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

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

Por:

Ana Cristina Acuña Gallardo

TESIS APROBADA POR

LA COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

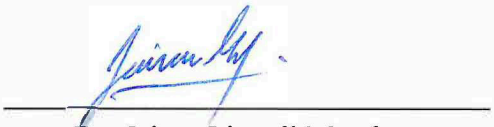
MAESTRA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora. Septiembre 2019

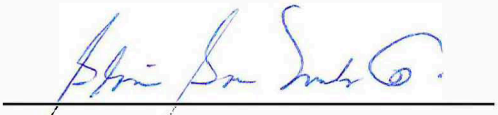
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para a revisión de la tesis de Ana Cristina Acuña Gallardo, la han encontrado satisfactoria y recomienda que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

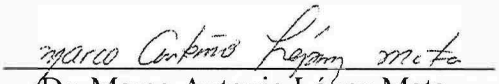
Dr. Luis Quihui Cota
Director de tesis



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 "Efecto de las Micropartículas Compuestas por Quitosano y Extracto de Saponinas de *Yucca baccata* para su Potencial uso en la Reducción de la Carga Bacteriana del Agua" 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 Ana Cristina Acuña Gallardo, 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 manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

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

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología por todo el apoyo económico que se me brindó durante el tiempo de la maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., por brindarme un espacio dentro de sus instalaciones y su apoyo para seguirme preparando cada día.

A todos los miembros de mi comité, en especial a mi director de tesis Dr. Luis Quihui, por permitirme estar en su grupo de trabajo, por todo su apoyo académicamente, pero sobre todo por creer en mí, gracias por alentarme a seguir adelante.

Al Dr. Jaime Lizardi por apoyo durante el proyecto, por su paciencia de enseñarme desde cero tanto en sus materias como en el trabajo de laboratorio, estaré siempre agradecida por sus consejos.

Maestra Lupita Morales, gracias por su apoyo durante el proyecto y en la parte acádemcia, además de siempre estar al pendiente de mí. Dr. Marco Antonio López Mata, gracias por sus consejos y su apoyo durante estos años, por confiar en mí junto con la maestra Edith Valbuena, siempre han sido un excelente ejemplo para mí.

Gracias al grupo de investigación en Biopolímeros, que me adoptó desde el primer día y me hicieron parte de su familia ¡Muchas gracias! Gracias especialmente a Karla Martínez por ayuda técnica y académica, su ayuda en el laboratorio, gracias por su amistad y el cariño durante este tiempo.

Gracias Dra. Maricarmen por su ayuda académica, además de escucharme y guiarme con sus consejos, gracias por compartir sus experiencias conmigo, Dra. Osiris por su apoyo en todas mis dudas y su valiosa ayuda en el proyecto. A las Dras. Elizabeth Carvajal y Yolanda López, por apoyarme con equipos de su laboratorio y académicamente, gracias por todo.

A mis compañeros de laboratorio de biopolímeros Cinthya, Iván, Monse, Federico, Ana, Mayra, Daniel, que siempre tenían un consejo que dar y apoyo para los días difíciles, por tantas pláticas y momentos lindos que pasamos. Gracias en especial a Yubia por ser mi mamá adoptiva del grupo, por cuidarme, aconsejarme y regañarme cuando lo necesitaba, gracias a Alma Campa por su apoyo técnico en el laboratorio, las risas y los consejos, Alma Rosas gracias por su apoyo académico y además por escucharme y aconsejarme cuando lo necesité.

A Rosalba Pérez por su importante ayuda en el proyecto en el área de microbiología y brindarme de su valioso tiempo, a la Dra. Susana por su apoyo en su laboratorio de microbiología, Dr. Alfonso Galaz por guiarme con sus consejos. A los maestros con los que tuve el gusto de compartir en un aula o laboratorio, gracias por contribuir en mi formación.

Gracias a mis compañeros que se convirtieron en amigos, en familia, que gracias a ellos se pudo sobrellevar esta aventura. Gracias a Karen por ayudarme tanto durante estos dos años, no me cansaré de darte las gracias, por ser un alma tan noble, te quiero mucho. A Carlos Sampieri por estar desde el principio compartiendo tantos momentos, gracias por aconsejarme, regañarme, muchas gracias por tu amistad y por ser un ejemplo para mí. Gracias a Julio por ayudarme en el laboratorio, en mis dudas de las clases, por tu ayuda en general un millón de gracias.

