electrónica de barrido	47
13 Cuantificación de la pérdida del extracto con saponinas de las micropartículas compuestas.....	48
14 Espectro FTIR de las micropartículas.....	49
15 Cinética de crecimiento de cada bacteria en contacto con micropartículas.....	53

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Principales patógenos transmitidos a través del agua y sintomatología asociada	16
2. Hallazgos recientes sobre la interacción saponinas y quitosano.....	26
3. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.....	51

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Página
1. Ecuación para cuantificación de saponinas esteroidales	34
2. Ecuación para cuantificación la de extracto con saponinas perdido en micropartículas ..	37
3. Ecuación de eficiencia de asociación	38

RESUMEN

La salubridad del agua es fundamental para el desarrollo y bienestar humano, ya que la ingesta de agua contaminada es un factor de riesgo para la salud. Actualmente se investigan distintas formas para eliminar los contaminantes biológicos del agua. Las nuevas alternativas consideran a los biomateriales elaborados con componentes naturales, como extractos o polímeros. Un ejemplo, son las plantas con metabolitos como saponinas, o polímeros naturales como el quitosano, que han demostrado propiedades antimicrobianas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de micropartículas (Mp) compuestas por quitosano y extracto con saponinas del tallo de *Yucca baccata* (*Y. baccata*) sobre bacterias que se encuentran comúnmente en agua insalubre. Las Mp de quitosano y Mp compuestas de quitosano y extracto con saponinas fueron elaboradas mediante el método de goteo controlado y baño recirculado. Se caracterizaron usando FTIR, microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica invertida. Su actividad antibacteriana fue determinada a través de la concentración mínima inhibitoria (CMI) la concentración mínima bactericida (CMB) y cinética de crecimiento bacteriano. El extracto de *Y. baccata* presentó un rendimiento de 3.85% de saponina y el análisis de FTIR confirmó la presencia de saponinas de tipo esterooidal. Las Mps presentaron un diámetro promedio de $271.80 \pm 91.86 \mu\text{m}$ y su eficiencia de asociación fue de 86.70%. Se presentó una CMI en *L. monocytogenes* de 0.4g/mL al añadir Mp compuestas y una cantidad mayor de Mp de quitosano (0.5g/mL) fue necesaria para el mismo efecto. El resto de las cepas no presentaron diferencia entre ambos tipos de Mp ($P > 0.05$). La CMB para *S. typhi* fue de 0.3g/mL de Mp compuestas y 0.4g/mL de Mp de quitosano; 0.4g/mL de Mp compuestas y 0.5g/mL de Mp de quitosano para *S. aureus*; 0.5g/mL de Mp compuestas y 0.6g/mL de Mp de quitosano en *L. monocytogenes*. *E. coli* no presentó diferencia en la CMB para ambos tipos de Mp ($P > 0.05$). La cinética de crecimiento mostró que las Mp compuestas redujeron el crecimiento bacteriano en la fase exponencial de todas las bacterias, generando la muerte celular a las 16 h para *L. monocytogenes* y *E. coli*; y a las 24 h para el resto de las bacterias. En conclusión, las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas mostraron actividad antibacteriana contra las principales bacterias patógenas que son transmitidas por agua.

Palabras clave: Micropartículas, Quitosano, Saponinas, Actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Water healthiness is essential for human development and well-being, since the intake of contaminated water is a risk factor for health. Currently, different ways to eliminate biological contaminants in water are being investigated. The new alternatives consider biomaterials made with natural components, such as extracts or polymers. An example of this are plants with metabolites such as saponins, or natural polymers such as chitosan, which have shown antimicrobial properties. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of microparticles (Mp) composed of chitosan and *Yucca baccata* stem extract with saponins on bacteria commonly found in unhealthy water. The chitosan Mp and the Mp composed of chitosan and extract with saponins were made using the controlled dripping and recirculating bath method. They were characterized using FTIR, scanning electron microscopy and inverted optical microscopy. Their antibacterial activity was determined through the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and kinetics of bacterial growth. *Y. baccata* extract yielded 3.85% saponin, also FTIR analysis confirmed the presence of a steroidal-type saponin. The Mp presented an average diameter of $271.80 \pm 91.86 \mu\text{m}$ and their association efficiency was 86.70%. A MIC in *L. monocytogenes* of 0.4g/mL was presented when adding composed Mp and a higher amount of chitosan Mp (0.5g/mL) was necessary to achieve the same effect. The rest of the strains did not present differences between both types of Mp ($P > 0.05$). The MBC for *S. typhi* was 0.3g/mL of composed Mp and 0.4g/mL of chitosan Mp; 0.4g/mL of composed Mp and 0.5g/mL of chitosan Mp for *S. aureus*; 0.5g/mL of composed Mp and 0.6g/mL of chitosan Mp in *L. monocytogenes*. *E. coli* did not show any difference in MBC for both types of Mp ($P > 0.05$). Growth kinetics showed that composed Mp reduced bacterial growth in the exponential phase of all bacteria, leading to cell death at 16 h for *L. monocytogenes* and *E. coli*; and at 24 h for the rest of the bacteria. In conclusion, the microparticles composed of chitosan and extract with saponins showed antibacterial activity against the main pathogenic bacteria that are transmitted by water.

Key words: Microparticles, Chitosan, Saponins, Antibacterial activity.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación del agua es un problema a nivel mundial que ocasiona más de 800 mil muertes al año, lo cual es principalmente atribuido al consumo de agua de baja calidad (OMS, 2019). El agua insalubre presenta compuestos biológicos, como bacterias, virus y parásitos peligrosos para la salud que generalmente ocasionan diarrea y suelen ser responsables de deshidratación y en casos graves la muerte (Coria, 2014; Forstinus *et al.*, 2016). Algunos de los patógenos que se presentan comunmente en el agua contaminada suelen ser *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* (OMS, 2018).

Debido a esta problemática, se investigan distintas formas para eliminar los contaminantes biológicos presentes en el agua. Las nuevas alternativas para eliminar los agentes biológicos se basan en el uso de componentes naturales, con las siguientes características: biodisponibles, biodegradables y no tóxicos. Los extractos de plantas con saponinas y biopolímeros a base de polisacáridos son una alternativa importante para eliminar los agentes biológicos, ya que poseen propiedades antibacterianas. (Kregiel *et al.*, 2017; Li y Zhuang, 2020).

Las saponinas son glucósidos que se encuentran distribuidas en el reino vegetal, su principal función en las plantas es como defensa contra microorganismos presentes en la planta de *Yucca baccata* (Moghimpour y Handali, 2015). Las propiedades antibacterianas, de esta planta han sido evaluadas contra bacterias Gram positivas (Espejo, 2014). Por otro lado, el quitosano es un polisacárido lineal obtenido mediante el proceso de la desacetilación de la quitina de crustáceos o insectos principalmente (Muxika *et al.*, 2011). Algunos reportes sobre su actividad antibacterial, establecen que su mayor efecto antibacteriano es contra bacterias Gram negativas y algunos hongos (Silva *et al.*, 2010). Además, gracias a sus grupos funcionales se pueden obtener una amplia gama de materiales biopoliméricos, entre ellos micropartículas (Ardila *et al.*, 2017).

Anteriormente se ha evaluado de forma individual la capacidad antibacteriana de extractos de plantas con saponinas y quitosano; sin embargo, los estudios enfocados en investigar su efecto en conjunto son escasos; a pesar de que se ha reportado que la adición de saponinas en micropartículas de quitosano brinda un mejor efecto antibacteriano que micropartículas elaboradas solo de quitosano (Kurniawati *et al.*, 2014). Por lo anterior, el propósito de la investigación fue evaluar el efecto de las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata* contra bacterias que comúnmente se encuentran en agua para consumo humano.

2. ANTECEDENTES

2.1. La Contaminación del Agua

El agua es indispensable para mantener condiciones adecuadas de salud y bienestar, ya que interviene en distintas funciones del cuerpo y representa más de la mitad del peso corporal de los humanos. Sin embargo, no siempre se tiene acceso a agua libre de contaminantes (OMS, 2018). En 2019, la OMS declaró que a nivel mundial 785 millones de personas carecen de un servicio básico de agua potable en su hogar y cada año mueren 829 mil a causa de la falta de un suministro de agua de buena calidad. Respecto a México, el 93% de las viviendas reciben agua dentro de su propiedad, pero solo el 68% la obtiene diariamente; el 7% que carece de ella y la consigue a través de fuentes inseguras como llaves públicas, pozos, ríos, arroyos o pipas (INEGI, 2018). Por lo que se desconoce si la calidad del agua ingerida es adecuada para su consumo.

De acuerdo con Norma Oficial Mexicana 127-SSA1-1994, el agua se considera segura para su ingesta cuando se cumplen los límites permisibles de características bacteriológicas, físicas, organolépticas y químicas, establecidas en la misma. En 2019, la Comisión Nacional de los Derechos Humanos (CNDH) reportó que con base a los parámetros de calidad de la NOM 127-SSA1, solamente el 4% de los municipios de la República Mexicana cumplen con todos los indicadores de calidad del agua. Así mismo, el 58% de los municipios no presenta información sobre la calidad del agua que brinda, lo cual puede atribuirse a la falta de monitoreo o de registros. La contaminación del agua suele ocurrir por la presencia de compuestos químicos o biológicos, estos últimos usualmente son bacterias, virus y parásitos. Algunos de ellos provocan enfermedades graves que podrían ser mortales, causando fiebre tifoidea, cólera o hepatitis infecciosa; también, otros patógenos se asocian con enfermedades menos graves, como enfermedad diarreica autolimitada. Los brotes de enfermedades transmitidas por agua insalubre deben evitarse debido a su capacidad para provocar infección simultánea en un gran número de personas, generando un riesgo grave de salud y un impacto importante en la salud pública (Coria, 2014; OMS, 2018).

2.1.1. Bacterias Presentes en el Agua Contaminada

De acuerdo con el Manual de Bergey (Brenner *et al.*, 1984), más del 80% de bacterias encontradas en el agua pueden aislarse y clasificarse en Gram positivas y Gram negativas. Las Gram positivas comprenden los géneros *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* y *Clostridium*, de las cuales, las comúnmente encontradas en el agua insalubre son *Enterococcus faecalis*, *Clostridium perfringens* y *Listeria monocytogenes*. Las Gram negativas pueden subdividirse en dos clases, enterobacterias y no enterobacterias (Ríos-Tobón *et al.*, 2017).

Los géneros de enterobacterias más comunes en agua son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella* y *Edwardsiella* (Ríos-Tobón *et al.*, 2017). Las primeras 5 bacterias previamente mencionadas han sido categorizadas como coliformes totales. Además, dentro de los coliformes totales se encuentran los coliformes fecales, que comprende a la bacteria *Escherichia coli*. El grupo coliformes es usado como indicador de agua insalubre ya que son bacterias comunes presentes en el tracto gastrointestinal y generalmente permanecen más tiempo en agua que las bacterias patógenas. La presencia de coliformes en el agua indica que se presentó contaminación bacteriana reciente (García e Iannacone, 2018). Por otro lado, a pesar de que el género de *Shigella* y *Salmonella*, no son considerados coliformes, son responsables de enfermedades como gastroenteritis y fiebre tifoidea, respectivamente (Ríos-Tobón *et al.*, 2017). En el grupo de las no enterobacterias se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio* y *Campylobacter*. De acuerdo con Arcos-Pullido y colaboradores (2005), estos microorganismos se les encuentra comúnmente en fuentes de agua y pueden estar en una concentración alta, independientemente a la presencia o ausencia de contaminación fecal y normalmente se asocian a infecciones en los humanos.

Se ha reportado que no es práctico analizar el agua para cada patógeno individualmente, ya que algunos pueden causar enfermedades a dosis muy bajas. En cambio, ya que la mayoría de los patógenos causantes de diarrea son de origen fecal, es más práctico analizar el agua para buscar especies indicadoras en la materia fecal. En México, durante muchos años, los coliformes totales y fecales se utilizan como indicadores de presencia de contaminación fecal al momento de evaluar la calidad del agua (Forstinus *et al.*, 2016).

2.1.2. Enfermedades Asociadas al Agua Insalubre

Las enfermedades transmitidas por el consumo de agua, comúnmente conocidas como enfermedades de origen hídrico, abarcan aquellas que se manifiestan por la exposición directa e indirecta al agua, ya sea por consumo o exposición al contacto con la piel. Estas enfermedades generalmente se propagan a través de tres rutas principales: ingesta de agua contaminada, consumo de alimentos lavados con agua insalubre, e insectos como vector (OMS, 2018).

Los agentes patógenos que se pueden transmitir a través del de agua contaminada son diversos en relación con sus características de comportamiento, síntomas y resistencia. El cuadro 1 presenta información general sobre las bacterias transmitidas a través del agua insalubre. De acuerdo a Reyes-Gómez y colaboradores (2018), el desarrollo de estas infecciones, depende de diversos factores como la dosis mínima infectante (DMI), la patogenicidad de la bacteria, la susceptibilidad del hospedero y diversas características ambientales.

Cuadro 1. Principales patógenos transmitidos a través del agua y sintomatología asociada

Agente patógeno	Enfermedad asociada	Importancia para la salud ^a
<i>Escherichia coli</i>	Diarrea aguda, diarrea con sangre y gastroenteritis.	Alta
<i>Salmonella typhi</i>	Fiebre tifoidea, fiebre paratifoidea y otras salmonelosis graves.	Alta
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis.	Alta
<i>Vibrio cholerae</i>	Gastroenteritis y cólera.	Alta
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Infecciones pulmonares, tracto urinario y riñón.	Moderada
<i>Staphylococcus aureus</i>	Enterocolitis, vómitos, diarrea, fiebre, cólicos.	Moderada

a. La importancia para la salud se relaciona con la incidencia y gravedad de enfermedad, incluida la asociación con brotes. Adaptado de OMS, 2017.

Actualmente, en la gran parte del mundo estas bacterias han sido controladas por tratamientos de desinfección del agua. Sin embargo, la transmisión continua debido a la deficiente eliminación por

la desinfección, y la ingesta de esta agua contaminada o el consumo de alimentos lavados por la misma, mantienen las infecciones ocasionadas por *Shigella sonnei*, *E. coli*, y otros géneros patógenos como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Helicobacter* y *Yersinia*. Esto principalmente en regiones desarrolladas (Coleman *et al.*, 2013).

De forma general, la mayoría de las enfermedades transmitidas por agua insalubre se caracterizan por la presencia de diarrea, lo que implica deposiciones acuosas excesivas, que a veces resultan en deshidratación y en casos graves en muerte. Según la Organización Mundial de la Salud (2017), la enfermedad diarreica representa aproximadamente el 4.1% de la carga mundial diaria total de enfermedad y es responsable de la muerte de 1.8 millones de personas cada año. El 88% de esa carga se atribuye al agua insalubre, y a la falta de saneamiento e higiene, y la mayoría de los casos involucra principalmente a menores de 5 años de países en desarrollo; como lo es México, que ocupa los primeros lugares a nivel mundial de mortalidad en niños de esa edad (Forstinus *et al.*, 2016; Ramírez-Castillo *et al.*, 2015).

2.2. Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios que pertenecen al grupo de los glucósidos, se encuentran distribuidas en todo el reino vegetal. Las saponinas funcionan como una barrera química para contrarrestar los patógenos de las plantas. Por lo tanto, se encuentran distribuidas en sitios estratégicos de los tejidos vegetales, que son más susceptibles al ataque bacteriano (Cheok *et al.*, 2014). Químicamente, están compuestas por dos partes principales: una cadena glucídica soluble en agua y una estructura liposoluble, también conocidas como glicona y aglicona respectivamente. Según su estructura química, los compuestos de saponina pueden poseer un esqueleto de aglicona triterpenoidal (C30) o esterooidal (C27), con diferentes números de cadenas de azúcar unidas en varias posiciones (Fig. 1) (Hostettmann y Marston, 1995; Abdelrahman y Jogaiah, 2020).