Gracias Zahid por tu apoyo y cariño incondicional, desde el primer día que te conocí le doy gracias a Dios por ponerte en mi camino; Isabel gracias por tu nobleza, tu cariño, tus palabras tan lindas de apoyo, encantada de coincidir contigo y Miguel. Gracias a Ezequiel, Tefy, Edith, Dianita, Ana, Male, Dalia, Dailen, Enis, Diana, Kasandra, Nena, Armida, Ariana, Angela, Shain, Yessica, por sus palabras de apoyo, por estar presente y ayudarme a seguir adelante. Gracias a mis compañeros Mario, Manuel, Francisco, por sus palabras y consejos que siempre fueron de mucha ayuda, a Claudia, Leo y Gabriel que me apoyaron durante el proyecto.

Gracias a mi familia, en especial a mi mamá que sin ella no hubiera llegado tan lejos, gracias por darme ánimos, por guiarme en la distancia y sobre todo gracias por dejarme volar y enseñarme todo lo que hasta ahora sé, gracias por cuidarme lo más preciado que tengo en esta vida, gracias por todo tu amor.

Gracias a mi pequeño Gaelito que me dio ánimos de seguir adelante y superar cada prueba que se presentaba, porque sabía que la recompensa era el viernes que te veía y te abrazaba por extrañarte cada segundo de la semana que no estuve contigo mi amor pequeño. Gracias Víctor por estar conmigo en las buenas y en las malas y creer en mí, en que podía llegar tan lejos como yo quisiera, por escuchar mis problemas, mis tonterías, por entender tantas cosas, por crecer a mi lado y llevarme de la mano. Gracias a Isabel por cuidar y querer a Gael y ayudar a mi mamá durante estos años. Gracias a Gloria por su cariño y apoyo incondicional desde que comenzó esta aventura, gracias por acompañarme y tus palabras de todos los días que no me dejaron caerme.

DEDICATORIA

A Dios, por amarme de tal manera que me dio salud, vida y me guio en cada paso que di y por la fuerza para seguir adelante.

A mi hijo Gael, todo el esfuerzo que hice mi amor fue por ti, para darte un mejor futuro, espero que un día entiendas todo el sacrificio que representó dejarte por días lejos de mí, te amo y gracias por siempre recibirme con alegría, tú siempre fuiste mi mayor motor y mi mayor recompensa.

A mis padres, a ti mamá que este logro también es tuyo por no dejarme nunca de la mano, por creer en mi potencial y recordarme lo mucho que valgo, gracias por tu esfuerzo y amor al cuidar a Gael, sin ti no sería nada, te amo infinitamente, y a mi gran amor eterno que me cuida y que sé que estarías muy orgullosa de tu niña, te amo eternamente papá.

A ti, que me acompañaste en esta dura etapa, por tu amor, comprensión, tu apoyo por cada día bueno y malo que pasamos juntos, gracias por no soltar mi mano y estar siempre conmigo, te amo amor, te amo Víctor.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE CUADROS 10
RESUMEN 11
ABSTRACT 13
1. INTRODUCCIÓN 14
2. ANTECEDENTES 16
2.1 El Agua y su Contaminación 16
2.1.2 Enfermedades de Origen Hídrico 17
2.1.3Tratamiento de Potabilización del Agua 19
2.2 Quitosano 21
2.2.1 Efecto Antibacteriano de Qs y Mecanismo de Acción 22
2.2.2 Aplicaciones de Quitosano 26
2.3. Saponinas 27
2.3.1 Función Antibacteriana de las Saponinas 28
2.3.2 Aplicaciones de las Saponinas 29
3. HIPÓTESIS 31
4. OBJETIVOS 32
4.1 General 32
4.2 Específicos 32
5. MATERIALES Y MÉTODOS 33
5.1 Elaboración de Mp compuestas Qs/Extsap 33
5.1.1. Extracción de Saponinas de la Planta *Yucca baccata* 33
5.1.2. Elaboración y Cuantificación del Extracto con Saponinas (Extsap) de *Yucca baccata* 34
5.1.3 Preparación de la Solución de Qs/Extsap Para la Elaboración de las Mp y Gelificación Iónica 36
5.2. Caracterización de las Mp 37
5.3 Evaluación Antibacteriana Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento 39
5.4 Diseño de Experimentos 40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41
6.1 Elaboración y Caracterización de Mp Compuestas Qs/Extsap Elaboradas 41

CONTENIDO (continuación)