Debido a el reciente interés por nuevos compuestos biodegradables, biodisponibles, y con propiedades biológicas, se ha descubierto que las saponinas presentan una amplia gama de propiedades como lo son las antiinflamatorias, antifúngicas, antiparasitarias, antitumorales,

antivirales y antibacterianas (Upadhyay *et al.*, 2018; Kregiel *et al.*, 2017; Carmona, *et al.*, 2017).

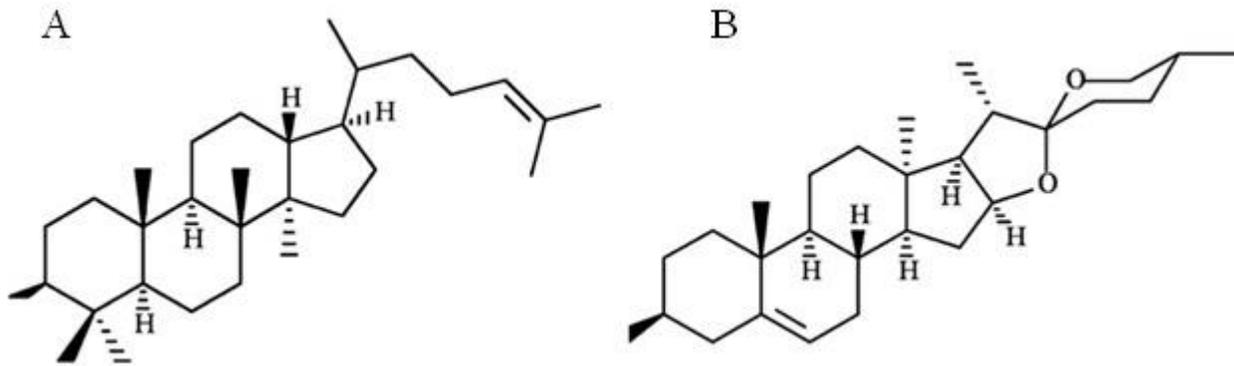


Figura 1. Estructura de saponina triterpénica (A) y esteroidal (B).

Las saponinas triterpénicas, son predominantes en plantas dicotiledóneas como leguminosas, del género *Araliaceae* o *Caryophyllaceae* y se encuentran en alimentos como soya, frijoles y guisantes. Mientras que las saponinas esteroidales se encuentran en plantas monocotiledóneas, las cuales pertenecen a los géneros como *Yucca*, *Agavaceae*, *Dioscoreaceae* y *Liliaceae*; normalmente se acumulan en plantas de cultivo como espárragos, fenogreco y ginseng (Alcázar, 2016). Una fuente importante de saponinas esteroidales son los árboles y arbustos de *Yucca* (*Asparagaceae*), nativos del sudeste de América del Norte y distribuidos por todo el mundo. En el norte de México, principalmente en la zona desértica de Coahuila y Sonora, es común encontrar a la planta *Yucca baccata* (Kregiel *et al.*, 2017).

La concentración de saponinas que se obtiene de las plantas depende de varios factores, como la especie seleccionada, la parte de la planta a evaluar (hojas, tallo, frutos o corteza), los factores ambientales y agronómicos que afectan el crecimiento de la planta, entre otros. Respecto a la planta de *Yucca baccata*, investigaciones previas en el grupo de trabajo, realizadas por León-Trujillo (2012) demostraron que la parte de la planta que presenta mayor cantidad de saninas es el tallo, posteriormente la hoja y finalmente la raíz, reportando concentraciones de 3.37mg/mL, 1.99mg/mL y 0.41mg/mL, respectivamente.

2.2.1. Actividad Antibacteriana Intrínseca

Otras propiedades antimicrobianas que se han reconocido a las saponinas son; antiprotozoarias, antifúngicas, antivirales y antibacterianas. Se ha hipotetizado que su acción sobre bacterias es más efectiva sobre Gram positivas como *E. faecalis*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Espejo, 2014). Debido a esto, diversos investigadores han evaluado la eficacia antibacteriana de los extractos con saponinas provenientes de distintas fuentes para observar su comportamiento frente bacterias Gram positivas y negativas.

En 2016, Akaniro y colaboradores evaluaron las propiedades antibacterianas de las saponinas provenientes de *Vitex doniana* y de *Pentaclethra macrophylla*. Para ello realizaron pruebas con dos extractos obtenidos de de las hojas y la corteza del tallo. Los resultados mostraron una mejor respuesta cuando el extracto de la corteza del tallo era utilizada; mostrando una mayor zona de inhibición en medios con *S. aureus* (23 mm), comparado con una menor zona de inhibición de *P. aeruginosa* y *E. coli* (19.5 y 17 mm, respectivamente). En el mismo año, Soetan y colaboradores evaluaron la actividad antibacteriana del extracto butanólico con saponinas de sorgo a distintas concentraciones contra *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados mostraron inhibición de *S. aureus* a una concentración de 25 mg/mL, pero no se observó inhibición de la carga bacteriana de *E. coli*. Hassan y colaboradores (2010) realizaron pruebas antibacterianas del extracto con saponinas de *Yucca* contra *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli*. Se observó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de *S. aureus* a una concentración de 12.5 mg/mL del extracto con saponinas, sin embargo, el ensayo no mostró actividad antibacteriana en las otras dos bacterias Gram negativas.

También en el grupo de trabajo, Pereo-Vega (2015), demostró que el extracto butanólico con saponinas del tallo de *Yucca baccata* generó la muerte celular de *S. aureus* (25 mg/mL) y *L. monocytogenes* (17.5 mg/mL). En estos estudios los extractos con saponinas mostraron inhibición exitosa contra las bacterias Gram positivas, sin embargo, no se observaron resultados similares contra las bacterias Gram negativas, resultando nula o muy baja inhibición contra ellas; esto pudiera ser a debido a que las saponinas no logran penetrar las paredes celulares de los microorganismos Gram negativos, dado el efecto protector de su doble membrana (Soetan *et al.*, 2016).

Sin embargo, esto aún es concluyente ya que recientemente se ha demostrado que las saponinas

pueden inhibir bacterias Gram negativas. En 2020, Sonfack y colaboradores probaron un compuesto metanólico con saponinas proveniente de las raíces de la planta *Albizia adianthifolia* frente a bacterias Gram negativas. Los resultados de la CMI mostraron una mejor respuesta contra *P. aeruginosa* y *P. stuartii* (16 µg/mL y 12 µg/mL, respectivamente); así como una respuesta menor en *E. coli* (32 µg/mL) comparada con el antibiótico de referencia (cloranfenicol) (64 µg/mL). Además de una concentración mínima bactericida (CMB) en *P. stuartii* a una menor adición de saponinas (64 µg/mL) comparado con el antibiótico (256 µg/mL). También, en 2017 Asati y Yadava probaron la eficacia antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Caesalpinia pulcherrima* Linn; sus resultados reportaron una CMI al agregar la misma cantidad del extracto con saponinas (3.12 µg/mL) para *S. aureus* y *P. aeruginosa*, Gram positiva y negativa respectivamente. Como se puede observar, la actividad antibacteriana de los extractos con saponinas pueden variar y su respuesta puede ser afectada por diversos factores relacionados con la obtención de las saponinas, como su fuente, los métodos de extracción y los solventes utilizados; también se pueden ver alteradas por características biológicas, como la degradación de la saponina debido a algunas enzimas glucosidasas producidas por bacterias Gram negativas, diferencias en la estructura de la envoltura celular de las bacterias y la variación en la estructura química de las saponinas (Fleck *et al.*, 2019).

2.2.2. Mecanismo de Acción Antimicrobiano

Las saponinas pueden actuar como un agente bactericida y/o bacteriostático. El primero, limita el crecimiento bacteriano al interferir con la síntesis de proteínas, la replicación del ADN y el metabolismo bacteriano. En cambio, el segundo produce la muerte de la bacteria, y generalmente se presenta a una mayor concentración del extracto con saponinas (Ray *et al.*, 2013).

Además, las bacterias Gram positivas poseen una pared celular permeable a las saponinas, en cambio, las Gram negativas presentan dos paredes celulares, una interna y una externa (Fig. 2). De acuerdo Ramirez y colaboradores (2017), las saponinas pueden interactuar con la membrana externa y penetrarla, sin embargo, al intentar penetrar la barrera de la segunda membrana (interna) de las bacterias Gram negativas, se enfrentan a una resistencia intrínseca, lo que puede generar ineficacia en la actividad antibacteriana contra estas.

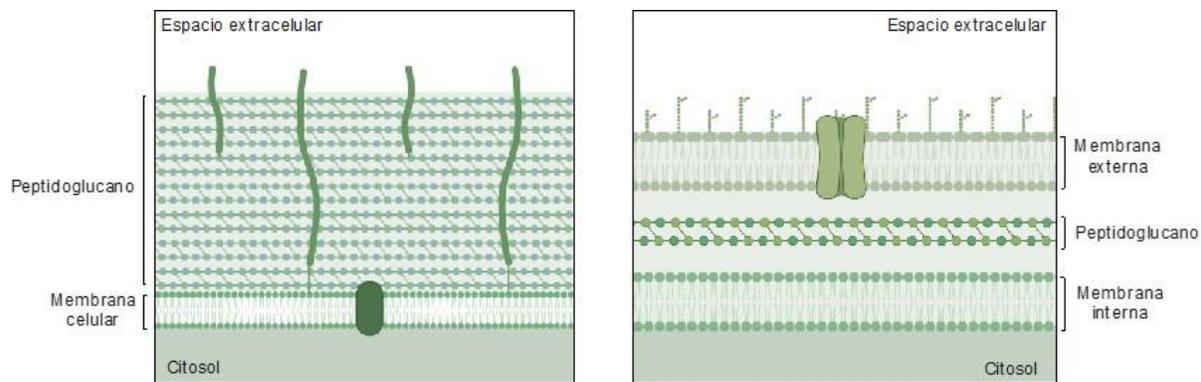


Figura 2. Características de la Pared celular de bacterias Gram positiva (A) y Gram negativa (B).

A través de diversos análisis como tinción cristal violeta, espectroscopía UV-Visible, electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR), es posible explicar un potencial mecanismo de acción de las saponinas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos análisis permiten ver que las saponinas alteran la permeabilidad de las membranas de las bacterias formando poros con la subsecuente liberación de proteínas intracelulares. También se ha observado alternancia en las estructuras bioquímicas y constituyentes celulares, que incluye proteínas, polisacáridos, ácidos grasos y ácidos nucleicos de las bacterias Gram positivas y negativas, lo que indica daños celulares en ellas (Ray *et al.*, 2013).

2.3. Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal formado por unidades de *D*-glucosamina y *N*-acetil-*D*-glucosamina, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4 (Fig. 3). Es un biopolímero que se obtiene de la desacetilación termoalcalina de la quitina. La cual, se encuentra ampliamente distribuida en exoesqueletos de artrópodos, siendo el de cangrejo y camarón las principales fuentes de obtención (Muxika *et al.*, 2011; Ferraro *et al.*, 2015). Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA), es un material GRAS, es decir es reconocido como seguro, por ello se usa ampliamente en áreas farmacéuticas, biomédicas, tecnología de los alimentos y tratamiento de aguas (Jana y Jana, 2019). Además, muestra excelentes propiedades biológicas, ya que es biodegradable, biocompatible, no tóxico, ni alergénico y además, presenta actividad

antimicrobiana. Estas propiedades varían significativamente en función de sus características fisicoquímicas, principalmente de su peso molecular y grado de acetilación (Lizardi-Mendoza *et al.*, 2016).

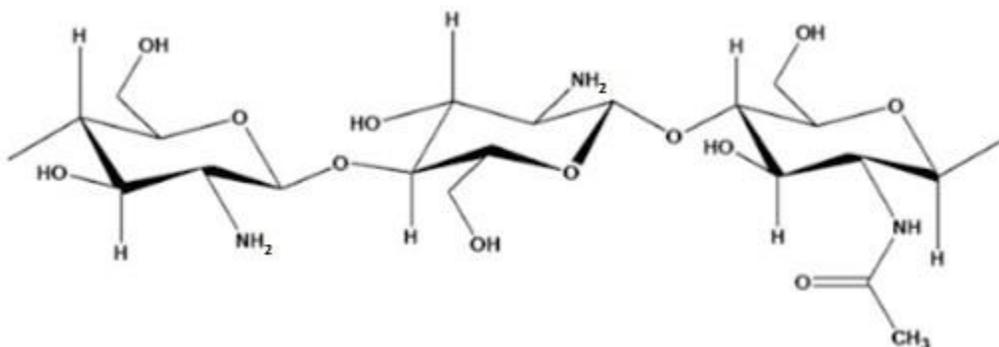


Figura 3. Estructura del quitosano

Previamente se ha documentado que el proceso de desacetilación termo alcalino de la quitina, depende de las condiciones de temperatura utilizada, presión, concentración de quitina y el tiempo que tarda el proceso para la obtención del quitosano. Estas condiciones, generalmente determinan el peso molecular del biopolímero, su polidispersión y el grado de desacetilación. El peso molecular representa una medida del tamaño de las cadenas presentes en la molécula de quitosano, y tiene efectos en su funcionalidad, bioactividad, solubilidad, propiedades estructurales y viscosidad (Saborit-Pino, 2015). Mientras que el grado de desacetilación es la proporción de unidades desacetiladas (glucosamina) con respecto al total de unidades que forman las moléculas del biopolímero (acetilado). Principalmente de estas dos características fisicoquímicas dependen las propiedades y el comportamiento del quitosano (Ramírez-Barragan *et al.*, 2016; Giraldo-Pedraza *et al.*, 2015).

El quitosano presenta tres grupos funcionales: grupo amino en el C-2, grupo hidroxilo secundario en el C-3 y grupo hidroxilo primario en el C-6. Su grupo amino lo diferencia de la quitina en funciones físicas, químicas y biológicas (Li y Zhuang, 2020); además, el carácter catiónico del quitosano también se atribuye a los grupos amino y, por lo tanto, es conocido como aminopolisacárido (Ali y Ahmed, 2018). Diversos grupos pueden unirse al quitosano para proporcionar una funcionalidad específica, alterar las propiedades biológicas o modificar sus

propiedades físicas; así mismo el quitosano es un biopolímero versátil, ya que los materiales poliméricos a base de este pueden transformarse en micropartículas, fibras, películas, geles, perlas, nanopartículas, entre otros. (Yilmaz-Atay, 2013). Gracias a ello y a una de sus propiedades más investigadas, su efecto antimicrobiano, el quitosano ha sido empleado en diversas áreas de trabajo de forma exitosa.

2.3.1. Actividad Antibacteriana Intrínseca

La actividad antibacteriana del quitosano ha sido evaluada con anterioridad frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas para conocer el desarrollo del biopolímero en ambos tipos de estructuras. En 2014, Younes y colaboradores publicaron un estudio para investigar el efecto antibacteriano del quitosano. Ellos encontraron que las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. typhi*) tienen una mayor susceptibilidad al quitosano en comparación con las bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis* y *M. luteus*) presentando zonas de inhibición de 12.5 mm para *E. coli*, 12 mm para *K. pneumoniae* contra 10.5 mm en *S. typhi*, contra 9.5 mm para *S. aureus*, 10 mm para *B. cereus*, y 9 mm para *M. luteus*. Además, en 2016, Goy y colaboradores, evaluaron distintas concentraciones de quitosano (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/L) contra *E. coli* y *S. aureus* y observaron una reducción del 96% en el crecimiento de *E. coli* a una concentración de 1 g/L de quitosano y una reducción del 25% de *S. aureus* a una concentración de 1.5g/L. Ese mismo año, Ji y colaboradores probaron películas de quitosano con una concentración del 50% del mismo, obteniendo una zona de inhibición mayor en *E. coli* (75.45 mm) que en bacterias Gram positivas; *S. aureus* y *B. Cereus* (62.45 y 59.81 mm, respectivamente).

En 2017, Ardila y colaboradores demostraron que una concentración de 1 g/L presentó buena actividad antibacteriana frente a *S. typhimurium* y *S. aureus*, generando una reducción del 99% y 97%, respectivamente. También, Soleimani y colaboradores (2015) evaluaron la actividad antibacteriana de quitosano contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis*. Sus resultados demostraron efectos inhibidores más alto contra *E. coli* y *S. aureus*, presentando una reducción del crecimiento del 98% a una concentración de 0.38 mg/mL de quitosano. De forma general, estos artículos demostraron que el efecto antibacteriano del quitosano puede variar entre las bacterias

Gram positivas y Gram negativas, esto pudiera ser debido a las diferentes características de sus paredes celulares. En la mayoría de los casos se observa una mayor reducción de la actividad bacteriana contra Gram negativas que con Gram positivas, sin embargo, esto no es concluyente, ya que se han reportado algunos hallazgos controversiales (Goy *et al.*, 2016; Matica y Ostafe, 2019; Divya *et al.*, 2017).

De acuerdo con Kong y colaboradores (2010), las variaciones en la eficacia antibacteriana del quitosano son atribuidos varios factores. Estos pueden clasificarse en cuatro categorías: factores microbianos, (relacionados con las especies y edad celular), factores intrínsecos del quitosano (densidad de carga positiva, peso molecular, concentración y características hidrofílicas/hidrofóbicas), factores ambientales (pH, temperatura y tiempo de reacción) y el estado físico del quitosano. Además, se ha reportado que el grado de desacetilización del quitosano tiene un efecto importante sobre sus propiedades antibacterianas. Cuanto mayor es su grado de desacetilización, mayor es la carga positiva después de la protonación del grupo amino del quitosano, generando un mejor potencial antibacteriano, ya que la carga positiva del grupo amino interactúa con las moléculas de carga negativa en la superficie de las células bacterianas (Li y Zhuang, 2020). También, Gallardo-Carrero y colaboradores (2019) demostraron que el quitosano puede causar una alta tasa de destrucción a través de su interacción con la pared celular bacteriana, la cual depende de la hidrofilia de la pared celular.

2.3.2. Mecanismo de Acción Antimicrobiano

El mecanismo de acción del quitosano no está definido por un solo modelo, por lo que se proponen 4 hipótesis que definen distintos mecanismos por los cuales el quitosano puede alterar las membranas celulares bacterianas. El modelo más factible menciona que se genera un cambio en la permeabilidad celular, debido a las interacciones entre el polisacárido cargado positivamente (NH_3^+) (pH <6.5) y la membrana cargada negativamente de la mayoría de las bacterias, interrumpiendo las funciones normales de la membrana, generando la fuga de componentes intracelulares e inhibiendo el transporte de nutrientes a las células (Lui *et al.*, 2004). Durante el mecanismo de acción sobre las bacterias Gram positivas, el quitosano se une al ácido teicoico de

la capa de los peptidoglicanos, afectando así la división celular, y las uniones con receptores de la superficie. En las bacterias Gram negativas, el posible mecanismo es el de la interacción de cargas electrostáticas de quitosano y las partes aniónicas de los lipopolisacáridos de la membrana extracelular (Rabea *et al.*, 2003).

El segundo modelo propone que el quitosano puede provocar cambios en la permeabilidad de la envoltura externa de la bacteria al formar un tipo de enlace iónico. Esto inhibe el transporte de nutrientes a la célula, aumentando la presión osmótica interna y la muerte celular, debido a la falta de nutrientes. (Sahariah y Másson, 2017). En el tercer modelo propuesto, el quitosano penetra la membrana citoplasmática, y destruye la célula al unirse al ADN, lo que impide su transcripción e interrumpe la síntesis de proteínas y ARNm (Croisier y Jérôme, 2013). El cuarto mecanismo de acción propone al quitosano actuando como un agente quelante que se une a los elementos traza metálicos de las bacterias, causando la producción de toxinas e inhibiendo el crecimiento bacteriano (Divya *et al.*, 2017).

2.4. Interacción Saponinas y Quitosano

Debido a las propiedades individuales del quitosano y las saponinas, su interacción suele utilizarse para potencializar sus características, aunado a esto, ambos compuestos presentan la ventaja de que se pueden realizar diversos materiales biopoliméricos con ellos y ser utilizados en distintas áreas de investigación acorde a las necesidades. El cuadro 2 presenta hallazgos recientes sobre la utilización de diversos biomateriales elaborados a base de quitosano y saponinas, obteniendo resultados exitosos en diversas áreas del conocimiento.

Cuadro 2. Hallazgos recientes sobre la interacción saponinas y quitosano.

Referencia	Biomaterial	Resultados
Noorjahan y Porchezhiyan, 2017	Hidrogel compuesto de quitosano y extracto con saponinas	Demostraron el efecto sinérgico como preservadores de alimentos
Laysandra <i>et al</i> 2019	Películas compuestas de extracto de saponinas y quitosano	Eliminó el naranja de metilo en agua contaminada
Kurniawati <i>et al</i> 2014	Flotación de aire disuelto con saponinas y quitosano	Eficaz para la separación de microalgas y materia orgánica como tratamiento de aguas residuales
Rejinold <i>et al</i> 2011	Nanopartículas de quitosano cargadas con saponinas	Mostró ser un agente terapéutico eficaz contra el cáncer
Bande <i>et al</i> 2020	Encapsulación de vacuna con quitosano y saponina	Mejoró la respuesta inmune y anuló la necesidad de una administración de refuerzo múltiple
Ma <i>et al</i> 2021	Hidrogel de quitosano con saponinas	Eliminó exitosamente el azul de metileno
Qiu <i>et al</i> 2021	Cubosomas encapsulados en saponinas con quitosano como coadyuvante	Demostró ser un sistema potencial de administración de vacunas

De acuerdo con las investigaciones presentadas anteriormente, es posible observar que existe una interacción positiva entre las saponinas y el quitosano, obteniendo resultados efectivos al combinar ambos compuestos naturales, independientemente del biomaterial o el área de investigación para el que fueron elaboradas. Por lo anterior, presentan un gran potencial para generar micropartículas y así potencializar la actividad antibacteriana intrínseca de cada compuesto.

2.4.1. Micropartículas Compuestas de Saponinas y Quitosano

Respecto a la forma física de micropartículas, anteriormente se han realizado diversas investigaciones en donde se elabora este biomaterial compuesto de saponinas y de quitosano de forma individual para ser utilizadas en diversas áreas. En 2016, Trombino y colaboradores elaboraron microesferas de saponinas de *Physospermum verticillatum* como un vehículo para la liberación específica de un medicamento. Se observó que este transportador podría liberar potencialmente el fármaco de forma exitosa. Además, Yang y colaboradores (2019) formularon y

evaluaron la liberación controlada de microesferas de colágeno con saponinas esteroidales, presentando un uso potencial para el tratamiento de tejido óseo durante periodos prolongados.

En 2014, Jeon y colaboradores elaboraron micropartículas con diversas concentraciones de quitosano (0.2%, 0.1% y 0.05%) para estudiar su efecto contra *E. coli*; obteniendo inhibición total (100%) cuando se evaluó con micropartículas que contenían una concentración del 0.2% de quitosano. Dima y colaboradores (2014) evaluaron el efecto antimicrobiano de quitosano en solución y en micropartículas. Se observó inhibición sobre *V. alginolyticus* a concentraciones de 0.125% del quitosano en solución; mientras que las micropartículas mostraron un efecto bactericida sobre el patógeno, necesitando una menor concentración para su inhibición (0.05%).

La información previa nos deja claro que ambos compuestos naturales pueden existir y generar resultados exitosos. Además se ha reportado que el uso de micropartículas presenta una ventaja al momento de evaluar la actividad antibacteriana de un compuesto, debido a su mayor interacción y adhesión con la pared celular de las bacterias en comparación con otras formas físicas como líquidos o sólidos (Ardila *et al.*, 2017).

En 2020, Li y Zhuag afirmaron que el quitosano puede interactuar con otros materiales con actividad antibacteriana para formar un compuesto que aumente su rendimiento antibacteriano, como lo son las saponinas. Sin embargo, estudios sobre micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas aún son escasos, especialmente los que van dirigidos al área de microbiología o tratamiento de aguas; esto pudiera ser debido a la diversidad de las propiedades individuales de ambos compuestos, por lo que su aplicación suele ser diversa y hacia distintas áreas de la investigación.

En 2020, Zhang y colaboradores elaboraron microesferas de liberación controlada a base de quitosano y saponinas preparadas mediante el método de secado por pulverización. El quitosano se usó como material portador, y el extracto con saponinas de *Panax notoginseng* como componente principal, obteniendo un efecto de liberación constante *in vitro*. Además, Sette-de-Souza y colaboradores (2018) realizaron micropartículas de quitosano producidas con extracto de saponinas de *Schinopsis brasiliensis Engler*, este estudio mostró el potencial del quitosano para proteger el extracto de *S. brasiliensis* de la degradación térmica, permitiendo futuras aplicaciones. Estas investigaciones permiten tener mejores bases en la preparación y uso de micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas, sin embargo, la cantidad de artículos en donde se usa extracto de *Yucca* es muy limitada. Debido a la disponibilidad, accesibilidad y propiedades

de los extractos de la planta *Yucca baccata* en el norte de México, es importante generar información nueva, particularmente, con relación a las propiedades que pueda exhibir en combinación con quitosano.

2.4.2. Actividad Antibacteriana

La información sobre la eficacia antibacteriana de micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata* es muy escasa. Sin embargo, es posible generar micropartículas con cada uno de ellos, con propiedades antibacterianas independientes. Con anterioridad se ha reportado que la adición de compuestos bioactivos a las micropartículas de quitosano, pueden generar estabilidad y así combatir a microorganismos patógenos (Kawakita *et al.*, 2019). Por lo tanto, se espera que la adición del extracto con saponinas a las micropartículas de quitosano, puedan potenciar su actividad antibacteriana.

Dentro de nuestro grupo de trabajo, Acuña-Gallardo (2019) evaluó micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas con *Yucca baccata* en distintas cantidades (0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2g / 5mL) contra *E. coli*, *S. typhi* y *L. monocytogenes*. Tanto *E. coli* como *S. typhi*, mostraron una inhibición del 99.99% cuando se les añadió la cantidad máxima de micropartículas (2.0 g/5mL). Mientras que *L. monocytogenes* mostró solo una reducción bacteriana máxima del 56.25% a una concentración de 1g/5mL.

Esta investigación es considerada como un antecedente para la generación de nuevo conocimiento, con las limitaciones y oportunidades que esto conlleva, aportación que incluya la realización de distintas pruebas microbiológicas y cepas adicionales bacterianas que nos proporcione más información en relación a las propiedades de las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas del tallo de *Yucca baccata*, como rangos de concentración con actividad microbiológica efectiva en relación a aquella con antibióticos convencionales contra diferentes cepas bacterianas asociadas con la contaminación del agua y alimentos.

3. HIPÓTESIS

Las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata* reducen efectivamente el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de las micropartículas de quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata* sobre bacterias que comúnmente se encuentran en agua para consumo humano.

4.2. Objetivos Específicos

1. Elaborar micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata*.
2. Caracterizar fisicoquímicamente las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata*.
3. Evaluar las propiedades antibacterianas de las micropartículas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Las saponinas provenientes del tallo de la planta *Yucca baccata* fueron desgrasadas con 300 mL de *n*-hexano con una pureza del 95% (Fermont, México) y extraídas con 800 mL de *n*-butanol (J.T. Baker, EE.UU.). Para la cuantificación de las saponinas se utilizó un estándar de diosgenina (saponina esteroidal) con una pureza del 93% (Sigma Aldrich, Alemania), se emplearon 5 mL de ácido sulfúrico (J.T. Baker, EE.UU.), al 50% (v/v) en agua bidestilada, 10 mL de metanol grado HPLC (J.T. Baker, EE.UU.) y 0.05 mL de *p*-anisaldehído al 98% (Sigma Aldrich, Alemania), todos adquiridos comercialmente. Para elaborar las micropartículas compuestas se utilizaron 4 g de quitosano extraído a partir de cáscaras de camarón, facilitada por el Laboratorio de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. El quitosano tenía un peso molecular aproximado de 29,000 g/Mol y un grado de acetilación del 25%. Éste quitosano fue disuelto en 2 mL de ácido acético glacial (J.T. Baker, EE.UU.) al 0.02M (v/v). Para la gelificación iónica de las micropartículas se utilizó la solución de quitosano y la solución compuesta por quitosano y extracto con saponinas, así como 40 g de tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma Aldrich, Alemania) para el baño de gelificación recirculado. Para el análisis microbiológico se utilizaron cepas ATCC de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhi* 14028, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Listeria monocytogenes* 7644. Estas fueron reactivadas en 30 mL de caldo Mueller-Hinton (MH) (Difco, Francia), las cepas fueron sembradas en agar MH (Difco, Francia). Como control positivo se utilizó sulfato de kanamicina (1mg/mL) (Sigma Aldrich, Alemania) y como control negativo el caldo MH con el inóculo de la bacteria.

5.1. Extracción de Saponinas de la Planta *Yucca baccata*

5.1.1. Método de Secado del Tallo de *Yucca baccata*

El tallo de la planta de *Yucca baccata* fue recolectado a 20 km del municipio de Cananea Sonora.

Los tallos fueron pesados en una balanza Ohaus (Adventurer ARA520, EE.UU.) y cortados en piezas de aproximadamente 1 cm de grosor para dejarlas secar en charolas durante 14 días bajo los rayos del sol. Una vez seco, los tallos fueron pulverizados utilizando un molino Pulvex (Modelo 200, México) hasta obtener un polvo con un tamaño de partícula aproximado de 2 mm. Se seleccionó el tallo de la planta, debido a que un estudio previo demostró que el tallo de *Yucca baccata* presenta la mayor concentración de saponinas (3.37 mg/mL), mientras que las hojas y la raíz, presentaron concentraciones de 1.99 mg/mL y 0.41 mg/mL respectivamente (León, 2012).

5.1.2. Obtención del Extracto del Tallo de *Yucca baccata*

Para el proceso de obtención del extracto con saponinas fue necesario desgrasar la muestra del tallo de *Yuca baccata*, por lo que se agregaron 300 mL de n-Hexano a 137.1 g del tallo pulverizado contenido en un vaso de precipitado, y se dejó en agitación por 24 h usando un agitador magnético (Thermolyne Cimarec 3, Reino Unido). Posteriormente se dejó reposar por 24 h para generar la separación de fases y se decantó para eliminar el hexano. Una vez desgrasada la muestra, se siguió el método de extracción descrito por Newbold *et al.*, (1977) y modificado por León-Trujillo (2012). Este polvo de coloración café fue pesado en una balanza Ohaus (Adventurer ARA520, EE.UU.) y suspendido en agua bidestilada (33 g/L), dejándose en agitación magnética constante por 24 h a 25-30°C. Posteriormente, la muestra contenida en el vaso de precipitado fue centrifugada a 10,000 rpm/ 10 min / 4°C en un equipo Thermo Scientific (Multifuge X3R Centrifuge, EE.UU.), el líquido sobrenadante fue conservado y el precipitado descartado. Se añadió n-butanol en cantidades iguales de volumen del líquido sobrenadante (800 mL), manteniéndose en agitación magnética constante por 24 h a 25-30°C. Posteriormente, la muestra se dejó reposar por 24 h para obtener una separación de fases. Se procedió a decantar la muestra para separar la fase acuosa de la fase butanólica, evaporando la última a través de baño maría a 100°C (Thermolyne Cimarec 3, Reino Unido). Finalmente, el extracto fue liofilizado en Labconco Benchio FreeZone (7750030, EE.UU.). El extracto con saponinas obtenido del tallo de *Yucca baccata* fue pesado en una balanza Ohaus (Adventurer ARA520, EE.UU.) y transferido a un frasco de vidrio ámbar, etiquetado y almacenado a temperatura ambiente para su posterior análisis.

5.1.3. Cuantificación de Saponinas en el Extracto de *Yucca baccata*

Para cuantificar las saponinas presentes en el extracto del tallo de *Yucca baccata* se siguió la técnica de espectrofotométrica planteada por Baccou *et al.*, (1977). Se pesaron por separado 2 mg del extracto con saponinas y 2 mg del estándar de diosgenina al 93%, cada uno se colocaron en un matraz de 10 mL y se aforaron con metanol de alta pureza. Con la solución de diosgenina se realizaron diluciones en tubos de ensayo de 15 mL en concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 4). Para la mezcla de reacción se preparó una solución de p-anisaldehído al 0.5% (v/v) en metanol y otra solución de ácido sulfúrico al 50% (v/v) con agua destilada. Se agregó 1 mL de cada solución a cada una de las diluciones con diosgenina ya preparadas y a la muestra que contenía el extracto con saponinas. La muestra blanco consistió en agregar 1 mL de la solución de p-anisaldehído, 1 mL de la solución de ácido sulfúrico y 2 mL de metanol en un tubo de ensayo de 15 mL. Todas las soluciones se homogenizaron en un vortex VWR (58816-123, EE.UU) por un minuto y calentaron en un baño de agua a 100°C en placa (Thermolyne Cimarec 3, Reino Unido). Posteriormente pasaron a un baño de agua con hielo en el que permanecieron por 15 min para detener la reacción.

Las muestras se analizaron por triplicado y fueron evaluadas en un espectrofotómetro UV Thermo Scientific (Genesys 10uv scanning, EE.UU) programado a una longitud de onda de 430 nm de absorbancia usando celdas de cuarzo de 1 cm^3 . Las lecturas obtenidas se utilizaron para crear una curva de calibración que nos brindó la concentración de saponinas presentes en el extracto de tallo de *Yucca baccata*. La curva presentó un coeficiente de correlación R^2 de 0.9981 (Fig. 5). Además, la concentración de saponinas se calculó mediante la ecuación resultante de la misma (Ecuación 1).

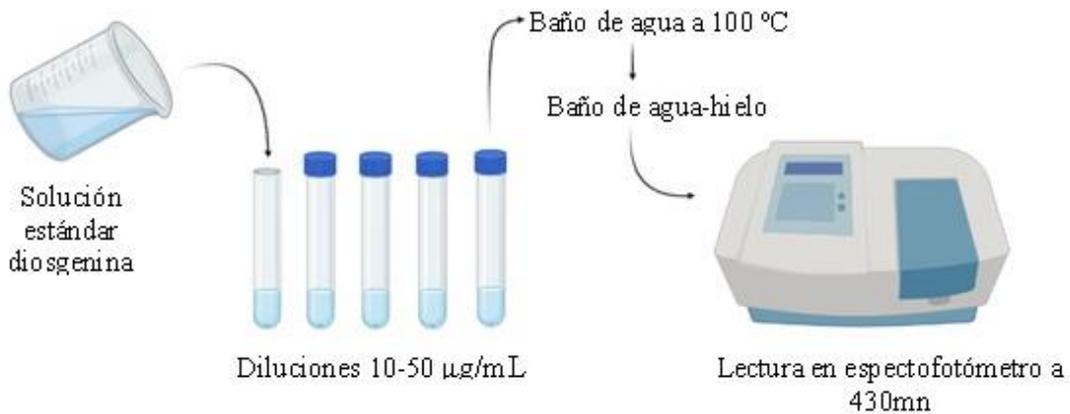


Figura 4. Esquema general de la cuantificación de saponinas del tallo de *Yucca baccata*

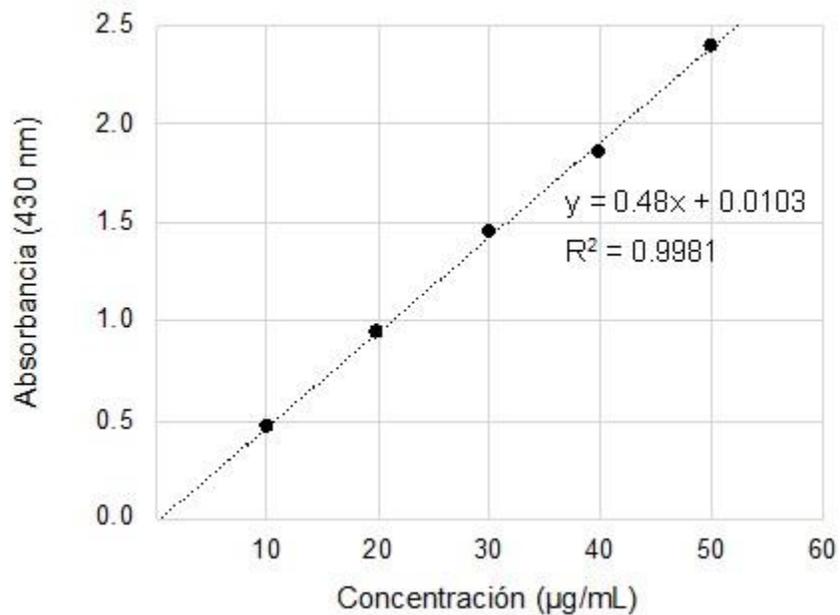


Figura 5. Curva estándar de diosgenina 93% utilizada para la cuantificación de saponinas esteroidales en el extracto del tallo de *Yucca baccata*.

$$[\text{Concentración de saponinas}] = Y = \frac{(\text{Abs } 430 - 0.01)}{0.48} \quad (1)$$

Dónde: Y es igual a la concentración de saponinas, X es el resultado de la lectura a una absorbancia de 430 nm, A y B son las constantes dadas por la ecuación de la recta.

5.2. Elaboración de Micropartículas Compuestas

5.2.1. Preparación de las Soluciones con Quitosano y Extracto con Saponinas

Para iniciar la elaboración de micropartículas compuestas se prepararon dos soluciones; la primera, la cual fue utilizada como control contenía quitosano al 2.0% (p/v) en un volumen de 200 mL de ácido acético (0.02 M); y la segunda solución fue de quitosano al 2% (p/v) en 100 mL de ácido acético (0.02 M) y 100 mL de extracto con saponinas (1.5% p/v) en agua bidestilada. Para la segunda solución, se requirió calentar el agua bidestilada y el extracto con saponinas a 50°C durante 1 h, y se centrifugó a 6000 rpm /15 min para asegurar que los componentes de la mezcla se disolvieran completamente. Una vez realizadas ambas soluciones se procedió con la elaboración de las micropartículas.

5.2.2. Elaboración de Micropartículas Compuestas

Las micropartículas de quitosano y las compuestas con quitosano y extracto con saponinas fueron elaboradas usando el método de goteo controlado y baño recirculado. En la Fig. 5 se muestra un esquema del sistema usado, que consistió en una bomba peristáltica (Easy-load master flex I/P, EE.UU.) que recirculaba la solución de tripolifosfato de sodio al 2.0% (TPP); una bomba para jeringa (Razel R99-EJ, EE.UU.) que controlaba la presión de eyección de la solución; y una bomba de vacío que proporcionó la presión de aire para controlar el tamaño y forma de las micropartículas. Una vez elaboradas, las micropartículas se dejaron reposar en una solución de TPP por 30 min para terminar de generar la gelificación iónica. Las micropartículas fueron recuperadas mediante lavados con agua bidestilada hasta llegar a un pH neutro (≈ 7). Posteriormente se guardaron en agua Milli-Q a una temperatura de 4°C.



Figura 6. Sistema de elaboración de micropartículas.

5.2.3. Caracterización de las Micropartículas Compuestas

Se utilizó un microscopio óptico de luz invertida (AmScope XSB-1^a, China) con el objetivo 4 X, el microscopio estuvo acoplado a una computadora con el programa toupView 3.7. Se analizó la morfología, se midió el diámetro horizontal de las micropartículas en μm y se tomaron fotografías para su análisis. El análisis de las características fisicoquímicas se realizó con un microscopio electrónico de barrido (JSM 5410 LV Scanning Microscope, Japón) en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, anteriormente la muestra había sido congelada en un Torrey (VRF-24-1DS 1022208, México) y liofilizada en Labconco Benchio FreeZone (7750030, EE.UU) con el propósito de mantener la menor humedad posible en las micropartículas. Se realizó un análisis con electroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) (Nicolet iS50 FT-IR Thermo scientific, EE.UU) para detectar la frecuencia de resonancia de las moléculas presentes tanto en las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata*, como ambos componentes de forma individual. Se observaron las vibraciones del extracto con saponinas, las cuales fueron comparadas con diosgenina (saponina

esteroidal de referencia) así como los enlaces característicos del quitosano. También se usó un espectrofotómetro de UV-visible Thermo Scientific (Genesys 10uv scanning, EE.UU.) para realizar el análisis de inmovilización, y para ello se pesó 1g de micropartículas compuestas suspendidas en agua bidestilada, a las cuales se les realizaron lecturas en UV- visible por 30 h posteriores a su realización, los datos obtenidos se utilizaron para cuantificar la cantidad del extracto en las micropartículas compuestas. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 280 nm de absorbancia usando celdas de cuarzo de 1 cm³. Como base para conocer esta información se utilizó una curva de calibración de UV-visible (Fig.7) realizada previamente en el grupo de trabajo para la medición de la eficiencia de asociación (Acuña-Gallardo, 2019).

$$[\text{Concentración de extracto con saponinas perdido}] = Y = 0.022 (\text{Abs } 280) + 0.005 \quad (2)$$

Dónde: Y es igual a la concentración de extracto con saponinas perdido en las micropartículas, X es el resultado de la lectura a una absorbancia de 280 nm, A y B son las constantes dadas por la ecuación de la recta.

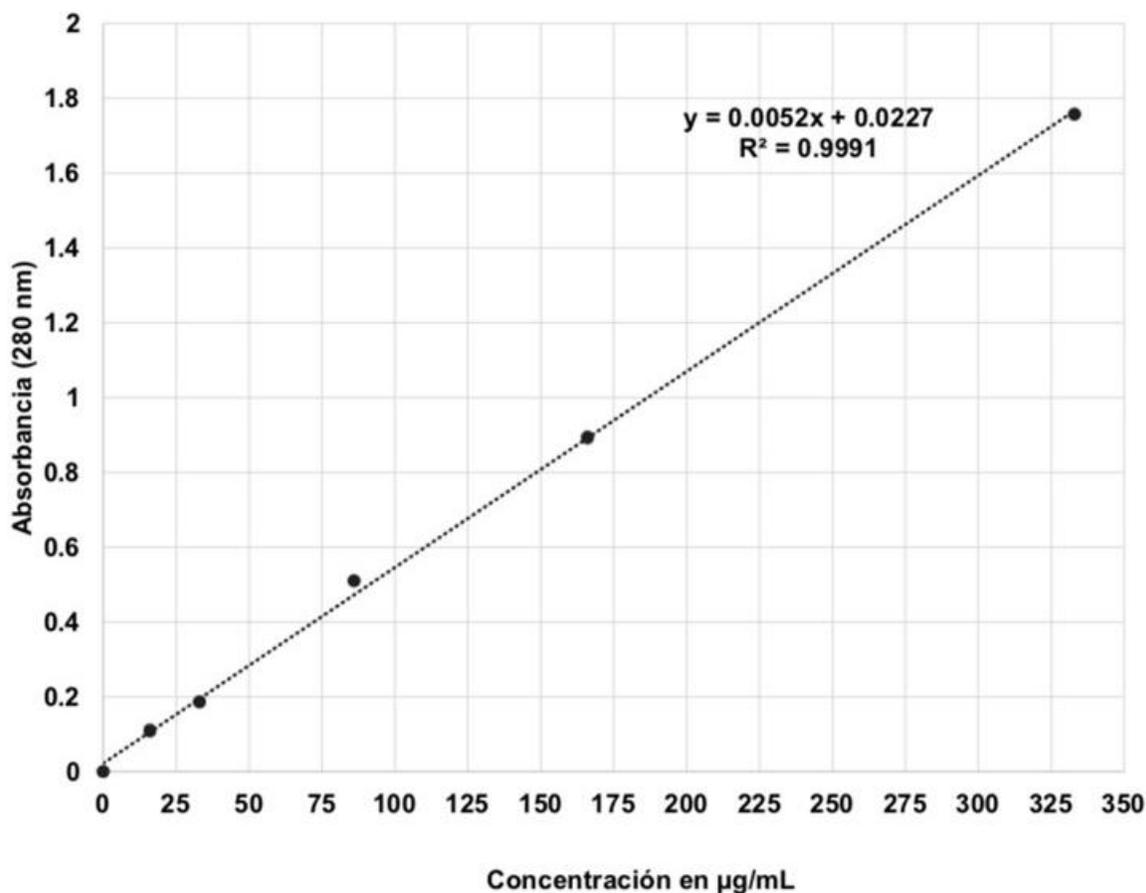


Figura 7. Curva de calibración UV-visible para la medición de la eficiencia de asociación y liberación del extracto con saponinas de las micropartículas compuestas.

$$[\text{Eficiencia de asociación}] = \frac{\text{Total del extracto con saponinas} - \text{perdida del extracto con saponinas}}{\text{Total del extracto con saponinas}} \times 100 \quad (3)$$

5.3. Evaluación Antibacteriana “in vitro”

Para el análisis microbiológico se utilizaron las cepas ATCC de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* 14028, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Listeria monocytogenes* 7644, facilitadas por el Laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Las cepas fueron reactivadas tomando un inóculo de cada placa que las contenía, colocándose en tubos de 5.0 mL con caldo Muller Hinton (MH), se agitaron y

dejaron en incubación (Thermo Scientific Heratherm 66L, EE.UU.) a 37°C por 24 h. Posteriormente, se tomó un inóculo de cada tubo con un asa estéril, se sembró en agar MH y se incubó a 37°C por 24 h. Los inóculos de cada una de las cepas bacterianas fueron ajustados usando la escala de Mc Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Las bacterias fueron aisladas a partir de la técnica de siembra en estría por agotamiento y se utilizaron en las pruebas antibacterianas inmediatamente después de su incubación.

5.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las micropartículas de quitosano y las compuestas por el método de dilución en caldo. Se utilizaron tubos estériles con 5 mL de caldo de cultivo MH inoculados con las cepas mencionadas y ajustadas usando la escala de Mc Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Se les añadió de manera separada, las micropartículas de quitosano y las compuestas con quitosano y extracto con saponinas en distintas concentraciones masa/volumen (0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 g/mL). Se incubaron durante 24 h a 37 °C. Se analizaron signos visibles de crecimiento o turbidez en los tubos, y la concentración más baja de micropartículas que inhibía el crecimiento de bacterias se consideró como la CMI (Qi *et al.*, 2004; Velázquez *et al.*, 2007).

Posteriormente, se determinó la concentración mínima bactericida (CMB); y para ello se sumergió un asa estéril en cada tubo que mostrara algún grado de inhibición por parte de las micropartículas, para así sembrar por estriado en caja Petri con agar MH e incubar cada placa por 24 h a 37 °C. Con el criterio de valoración para CMB, se identificó la mínima concentración de micropartículas compuestas que se asociaban con el 99% de la mortandad de la población bacteriana (Parvekar *et al.*, 2020). En ambas pruebas microbiológicas, se utilizó kanamicina (1mg/mL) como control positivo; el caldo MH inoculado con cada cepa bacteriana como control negativo; y caldo MH con micropartículas como control de no contaminación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5.3.2. Cinética de Crecimiento

Se analizó la cinética de crecimiento bacteriano de cada una de las cepas estudiadas con el fin de evaluar los cambios en su crecimiento en contacto con las micropartículas. Para ello, a tubos estériles con 5.0 mL de caldo de cultivo MH inoculados con las cepas bacterianas, a concentraciones ajustadas con la escala de Mc Farland 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL), se les añadió micropartículas compuestas de quitosano con extracto con saponinas en las siguientes concentraciones: 0.4g/mL para *E. coli* O157:H7, *S. typhi*, *S. aureus* y 0.5g/mL para *L. monocytogenes*, las cuales se consideraron en base a las CMB estimadas. Los tubos se incubaron a 37° C durante 24 h, y de los cuales se realizaron diluciones seriadas a 0, 2, 4, 8, 16 y 24 h. y estas diluciones se realizaron en base a 1:50 con caldo MH y se sembraron en placas de Petri con agar MH (Sette-de-Souza *et al.*, 2020; Ramirez y Marin, 2009). El número de UFC/mL se determinó utilizando un contador de colonias bacterianas después de 24 horas de incubación. Se utilizó solo caldo MH sin inóculo y caldo MH con el inóculo de cada bacteria (1.5×10^8 UFC/mL) como control negativo y positivo respectivamente. En cada ensayo se incluyeron controles y se llevaron a cabo por triplicado.

5.4. Análisis Estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de los datos de caracterización de micropartículas (media, desviación estándar). La prueba T-student se usó para comparar el tamaño (diámetro) entre las micropartículas de quitosano y aquellas compuestas con quitosano y extracto con saponinas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para la comparación entre medias de las pruebas antibacterianas. La diferencia significativa fue establecida a un nivel de $P < 0.05$ y los análisis de datos fueron llevados a cabo con el programa estadístico STATA 12.0, versión 2012.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracto con Saponinas de *Yucca baccata*

6.1.1. Rendimiento de Extracción

Un proceso de extracción butanólica fue aplicado a 137.1 g de polvo de *Yucca baccata* y se obtuvo 5.29 g de un polvo fino con coloración café-amarillo (extracto con saponinas, representando un rendimiento de 3.85%). Anteriormente se han reportado valores de rendimiento similares a los obtenidos. Flores y colaboradores (2013), realizaron dos metodologías de maceración para la extracción butanólica de saponinas provenientes de *Melissa officinalis* “Toronjil”, la primera consistió en emplear un pretratamiento (desengrasar la muestra) y la segunda sin realizar pretratamiento. Se reportaron rendimientos del 3.90% y 2.40%, respectivamente. Así mismo, Marruffo en 2019, realizó una extracción butanólica de saponinas provenientes de hojas de *Baccharis Emarginata* obteniendo un rendimiento del 2.84%. Ese mismo año, en el grupo de trabajo, Acuña-Gallardo obtuvo un rendimiento del 4.19% al obtener extracto con saponinas del tallo de la planta *Yucca baccata* utilizando butanol como solvente de extracción. Respecto a la variación en estos rendimientos de extracción ya se ha reportado que el porcentaje de rendimiento y eficiencia del proceso dependen de varios factores como la recolección de la muestra (método de recolección, temporada, parte de la planta por extraer), el solvente de extracción a usar, las condiciones al momento de la extracción (temperatura, pH, proporción de solvente) y el tamaño de partícula del polvo con el que se inicia la extracción (Majinda, 2012).

De igual forma se han realizado distintos métodos para la extracción de saponinas. Rodríguez en 2016, usó tres métodos para obtener saponinas a partir de *Furcraea hexapetala*, obteniendo mejor eficiencia y mayor concentración de saponinas con el método de maceración (18.89%) en comparación con la extracción de saponinas a través de jugo de las hojas (15.30%) y Soxhlet (6.30%). También se han probado diversos solventes para la extracción de saponinas, siendo los más usados los alcoholes de bajo peso molecular, como el metanol, etanol, butanol, y especialmente

la mezclas de estos en diferentes proporciones; esto debido a la naturaleza polar que poseen las saponinas, ya que por su carácter glicosídico, son insolubles en solventes apolares (Hernández *et al.*, 2005). También, se ha reportado que el realizar un pretratamiento a la muestra aumenta su eficiencia de extracción, esto incluye el secado del tallo de la planta, la reducción del tamaño de partícula del polvo del tallo y el desengrasado de la muestra con algún solvente lipofílico (Majinda, 2012).

6.1.2. Cuantificación de Saponinas

Se realizó un análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), importante para la identificación de los grupos funcionales, y corroborar que las saponinas extraídas del tallo de *Yucca baccata* son de tipo esteroidal. Se utilizó un estándar de diosgenina (93% de pureza) y tal como se observa en la Fig. 8, sus espectros resultaron similares entre ambos tipos de saponinas y semejantes a los que han reportado otras investigaciones (Quillay *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2018; Acuña-Gallardo, 2019.) presentando vibraciones características de las saponinas esteroidales. Se observó una vibración de hidroxilo (O-H) aproximadamente a 3500 cm^{-1} ; una vibración correspondiente a los enlaces C-H a 2916 cm^{-1} ; un pico de vibración del grupo carbonilo (C=O) a 1717 cm^{-1} ; los enlaces C-O-C a 1076 cm^{-1} ; y el enlace C-H a 900 cm^{-1} . Además, la ausencia de absorción entre $\sim 2500\text{ cm}^{-1}$ y 1900 cm^{-1} nos indicó que no hubo acumulación de dobles y triples enlaces en nuestro extracto con saponinas.

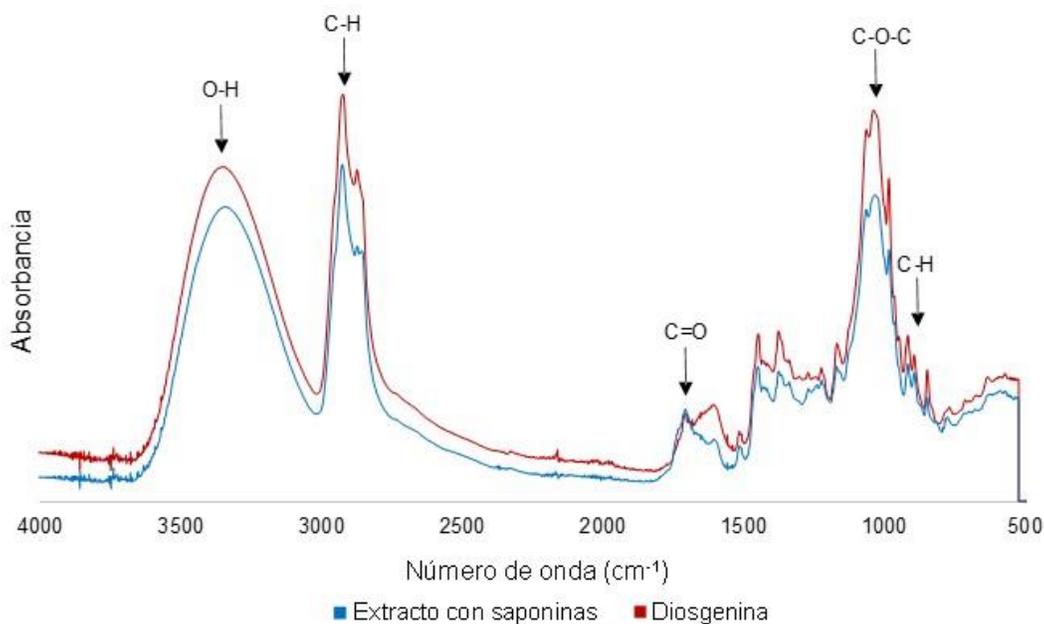


Figura 8. Espectro FTIR del Extracto con saponinas de *Yucca baccata* (azul) y Sigma diosgenina 93% de pureza como referencia estándar (rojo).

La concentración de saponinas fue de 44.79 μg de saponinas (equivalentes de diosgenina) por cada 200 μg de extracto butanólico, lo que representó una concentración de saponinas de 24.22% p/p del tallo de la planta de *Yucca baccata*. Otros autores, como León-Trujillo en 2012, estimó una concentración aproximada del 13.82% p/p, obteniendo 27.64 μg de saponinas por cada 200 μg de extracto butanólico; Pereo-Vega en 2015 reportó 47.78 μg de saponinas por cada 200 μg de extracto butanólico, con una concentración aproximada de 23.9% p/p; y Acuña-Gallardo en 2019 obtuvo 31.40 μg de saponinas por cada 200 μg de extracto butanólico, con una concentración de 21.96% p/p del extracto de la planta de *Yucca baccata*. La concentración de saponinas provenientes de plantas depende de los factores ya antes descritos en rendimiento de extracción (Alcázar, 2016).

6.1.3. Tamaño de Micropartículas

Las micropartículas presentaron tamaños ligeramente variados, con un diámetro promedio para las micropartículas de quitosano de $265.59 \pm 96.30 \mu\text{m}$ y para las micropartículas compuestas de $271.80 \pm 91.86 \mu\text{m}$. No se observó diferencia significativa entre ambas medias, lo que significó que el inmovilizar a las saponinas en las micropartículas no generó cambios en su tamaño ($P < 0.05$). En la Fig. 9 se presenta la distribución en porcentaje del tamaño de las micropartículas por rangos de diámetro, y se puede observar que la mayor proporción de micropartículas de quitosano (33.5%) y aquellas compuestas (43.1%) se encuentran en un rango de diámetro que va de 100-149 μm . Trabajos previos han reportado micropartículas de quitosano y micropartículas compuestas con diámetros de $453.74 \pm 150.43 \mu\text{m}$ y $408.89 \pm 156.36 \mu\text{m}$, respectivamente. Esta diferencia pudiera deberse a la técnica de gelificación o condiciones de elaboración de las micropartículas ya que tienen relación con el control de tamaño de las partículas (Acuña-Gallardo 2019; Lengyel, *et al.*, 2019; Goycoolea *et al.*, 2018).

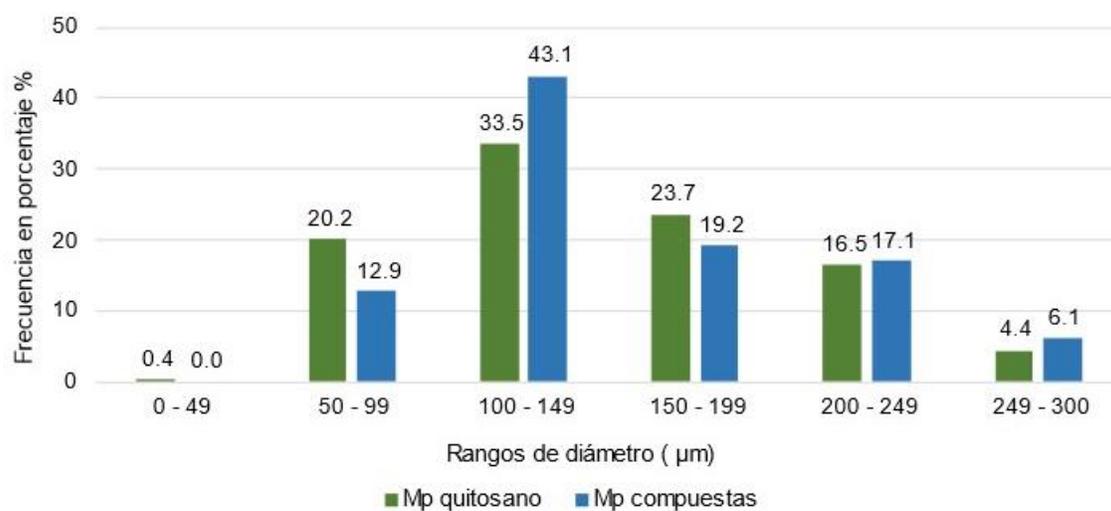


Figura 9. Distribución de tamaños promedios de Micropartículas de quitosano y Micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas.

De acuerdo a Detsi *et al.*, (2020) la gelificación iónica es un método adecuado para la formación de partículas estables; sin embargo, usualmente genera partículas de gran tamaño comparado con otros métodos, además que presenta sensibilidad al pH y alta polidispersidad. En 2016, Samrot y colaboradores, elaboraron partículas de quitosano por la técnica de gelificación ionotrópica y goteo controlado, y obtuvieron micropartículas semiesféricas de tamaños variados (50 a 300 nm). Finalmente, ellos concluyeron que sus micropartículas presentaron tamaños más grandes cuando se encapsulaba algún compuesto en su matriz polimérica. Respecto a la variación en el tamaño de las micropartículas, se ha observado que existen diferentes factores que pueden contribuir a esto, como la relación de concentración entre el quitosano y el TPP, el sistema de elaboración de las mismas, la técnica de gelificación realizada, y el material a encapsular (Yu *et al.*, 2013).

6.1.4. Morfología de las Micropartículas

En los resultados obtenidos para análisis de superficie por microscopía óptica de luz invertida, se observó que las micropartículas son semiesféricas como se muestran en la Figura 10. Algunas de ellas mostraban daño e irregularidades en su superficie, como lo muestran las flechas en las imágenes, y esto pudiera ser atribuido al tiempo de reposo insuficiente (< 30 minutos) del baño de TPP en el que se presentaban sumergidas las micropartículas, lo que podría haber impedido su gelificación completa antes de someterse a movimientos que posiblemente causaron daño en su morfología (Acuña-Gallardo, 2019). Además, anteriormente (2016), Samrot y colaboradores, observaron que la concentración de la solución utilizada para el baño de gelificación, la concentración del baño de TPP y el pH son fundamentales para elaborar micropartículas de forma homogénea, por lo que son cuestiones a considerar al momento de realizar micropartículas.

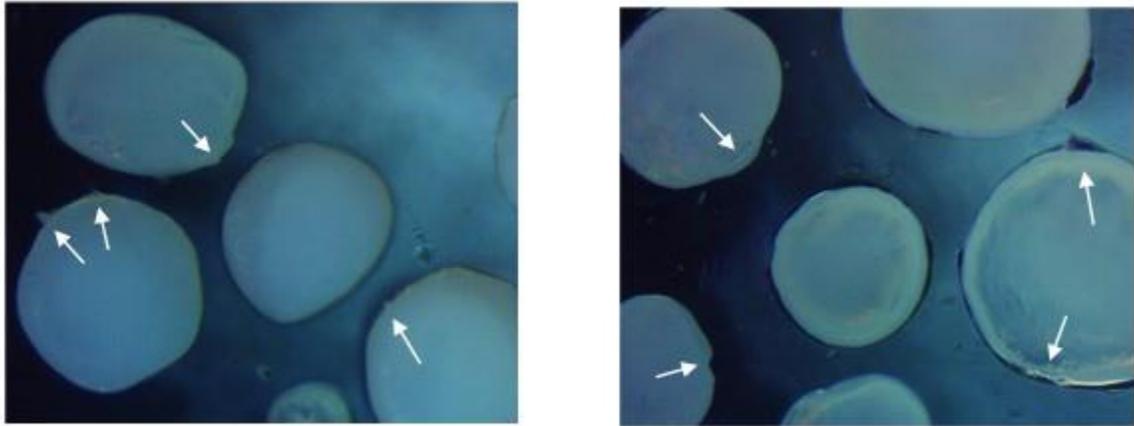


Figura 10. Imágenes de microscopía con objetivo 4x de las micropartículas de quitosano (A) y compuestas (B) realizadas mediante gelificación iónica.

También la observación por microscopía electrónica de barrido (objetivos 35X y 500X), mostró que en su mayoría, ambos tipos de micropartículas (Fig. 11), presentaban estructuras completas, pero con superficies rugosas; y no todas las micropartículas presentaron forma semiesférica ya que algunas presentaron deformaciones en su estructura, probablemente como resultado de la liofilización previa a su análisis microscópico. También se observaron diámetros mucho más pequeños para las micropartículas de quitosano que aquellos en las micropartículas compuestas.

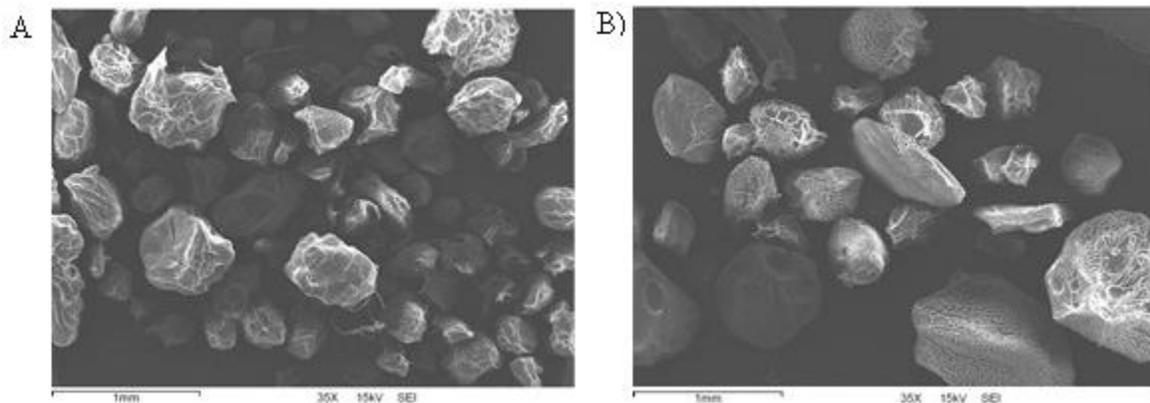


Figura 11. Micrografía de las Micropartículas liofilizadas de quitosano (A) y compuestas (B) utilizando aumento de 35X por microscopía electrónica de barrido.

Por otro lado, las micrografías a 500X (Fig. 12), nos permitieron observar paredes más lisas para

las micropartículas de quitosano (A) en comparación con las micropartículas compuestas (B), las cuales presentaron una pared más rugosa y con daños aparentes, como se indica con las flechas en las imágenes; este suceso ya ha sido reportado en trabajos anteriores, probablemente por cambios que sufre la matriz polimérica cuando se encapsula algún componente (Samrot et al., 2016).

Los daños evidentes mostrados por la microscopía electrónica de barrido pudieron ser debido al proceso de liofilización por el cuál pasaron las micropartículas, ya que la microscopía óptica de luz invertida, mostró menores irregularidades en las micropartículas comparadas con aquellas después del proceso de liofilización. Es importante aclarar, que las micropartículas utilizadas en las pruebas antibacterianas fueron micropartículas semiesféricas sin daño aparente, porque se utilizaron después de su gelificación iónica en el baño de TPP en un pH neutro, sin ser sometidas al proceso de liofilización.

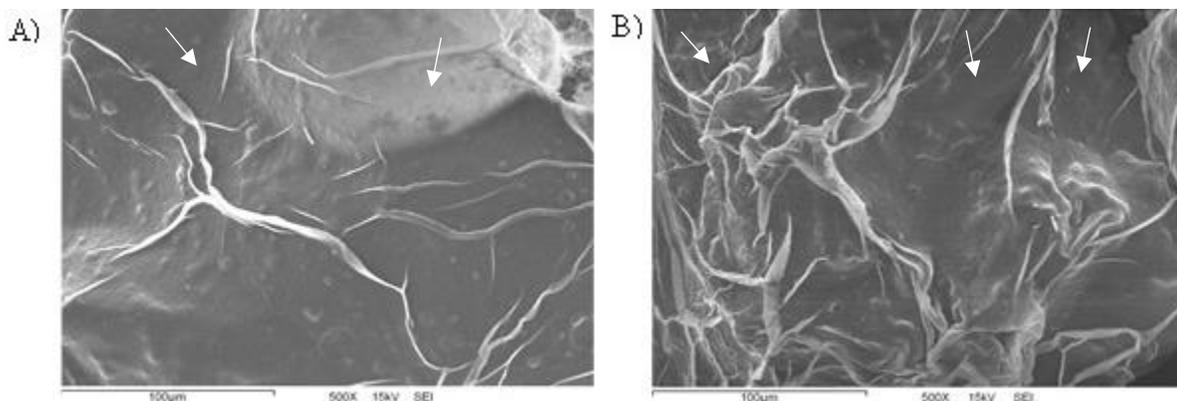


Figura 12. Micrografía de las Micropartículas liofilizadas de quitosano (A) y compuestas (B) utilizando aumento de 500X por microscopía electrónica de barrido.

6.1.5. Eficiencia de Asociación

Se determinó una eficiencia de asociación del 86.70%, y esto indicó que se presentó una pérdida del extracto con saponinas durante la elaboración de las micropartículas alrededor del 13.30%. Los resultados de la estabilidad de las micropartículas compuestas se encuentran en la figura 13, en donde se puede observar la pérdida del extracto con saponinas por 30 h. Las micropartículas presentaron cierta estabilidad, después de 12 h. cuando se liberó la mayor concentración del

extracto con saponinas, particularmente en las primeras 8 h. Además, se presentó una pérdida máxima del extracto con saponinas de $133.30 \pm 2.29 \mu\text{g}$, que representó el 8.88% de la carga inicial.

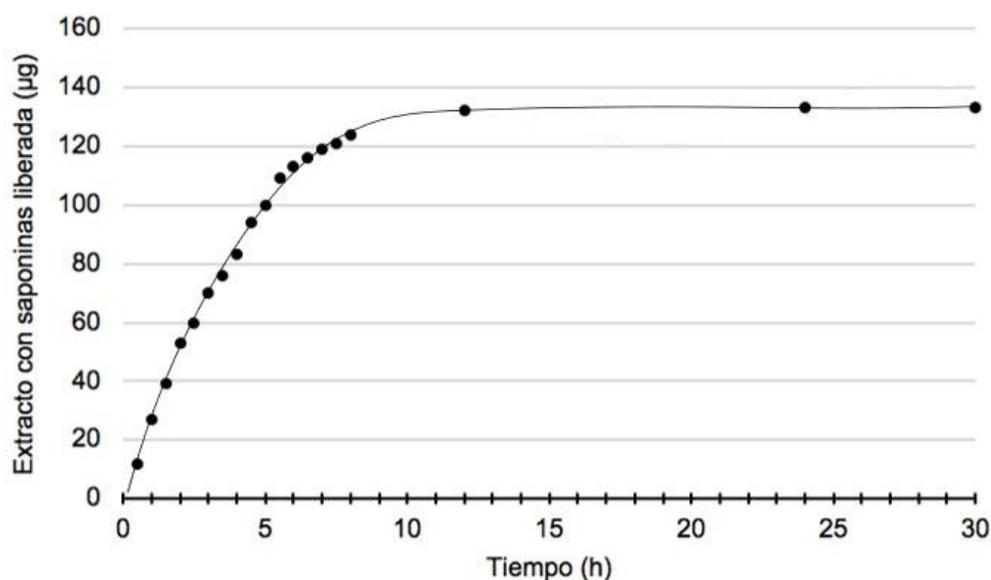


Figura 13. Cuantificación de la pérdida del extracto con saponinas de las micropartículas compuestas.

Con anterioridad, en nuestro grupo de trabajo se realizaron micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas las cuales presentaron una eficacia de asociación del 83.37%, y una pérdida máxima del extracto con saponinas de $149.27 \pm 2.76 \mu\text{g}$. (equivalente a menos del 10% de la carga inicial) la cual fue mayor a la de este trabajo, y esto pudiera atribuirse a que las micropartículas realizadas por Acuña-Gallardo (2019) presentaron un diámetro promedio mayor ($408.89 \pm 156.36 \mu\text{m}$) comparadas con las realizadas en este trabajo ($271.80 \pm 91.86 \mu\text{m}$), lo que consideramos puede ser una determinante para la diferencia en la eficacia de asociación. Similarmente, en 2016, Caetano y colaboradores realizaron micropartículas de quitosano cargadas con el bacilo de Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis*), en lotes de tamaños que iban de los $21.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$ a los $39.3 \pm 3.9 \mu\text{m}$, y observaron que, entre menor era el tamaño de las micropartículas, mayor era la eficacia de asociación (83% y 74%, respectivamente). También, Batista y colaboradores (2021) elaboraron micropartículas de quitosano cargadas de péptidos, y en sus resultados obtuvieron una eficacia de asociación del 86.1%, un valor similar a lo obtenido en este estudio.

De igual forma se realizó un análisis de Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), para corroborar la existencia de interacción de los componentes de las micropartículas. Para ello se evaluaron muestras de quitosano, de extracto con saponinas y de las micropartículas constituidas por ambos componentes tal como se observa en la Figura 14. El espectro de las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas mostó bandas características de ambos componentes de la misma. Se observó una vibración de hidroxilo (O-H) a aproximadamente 3500 cm^{-1} ; una vibración correspondiente a los enlaces C-H a 2916 cm^{-1} ; el grupo N-H₂ cercano a 1600 cm^{-1} ; vibración del grupo Amida II a 1465 cm^{-1} ; y los enlaces C-O-C a 1076 cm^{-1} . Se presentó un pico de vibración cercana a los 900 cm^{-1} conocido como enlace P-O-P y característico del TPP, el cual fue utilizado para la elaboración de las micropartículas; Además, se observó una vibración a 1215 cm^{-1} , relacionada con los grupos P-O de los iones del TPP, el cual demuestra una interacción entre las micropartículas y el TPP (Silvestro *et al.*, 2020; Ferreira-Tomaz A *et al.*, 2018; Loutfy *et al.*, 2016).

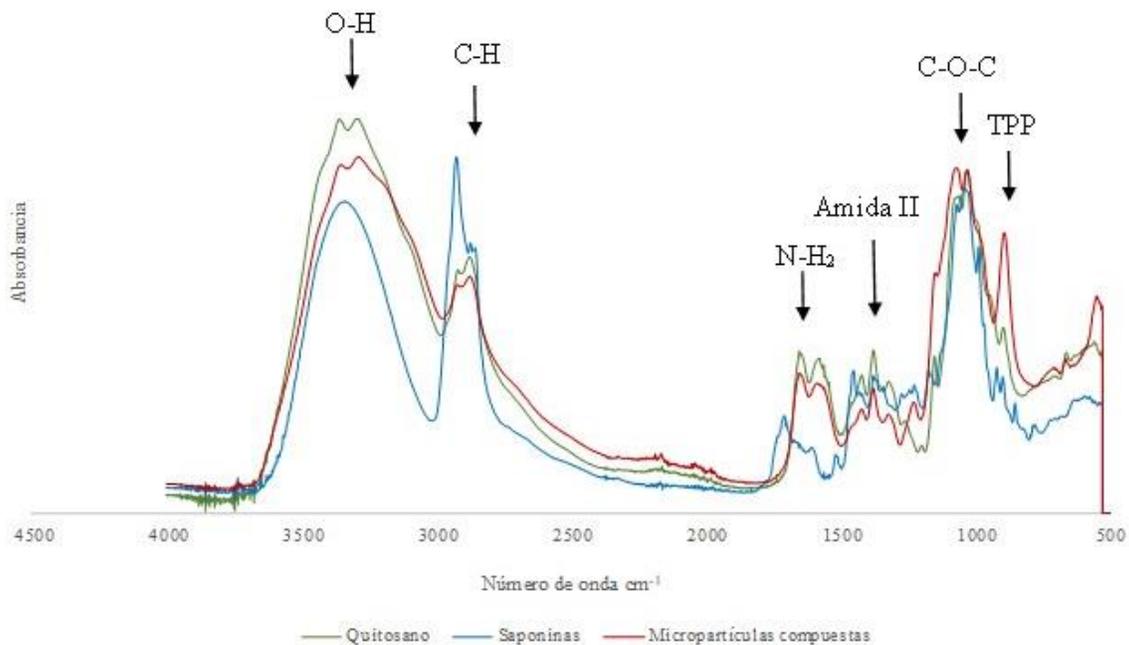


Figura 14. Espectro FTIR de las muestras de quitosano, extracto con saponinas y micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas.

6.2. Actividad Antibacteriana de Micropartículas

6.2.1. Concentraciones Mínima Inhibitoria (CMI) y Mínima Bactericida (CMB)

Los resultados de las pruebas antibacterianas se muestran en el Cuadro 3. Las bacterias analizadas mostraron inhibición y muerte celular cuando entraron en contacto con las micropartículas de quitosano y las compuestas con quitosano y extracto con saponinas. Sin embargo, en base a experimentos preliminares, fue posible ver que no todas las bacterias presentaban inhibición y muerte a la misma concentración de micropartículas agregadas.

La bacteria que presentó mayor sensibilidad a las micropartículas fue *S. typhi* (Gram negativa) con una CMI de 0.2 g/mL de micropartículas tanto de quitosano como micropartículas compuestas; y una CMB de 0.4 g/mL con las micropartículas de quitosano y 0.3g/mL con las micropartículas compuestas. Por el contrario, *L. monocytogenes* (Gram positiva) fue la bacteria que presentó mayor resistencia con una CMI de 0.4 g/mL con ambos tipos de micropartículas; una CMB de 0.6 g/mL, con las micropartículas de quitosano y de 0.5 g/mL con las micropartículas compuestas. Respecto a *S. aureus* (Gram positiva), se obtuvo una CMI de 0.3 g/mL con ambos tipos de micropartículas, y una CMB de 0.4 g/mL con las micropartículas compuestas, y 0.5 g/mL con micropartículas de quitosano. En estas tres cepas se necesitó una menor cantidad de micropartículas compuestas que micropartículas de quitosano para generar la muerte de las bacterias, concluyendo que el extracto con saponinas potencializa la actividad antibacteriana de las micropartículas. Sin embargo, para *E. coli* (Gram negativa) no se presentó diferencia alguna al inmovilizar el extracto con saponinas ya que se obtuvo una CMI de 0.3 g/mL y una CMB de 0.4 g/mL con ambos tipos de micropartículas.

Cuadro 3. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida.

Bacterias	CMI		CMB	
	Mp quitosano g/mL	Mp compuestas* g/mL	Mp quitosano g/mL	Mp compuestas* g/mL
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	0.2 ^a	0.2 ^a	0.4 ^c	0.3 ^b
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0.3 ^b	0.3 ^b	0.4 ^c	0.4 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.3 ^b	0.3 ^b	0.5 ^d	0.4 ^c
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	0.5 ^d	0.4 ^c	0.6 ^e	0.5 ^d

Diferentes literales indican diferencias entre los grupos (P<0.05). ATCC: American Type Culture Collection. * Micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata*.

Previamente, Acuña-Gallardo en 2019, usó micropartículas de quitosano y compuestas con quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata* ante las cepas ATCC *L. monocytogenes* 7644, *S. typhi* 14028 y *E. coli* 25922, reportando resultados similares en el caso de las últimas dos bacterias. La autora observó un porcentaje de inhibición del 99% al añadir 2g/5mL usando ambos tipos de micropartículas contra *E. coli*, mientras que *S. typhi* presentaba un porcentaje de inhibición del 99% al agregar 2g/5mL de micropartículas de quitosano y 1.5g/5mL de micropartículas compuestas. Sin embargo, para *L. monocytogenes*, solo observó una inhibición máxima de 56.25% con las micropartículas compuestas.

Existen estudios previos en donde se evaluó el quitosano o los extractos con saponinas de manera independiente provenientes de diversas plantas frente a las mismas cepas utilizadas en nuestro trabajo. En 2013, Mahdy y colaboradores evaluaron un quitosano (10 mg/mL) sintetizado por microondas contra *S. typhi* ATCC 14028 y *E. coli* ATCC 25922, observándose inhibiciones de crecimiento de 0.8% a 0.5% (p/v) y 1.0% a 0.5% (p/v) respectivamente, pero; con mayor inhibición para *E. coli*.

Sewlikar y D'Souza (2017) determinaron los efectos antibacterianos del extracto con saponinas de

Quillaja contra *E. coli* O157: H7 mediante la prueba de microdilución. La cepa inició con un crecimiento de 7.5 log UFC y después de 16 horas de incubación, se redujo a 6.79 y 3.5 log UFC. De igual forma, Reyna-Murrieta en 2021, evaluó el extracto butanólico con saponinas de *Yucca baccata*, inhibiendo totalmente *E. coli* O157: H7 con 120 mg/mL del extracto. Por otro lado, Garrido-Maestu y colaboradores (2018), elaboraron nanopartículas de quitosano, las cuales inhibieron totalmente a *E. coli* O157:H7 a una concentración de 0.2%.

En 2021, Asemave, evaluó el extracto con saponinas de cáscara de cacahuates frente a dos cepas, *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 29953 usando también la prueba de difusión en placa. *S. aureus* presentó una mayor zona de inhibición (10.66 mm \pm 0.58) en comparación con *P. aeruginosa* (3.33 mm \pm 0.58) cuando fueron expuestas a 100 mg/mL del extracto. Así mismo, Zienkiewicz-Strzałka y colaboradores (2019), elaboraron nanopartículas de plata y quitosano, evaluando su actividad mediante la técnica de microdilución. Se estimó una CMI de 0.68 mg/L para *E. coli* ATCC 25922 y una CMI dos veces mayor (1.36 mg/L) para *S. aureus* ATCC 5923, lo cual sugirió que las bacterias gram positivas aparentemente eran más tolerantes a la presencia de partículas de quitosano.

Además, en 2022, Veltman y colaboradores, elaboraron nanopartículas de quitosano las cuales se unieron selectivamente a bacterias Gram negativas en comparación con las cepas Gram positivas, particularmente a *E. coli* y *Salmonella*. Esto explicaría el fenómeno observado en las bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) en este estudio, en el que, a pesar de ser bacterias que fueron inhibidas con micropartículas de quitosano, la incorporación del extracto con saponinas aparentemente potencializó su efecto antibacteriano produciendo su muerte a una menor concentración como puede observarse en el Cuadro 3 (Li y Zhuag, 2020; Kawakita *et al.*, 2019)

6.2.2. Cinética de Crecimiento

Los resultados de la cinética de crecimiento de cada cepa se muestran en la Figura 15, en donde se observa el crecimiento natural de cada bacteria como el control, y el crecimiento de la misma con la adición de las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata* para su análisis comparativo. Se realizó un seguimiento durante las primeras 24 horas de

incubación en el caso de *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhi*, y hasta las 48 horas en el caso de *L. monocytogenes* para su confirmación.

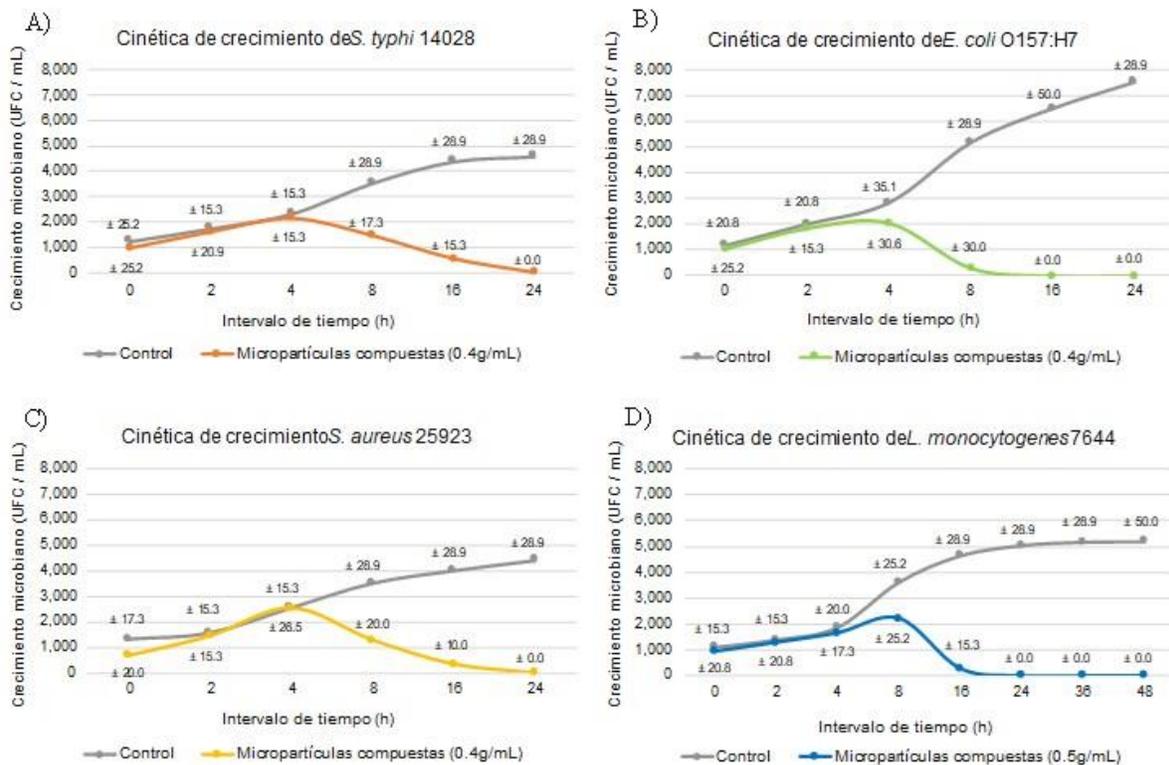


Figura 15. Cinética de crecimiento de cada bacteria en contacto con las micropartículas compuestas* A) *S. typhi* ATCC 14028 y en contacto con 0.4g/mL de micropartículas compuestas. B) *E. coli* O157:H7 y en contacto con 0.4g/mL de micropartículas compuestas. C) *S. aureus* ATCC 25923 y en contacto con 0.4g/mL de micropartículas compuestas. D) *L. monocytogenes* ATCC 7644 y en contacto con 0.5g/mL de micropartículas compuestas. ± DS
*Micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata*.

Como se puede observar, en *S. typhi* las micropartículas compuestas generaron una reducción bacteriana a partir de las 4 horas, interrumpiendo la fase de crecimiento exponencial, evitando el inicio de la fase estacionaria de la cepa produciendo su muerte a las 24 horas. Respecto a *E. coli*, se muestra que las micropartículas compuestas redujeron su actividad considerablemente entre las 4-8 horas, y a partir de las 16 horas hay una reducción total de sus UFC. Por otro lado, *S. aureus* desde un inicio (hora 0) ya exhibía una menor cantidad de colonias al contacto con las micropartículas compuestas, y una reducción considerable a las 16 horas, y muerte total a las 24

horas. Respecto a *L. monocytogenes*, se puede observar una caída de la curva a partir de las 8 horas, generando muerte total a partir de las 24 horas, con confirmación de ausencia de colonias a las 36 y 48 horas.

Estudios previos han investigado el comportamiento natural de las cepas bacterianas y su comportamiento en presencia de quitosano y los extractos con saponinas de manera independiente. En 2020, Dev y colaboradores evaluaron la eficacia antimicrobiana de las emulsiones de ácido pelargónico elaboradas con saponinas de *Quillaja* en el papel de surfactantes frente a *S. typhi* ATCC 14028, y observaron que la cepa redujo su actividad (de 11 Log CFU/mL a 6 Log CFU/mL). Sin embargo, no se observó inhibición total. En los resultados que mostramos el quitosano y el extracto con saponinas en combinación, inhibieron por completo a *S. typhi* después de las 24 horas de incubación.

Rhim y colaboradores (2006) elaboraron nanopartículas a base de quitosano, las cuales fueron evaluadas frente a *E. coli* O157:H7. Se realizó una prueba de cinética de crecimiento para observar el desarrollo de la bacteria por 10 horas. A partir de las 6 horas, se observó una inhibición total de la misma con la incorporación de nanopartículas de plata, pero cuando se añadió quitosano puro, no se observó reducción (Log 10³ UFC/mL). En 2015, Xue y colaboradores, elaboraron dos tipos de nanopartículas las primeras con altas (1 % p/v de aceite de tomillo con 4% p/v de NaCas y 0.5 % p/v de lecitina) y las segundas con bajas (1 % p/v de aceite de tomillo con 2% p/v de NaCas y 0.25 % p/v de lecitina.) concentraciones de emulsificante a base de quitosano, las cuales fueron evaluadas frente a *E. coli* O157:H7. Ellos observaron una reducción significativa de la población viable total de *E. coli* a partir de las 6 horas de incubación con ambos tipos de nanopartículas. En 2018, Garrido-Maestu y colaboradores reportaron que la bacteria *E. coli* O157:H7 fue eliminada totalmente al agregar un 0.2% de micropartículas de quitosano después de una incubación de 8 horas a 37 °C.

Sieberi y colaboradores (2020) evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico con saponinas de *Centella asiatica*, frente a *S. aureus* ATCC 25923. Sus resultados mostraron una inhibición total después de las 24 horas de incubación, con una significativa reducción de UFC a partir de las 8 horas. Se observó, particularmente, la reducción de crecimiento de la misma desde la hora 0. Comparando este estudio de Sieberi con nuestros resultados, se puede observar una reducción de las UFC a partir de las 4 horas, posiblemente debido a la presencia de quitosano en nuestras micropartículas, generando una respuesta más rápida en la reducción de las células bacterianas.

Respecto a *L. monocytogenes*, en 2014, Da-Silva y colaboradores realizaron nanovesículas de nisina con y sin quitosano, las cuales fueron evaluadas frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644. Los resultados mostraron que la formulación que contenía quitosano fue más estable y más eficiente en la inhibición de *L. monocytogenes* en comparación con las otras nanovesículas sin quitosano. Los resultados mostraron una reducción total de las UFC a las 4 horas, sin embargo, a partir de las 7 hasta las 25 horas, observaron un crecimiento de 2 Log UFC/mL. En nuestro caso, la cepa mostró una caída de la curva partir de las 8 h, con inhibición total, la cual se mantuvo hasta las 48 horas; a pesar de que la respuesta mostrada por la bacteria al contacto con las micropartículas compuestas fue un poco más lenta comparada con la del estudio de Da-Silva.

7. CONCLUSIÓN

El método de goteo controlado y baño recirculado con el que se realizaron las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata* generaron un tamaño de partícula adecuado para producir la muerte celular exitosa de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Estas bacterias han demostrado ser unos de los principales patógenos transmitidos a través del agua y presentan una alta y moderada importancia en la salud. Este estudio nos permite concluir que las micropartículas compuestas son un buen sistema para la reducción de las bacterias patógenas presentes comúnmente en fuentes de agua para el consumo humano.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda que la planta de *Yucca baccata* a utilizar para los siguientes proyectos tenga el menor tiempo de almacenamiento posible, porque así se asegura que contenga una mayor cantidad de saponinas.

Para el caso de las micropartículas, es necesario seguir investigando su estructura, ya que es fundamental para entender el mecanismo de acción frente a las bacterias.

Por otra parte, es recomendable realizar modificaciones a las pruebas bacterianas, por ejemplo, trabajar en diferentes pHs para observar el comportamiento de las micropartículas frente a los cambios en el medio.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelrahman M., Jogaiah S. 2020. *Bioactive Molecules in Plant Defense*. Springer International Publishing. Primera edición. Springer, Cham. 100 (59).
- Acuña-Gallardo C. (2019). Efecto de las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas de *Yucca baccata* para su potencial uso en la reducción de la carga bacteriana del agua. (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.
- Akaniro-Ejim N., Ubani C., Nubila N., Nzei A., Nwodo U., Okoh A. 2016. Evaluation of Saponin Extract from *Vitex doniana* and *Pentaclethra macrophylla* for Antibacterial Activity. *Applied Sciences*, 6(6), 180.
- Alcázar E.M. (2016). Caracterización de saponinas de *Agave durangensis* y *salmiana*, y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccaromyces cerevisiae* (Tesis doctoral). CIATEJ. Jalisco, México.
- Ali A., Ahmed S. 2018. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int J Biol Macromol*. 109(1): 273-286.
- Arcos-Pulido M., Ávila-Navia S., Estupiñán-Torres S.M., Gómez-Prieto A.C. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *Nova*. 3 (4): 69-79.
- Ardila N., Daigle F., Heuzey M.C., Ajji A. 2017. Effect of Chitosan Physical Form on Its Antibacterial Activity Against Pathogenic Bacteria. *J Food Sci*. 82(3): 679-686.
- Asati N., Yadava R.N. 2017. Antibacterial activity of a triterpenoid saponin from the stems of *Caesalpinia pulcherrima* Linn. *Natural Product Research*. 32(5): 499–507.
- Asemave K. 2021. Bioactivity of *Arachis hypogaea* Shell Extracts against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Progress in Chemical and Biochemical Research*. 4(3): 331-336.
- Baccou J.C., Lambert F. y Sauvaire Y. 1977. Spectrophotometric method for the determination of total steroidal saponin. *Analyst*. 102 (1215): 458-465.
- Bande F., Arshad S.S., Bejo M.H., Omar A.R., Moeini H., Khadkodae S., Anka I.A. 2020. Development and immunogenic potentials of chitosan-saponin encapsulated DNA vaccine against avian infectious bronchitis coronavirus. *Microbial Pathogenesis*. 149(10)
- Batista P., Castro P.M., Madureira A.R., Sarmiento B., Pintado 2021. Preparation, Characterization and Evaluation of Guar Films Impregnated with Relaxing Peptide Loaded into Chitosan Microparticles. *Applied Sciences*. 11(21):9849.
- Brasselet C., Pierre G., Dubessay P., Dols-Lafargue M., Coulo J., Maupeu, J., Delattre C. 2019. Modification of Chitosan for the Generation of Functional Derivatives. *Applied Sciences*, 9(7):1321.
- Brenner D., Staley J., Krieg N. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Athens, GA: University of Georgia.
- Caetano L., Almeida A., Gonçalves L. 2016. Effect of Experimental Parameters on

- Alginate/Chitosan Microparticles for BCG Encapsulation. *Marine Drugs*. 14(5): 90.
- Carmona J.E., Morales-Martínez T.K., Mussatto S.I., Castillo-Quiroz D., Ríos-González L.J. 2017. Propiedades químicas, estructurales y funcionales de la Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 8(42).
- Cheok C., Salman H., Sulaiman R. 2014. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Res Int*. 59(19):16-40.
- Coleman B., Louie M., Salvadori M., McEwen S., Neumann F., Sibley E. 2013. Contamination of Canadian private drinking water sources with antimicrobial resistant *Escherichia coli*. *Water Res*. 47(9): 3026-3036.
- Comisión Nacional de los Derechos Humanos (CNDH). Formulación y Calibración de Indicadores para Generar un Diagnóstico de la Situación de Cumplimiento de los Derechos Humanos, Respecto de Acceso Humano al Agua y a un Medio Ambiente Sano en Materia de Agua en México. 164 Recuperado de: <https://www.cndh.org.mx/sites/default/files/documentos/2019-11/Diagnostico-DH-Agua-Mexico.pdf>
- Coria, L. (2014). Electrodo modificado con quitosano y partículas de platino para la determinación rápida de *Escherichia coli* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ingeniería. Perú.
- Croisier F., Jérôme C. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *Eur Polym J*. 49(4): 780-792.
- Da-Silva, I.M., Boelter J.F., da-Silveira N.P., Brandell A. 2014. Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(7).
- Detsi A., Kavetsou E., Kostopoulou I., Pitterou I., Pontillo A.R.N., Tzani A., Christodoulou P., Siliachli A., Zoumpoulakis P. 2020. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. *Pharmaceutics*. 12(7):669.
- Dev K.G., Mis S.K., Mishra A. 2020 Antimicrobial Efficacy of Pelargonic Acid Micelles against *Salmonella* varies by Surfactant, Serotype and Stress Response. *Sci Rep*. 10:10287.
- Dima J.B., Sequeiros C., Zaritzky N.E. 2014. Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura. *AAIQ*. 57.
- Divya K., Vijayan S., George TK., Jisha MS. 2017. Antimicrobial Properties of Chitosan Nanoparticles: Mode of Action and Factors Affecting Activity. *Fibers Polym*. 18(2): 221-230.
- Espejo, R. (2014). Evaluación experimental de las saponinas del Quillay (*Quillaja saponaria*) como inhibidoras del desarrollo de coccidias intestinales en pollos de engorda. (Tesis de pregrado) Universidad de Chile. Santiago de Chile.
- Ferraro G.E., Martino V.S., Bandoni A., Nadinic J.L. 2015. Fito cosmética: Fito ingredientes y otros productos naturales. Eudeba EPUB. 1a ed. Buenos Aires.
- Ferreira-Tomaz A., Sobral-de-Carvalho S., Cardoso-Barbosa R., Silva S., Sabino-Gutierrez M., Lima A., y Fook M. 2018. Ionically Crosslinked Chitosan Membranes Used as Drug

- Carriers for Cancer Therapy Application. *Materials*, 11(10), 2051.
- Fleck J., Betti A., Silva F., Troian E., Olivaro C., Ferreira F., Verza S. 2019. Saponins from Quillaja saponaria and Quillaja brasiliensis: Particular Chemical Characteristics and Biological Activities. *Molecules*. 24(1): 171-200.
- Flores T., Huamán J., Tomás, G. 2013. Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la melisa officinalis “toronjil”. *Revista Peruana De Química E Ingeniería Química*, 16(2), 47-51.
- Forstinus N., Ikechukwu N., Emenike M. y Ogonna A. 2016, Water and Waterborne diseases: A review. *IJ TDH*. 12 (4): 1-14.
- Gallardo-Carrero M.G., Barbosa-Cardoso R.C., Fook-Lia M.C.V., Sabino M.A. 2019. Síntesis y caracterización de un novedoso biomaterial a base de quitosano modificado con aminoácidos. *Matéria*. 24(3): 3-20.
- García L., Iannacone J. 2018. Pseudomonas aeruginosa un indicador complementario de la calidad de agua potable: análisis bibliográfico a nivel de sudamérica. *The Biologist*. 12(1): 133-152.
- Garrido-Maestu A., Ma Z., Paik S., Chen N., Ko S., Tong Z., Jeong K.C. 2018. Engineering of Chitosan-derived nanoparticles to enhance antimicrobial activity against foodborne pathogen *Escherichia coli* O157:H7, *Carbohydrate Polymers*.
- Giraldo-Pedraza J. 2015. Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. *J Chil Chem Soc*. 62(2): 3538-3544.
- Goy R., Morais S., Assis O. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Rev. Bras. Farmacogn*. 23 (1): 122–127.
- Goycoolea M., Sreekumar S., Moerschbacher M., Rivera-Rodríguez R. 2018. Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and Microparticles. *Scientific Reports*. 8. (4695).
- Güçlü-Üstündag Ö. y Mazza G. 2007. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2007. 34(3): 231-258.
- Hassan M.I., Mohamed A.F., Taher F.A., Kamel M.R. 2016. Antimicrobial activities of chitosan nanoparticles prepared-from lucila cuprina maggots (diptera: calliphoridae). *J Egypt Soc Parasitol*. 46(3):563-570.
- Hassan S., Byrd A., Berhow M., Cartwright A., Bailey C. 2010. Hemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chem*. 119 (2): 600-606.
- Hernández S., Lugo C., Díaz J., Villanueva S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. *e-Gnosis*. 3:1.
- Hostettmann, K. y Marston, A. 1995. Saponins (Chemistry and Pharmacology of Natural Products). Cambridge: Cambridge University Press.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) “Estadísticas a propósito del día mundial del agua” 2018. Recuperado de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/agua2018_Nal.pdf
- Jana S. y Jana S. 2019. Functional Chitosan. Springer Nature. Primera edición. Singapore. 489

(463).

- Jeon S.J., Oh M., Yeo W., Galvao N., Kwang K.N., Jeong K.C. 2014. Underlying Mechanism of Antimicrobial Activity of Chitosan Microparticles and Implications for the treatment of Infectious Diseases. *Plos One*. 9(3): 1-10
- Kawakita E.R.H., Ré A.C.S., Peixoto M.P.G., Ferreira M.P., Ricomini-Filho A.P., Freitas O, Aires C.P. 2019. Effect of Chitosan Dispersion and Microparticles on Older *Streptococcus mutans* Biofilms. *Molecules*. 24(9): 1-11.
- Kong M., Chen X., Xing K., Park H.J. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 144(1):51-63.
- Kregiel D., Berłowska J., Witonska I., Antolak H., Proestos C., Babic M., Zhang B. 2017. Saponin-Based, Biological-Active Surfactants from Plants. Application and Characterization of Surfactants.
- Kurniawati H.A., Ismadji S., Liu J.C., 2014. Microalgae harvesting by flotation using natural saponin and chitosan, *Bioresour. Technol*. 166(1): 429-434.
- Laysandra L., Ondang I., Ju H., Ariandini B.H., Mariska A., Soetaredjo F.E., Ismadji S. 2019. Highly adsorptive chitosan/saponin-bentonite composite film for removal of methyl orange and Cr (VI). *Environ Sci Pollut Res*. 26 (5): 5020-5037.
- Lengyel M., Kállai-Szabó N., Antal V., Laki AJ., Antal I. 2019. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica*. 87(3):20.
- León-Trujillo, R.C. (2012). Actividad antiparasitaria del extracto de saponinas de *Yucca baccata* del desierto sonorense empleando jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *Giardia lamblia*. (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.
- Li J. y Zhuang S. 2020. Antibacterial activity of chitosan and its derivatives and their interaction mechanism with bacteria: Current state and perspectives. *European Polymer Journal*, 138, 109984.
- Liu H., Du Y., Yang J., Zhu J. 2004. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. *Carbohydr Polym*. 55(3): 291-297.
- Lizardi-Mendoza J., Argüelles-Monal W.M. y Goycoolea-Valencia F.M. 2016. Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In Silvia Bautista-Baños, Gianfranco Romanazzi, y Antonio Jiménez-Aparicio (Eds.), *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities* (3–31). Academic Press; Scopus.
- Loutfy S.A., El-Din H.M., Elberry M.H., Allam N.G., Hasanin M.T.M., y Abdellah A.M. 2016. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 035008.
- Ma Z.W., Zhang K.N., Zou Z.J., Lü Q.F. 2021. High specific area activated carbon derived from chitosan hydrogel coated tea saponin: One-step preparation and efficient removal of methylene blue. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(3).
- Mahdy S.M., El-Kalyoubi, M.H., Khalaf, M.M. y Abd M. M. 2013. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique. *Annals of Agricultural Sciences*.

- Majinda R. 2012. Extraction and Isolation of Saponins. Natural Products Isolation. En: Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds.). Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology. Springer Science. Alemania. 415–426.
- Marruffo, L.J. (2019). Extracción de las saponinas obtenidas a partir de las hojas de *Baccharis Emarginata* para la elaboración de champú biodegradable. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.
- Matica A., Ostafe V. 2019. Antibacterial effect of chitosan on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *New Front. Chem.* 28(1): 1-66 .
- Miller R.A., Walker R.D., Carson J., Coles M., Coyne R., Dalsgaard I., Giesecker C., Hsu H.M., Mathers J.J., Papapetropoulou M., Petty B., Teitzel C. y Reimschuessel R. 2005. Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Dis Aquat Organ.* 64(3):211-22.
- Moghimipour E., Handali S. 2015. Saponin: properties, methods of evaluation and applications. *ARRB.* 5(3): 207-220.
- Muxika A., Etxabide A., Uranga J., Guerrero P., y de la Caba K. 2011. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int J. Biol. Macromol.* 2011. 105 (2): 1358-1368.
- Newbold C., Hassan J., Wang M., Ortega E. y Wallace R. 1977. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78(1): 237-249.
- Noorjahan S.E., Porchezhiyan V. 2017. Eco-friendly food preservation: studies on the synergistic preservative effect of chitosan and soap nut solution. *JOAASR.* 1(7): 18-26.
- Norma Oficial Mexicana 127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. 1994. Recuperado de: https://agua.org.mx/wp-content/uploads/2016/10/nom127_modificacion_2000.pdf
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Guías para la calidad del agua de consumo humano: cuarta edición que incorpora la primera adenda. Ginebra. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272403>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). Guías para la calidad del agua de consumo humano. Geneva. 2019. Recuperado de https://www.pseau.org/outils/ouvrages/oms_guias_para_la_calidad_del_agua_de_consumo_humano_2018.pdf
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). Water, sanitation, hygiene and health: a primer for health professionals. Geneva. Recuperado de <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330100/WHO-CED-PHE-WSH-19.149-eng.pdf?ua=1>
- Parvekar P., Palaskar J., Metgud S., Maria R. y Dutta S. 2020. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Investig Dent.* 23;7(1):105-109.
- Pereo-Vega, D.G. (2015). Actividad antibacteriana in vitro del extracto butanólico del tallo de *yucca baccata* e identificación de sus fracciones con saponinas. (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.

- Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. 2004. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339(16), 2693–2700.
- Qiu T., Gu P., Wusiman A., Ni H., Xu S., Zhang Y., Wang D. 2021. Immunoenhancement effects of chitosan-modified ginseng stem-leaf saponins-encapsulated cubosomes as an adjuvant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204.
- Quillay M.A., Arana Y.A., Jaramillo C.G., Cuenca S., Rojas L.L. Y Alcivar V. J. 2017. Contenido de saponinas y actividad cicatrizante de “*Cecropia peltata*” y “*Parthenium hysterophorus*”. *Revista cubana de Farmacia*. 51. 3.
- Rabea EI., Mohamed E.T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4(6): 1457-1465.
- Ramírez A., Mejía G., Pérez J., Martínez M. 2017. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum Dolichosepalum Bitter* (Frutillo). *Rev Cubana Plant Med*. 22(1):546-458.
- Ramirez L., Marin, D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*. 2(42).
- Ramírez-Barragan C.A., Delgado-Fornué E., Andrade-Ortega J.A. 2016. Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*. 4(1): 769-776.
- Ramírez-Castillo F., Loera-Muro A., Jacques M., Garneau P., Avelar-González F., Harel J., Guerrero-Barrera A. 2015. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. 4(2): 307-334.
- Ray A., Bharali P., Konwar B. 2013. Mode of Antibacterial Activity of Eclalbasaponin Isolated from *Eclipta alba*. *Appl Biochem Biotechnol*. 171 (8): 2003-2019.
- Reichert C.L., Salminen H., Weiss J. 2019. Quillaja Saponin Characteristics and Functional Properties. *Annu Rev Food Sci T*. 10(1): 43-73.
- Rejinold N.S., Muthunayanan M., Muthuchelian K., Chennazhi K.P., Nair S.V., Jayakumar R. 2011. Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines in vitro, *Carbohydr Polym*. 84(1): 407-416.
- Reyes-Gómez U., Reyes-Hernández K.L., Santos-Calderón L.A., Luévanos-Velázquez A., Guerrero-Becerra M., Martínez-Arce P.A., 2018. Enfermedad diarreica aguda en niños. *Salud Quintana Roo*. 2018. 11(40): 34-41
- Reyna-Murrieta M.E. (2021). Actividad antimicrobiana del extracto butanólico y acuoso con saponinas de *Yucca baccata* contra bacterias gram positivas y gram negativas. (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.
- Rhim, J.W., Hong S.I., Park H.M., Ng P.K.W. 2006. Preparation and Characterization of Chitosan-Based Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(16). 5814–5822.
- Ríos-Tobón S., Agudelo-Cadavid R., Gutiérrez-Builes L. 2017. Patógenos e indicadores microbiológicos de calidad del agua para consumo humano. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*. 23(2): 236-247.

- Rodriguez, A. (2016). Extracción de saponinas a partir de la *Furcraea hexapetala* y estudio de sus propiedades como insecticida. (Tesis de pregrado). Universidad Central Marta Abreu de las Villas. Santa clara, Cuba.
- Saborit-Pino, K.Z. (2015). Micropartículas porosas nanoestructuradas de quitosano acarreadoras de moléculas bioactivas. (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Sonora, México.
- Sadeghi A.M., Dorkoosh F.A., Avadi M.R., Saadat P., Rafiee-Tehrani M., Junginger H.E. 2008. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *Int J Pharm* 355:299–306
- Sahariah P., Másson M. 2017. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure-Activity Relationship. *Biomacromolecules*. 2 18 (11): 3846-3868.
- Samrot A.V., Akanksha J.T., Padmanaban S., Philip S.A., Burman U., Rabel, A.M. 2016. Chelators influenced synthesis of chitosan–carboxymethyl cellulose microparticles for controlled drug delivery. *Applied Nanoscience*, 6(8)
- Sette-de-Souza P.H., Medeiros F.D., Santana C.P., Araújo R.M., Cartaxo-Furtado N.A.O., Macêdo R.O., Medeiros A.C.D. 2018. Thermal decomposition profile of chitosan microparticles produced with *Schinopsis brasiliensis* Engler extract. *J Therm Anal Calorim*. 3(1): 829-834.
- Sewlikar S. y D'Souza, D. H. 2017. Antimicrobial Effects of Quillaja saponaria Extract Against *Escherichia coli* O157:H7 and the Emerging Non-O157 Shiga Toxin-Producing *E. coli*. *Journal of Food Science*, 82(5), 1171–1177.
- Sidana J., Singh B., Sharma O. 2016. Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*. 130(1): 22-46.
- Sieberi B.M., Omwenga G.I., Wambua R.K., Samoei J.C. y Ngugi M.P. 2020. Screening of the Dichloromethane: Methanolic Extract of *Centella asiatica* for Antibacterial Activities against *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *The Scientific World Journal*.
- Silva L.P., de Britto D., Selegim M.H.R., Asis O.B.G. 2010 In vitro activity of water-soluble quaternary chitosan chloride salt against *E. coli*. *World J Microbiol Biotechnol* 26, 2089–2092.
- Silvestro I., Francolini I., Di-Lisio V., Martinelli A., Pietrelli L., Scotto-d'Abusco A., Piozzi A. 2020. Preparation and Characterization of TPP-Chitosan Crosslinked Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials*, 13(16), 3577.
- Soetan K., Oyekunle M., Aiyelaagbe O., Fafunso M. 2016. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. *Afr J Biotechnol*. 5(23): 2405-2407.
- Soleimani N., Mobarez A.M., Olia M.S.J y Atyabi F. 2015. Synthesis, Characterization and Effect of the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles on Vancomycin- Resistant *Enterococcus* and Other Gram Negative or Gram Positive Bacteria. *Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.*, 26(1) 14-23.
- Sonfack G., Fossi-Tchinda C., Simo I.K., Bitchagno G.T.M., Nganou B.K., Çelik İ., Tane P. 2019.

- Saponin with antibacterial activity from the roots of *Albizia adianthifolia*. *Natural Product Research*, 1–9. doi:10.1080/14786419.2019.16
- Trombino S., Cassano R., Mellace S., Picci N., Loizzo M.R., Menichini F., Tundis R. 2016. Novel microspheres based on triterpene saponins from the roots of *Physospermum verticillatum* (Waldst & Kit) (Apiaceae) for the improvement of gemcitabine release. *J Pharm Pharmacol.* 68(2): 275-281.
- Upadhyay S., Jeena G.S., Shikha E. 2018. Recent advances in steroidal saponins biosynthesis and in vitro production. *Planta* 248, 519
- Velázquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Domínguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velázquez E.F., Aztiazarán H., Hernández J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J Appl Microbiol.* 103 (5): 1747-56.
- Veltman B., Harpaz B., Cohen Y., Poverenov E., Eltzov E. 2022. Characterization of the selective binding of modified chitosan nanoparticles to Gram-negative bacteria strains. *Int J Biol Macromol.* 194 (2022) 666–675.
- World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum. Geneva. 2017. 631. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254637/9789241549950-eng.pdf?sequence=1>
- Xue J., Michael D.P., Zhong Q. 2015. Antimicrobial activity of thyme oil co-nanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 1–8.
- Yilmaz A.H. 2020. Antibacterial Activity of Chitosan-Based Systems. *Functional Chitosan*. 457-489.
- Yilmaz-Atay. (2013). The fabrication and technical applications of multifunctional materials. (Tesis doctoral), Dokuz Eylül University Fen Bilimleri Institute, İzmir Turquía.
- Yu, K., Ho, J., McCandlish, E., Buckley, B., Patel, R., Li, Z. y Shapley, N. C. 2013. Copper ion adsorption by chitosan nanoparticles and alginate microparticles for water purification applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 425, 31-41.
- Yuan C., Li Y., Li Q., Jin R. y Ren L. 2018. Purification of Tea saponins and Evaluation of its Effect on Alcohol Dehydrogenase Activity. *Open Life Sciences*, 13(1), 56–63. doi:10.1515/biol-2018-0008
- Zhang Z., Li L., Sun D., Wang M., Shi,J., Yang D., Zou S. 2020. Preparation and properties of chitosan-based microspheres by spray drying. *Food Science & Nutrition*.
- Zienkiewicz-Strzałka M., Deryło-Marczewska A., Skorik Y.A., Petrova V.A., Choma A., & Komanięcka I. 2019. Silver Nanoparticles on Chitosan/Silica Nanofibers: Characterization and Antibacterial Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 166.