6.1.1. Rendimiento de Extracción y Cuantificación de Saponinas 41
6.1.2. Descripción de Tamaños de las Mp Elaboradas 43
6.2.2 Morfología de las Mp Elaboradas 45
6.2.3. Eficacia de Inmovilización del Extsap de la Planta de *Yucca baccata* y Conformación de las Mp compuestas Qs/Extsap 48
6.2 Ensayo Microbiológico de las Mps Compuestas por Qs/Extsap 51
7. CONCLUSIÓN 54
8. RECOMENDACIONES 55
9. REFERENCIAS 56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de quitosano……..…….....	22
2	Representación general de la pared celular de bacterias Gram negativas y positivas……...	23
3	Estructura química general de una saponina triterpénica y esteroidal.....	27
4	Planta de *Yucca baccata* de una zona aledaña al municipio de Cananea, Sonora	28
5	Esquema general de la cuantificación de las saponinas del tallo de *Yucca baccata*…….....	35
6	Curva estándar de diosgenina 93% utilizada para la cuantificación de saponinas esteroidales del extracto del tallo de *Yucca baccata*……...	35
7	Sistema de elaboración de Mp…….	37
8	Curva de calibración de UV-visible para medición de eficiencia de asociación y eficiencia de liberación del Extsap de las Mp compuestas.……..	39
9	Espectro FTIR del Extsap de *Yucca baccata* y la referencia estándar de Sigma diosgenina 93% de pureza……	43
10	Distribución de tamaños de las Mp elaboradas.….....	45
11	Imágenes de microscopia con objetivo 4x de las Mp realizadas mediante gelificación iónica…….....	47
12	Micrografía de las Mp liofilizadas de Qs/Extsap (A) y Qs (B) utilizando aumento de 35X por microscopía electrónica de barrido……..	48
13	Micrografía de las Mp liofilizadas de Qs/Extsap (A) y Qs (B) observadas con aumento de 500X.…….....	49
14	Cuantificación de la pérdida del Extsap de las Mp compuestas…….	50
15	Esquema hipotético de la conformación de la micropartícula compuesta con quitosano y el extracto con saponinas de la planta de *Yucca baccata*..……	51
16	Espectro FTIR de Mp de Qs/Extsap……...……..….	52

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Principales enfermedades de origen hídrico……	18
2	Principales tratamientos de agua utilizados en México……	20
3	Resultados de la evaluación antibacteriana de las Mp de Qs y Mp de Qs/Extsap…….	54

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Ecuación para cuantificación de saponinas esteroidales……..	35
2	Ecuación de concentración de Extsap……..	39
3	Ecuación de eficiencia de asociación……...	39
4	Ecuación de eficiencia de carga……...	39

RESUMEN

En la actualidad los problemas de escasez y contaminación del agua continúa siendo un factor de riesgo para la salud de la población a nivel mundial. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias para remover efectivamente los contaminantes en el agua continúa aún vigente. Dentro de las nuevas alternativas destacan el uso extractos de plantas, aceites esenciales y biopolímeros con propiedades antibacterianas. Un ejemplo, es el uso de extractos de plantas con compuestos como las saponinas y polímeros como quitosano (Qs) que han demostrado tener actividad antibacteriana y anti-fúngicas. Por lo anterior, el objetivo del estudio fue elaborar micropartículas (Mp) compuestas de quitosano y extracto con saponinas (Extsap) del tallo de *Yucca baccata* para su potencial uso en la reducción de la carga bacteriana del agua. Para la caracterización se usó FTIR, microscopía óptica invertida y electrónica de barrido para el análisis de tamaño y morfología de las Mp; para la evaluación su las propiedad antibacteriana de las Mp, se estimó el porcentaje de inhibición de crecimiento contra *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes,* mediante la técnica de macrodilución y sembrado en placa. Se obtuvo un rendimiento de extracción de saponinas de 4.19%. El análisis de FTIR del extracto con saponinas mostró bandas que confirmaron la presencia de saponinas esteroidales (900 cm^{-1}). Se obtuvieron Mp de Qs (2%p/v) con un diámetro promedio de 453± 150.43 µm, de forma semiesférica de color blanco y superficie aparentemente uniforme. Usando una solución de Qs (2% p/v) y Extsap (0.5% p/v), se obtuvieron Mp semiesféricas de coloración café y superficie uniforme con un promedio de diámetro 408.88 ± 156.36µm. Además, se estimó una eficiencia de asociación de 83.37%, y la eficiencia de carga fue de 1.5% y 6% para Extsap y Qs respectivamente. El mayor porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano utilizando las Mp Qs/Extsap contra la cepas fue *S. tiphy* con un 99.99%, mostrando la mayor sensibilidad ($p<0.05$) en comparación de *E. coli* y *L. monocytogenes* (7% y 56% respectivamente) con 1.0 g de Mp compuestas. E. coli mostró 99.99% de inhibición con 2.0g de Mp. En conclusión, se obtuvieron Mp compuestas por Qs y el Extsap del tallo de *Yucca baccata* tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias probadas, que comúnmente se reconocen como contaminantes del agua.

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

ABSTRACT

At present, the lack of water and pollution remain risk factors for the population's health worldwide. As a result, the search remains for new strategies to effectively remove contaminants in water. Among them are the use of plants, essential oils, extracts and biopolymers with antimicrobial properties. An example is the use of plant extracts with compounds such as saponins (ExtSap) and polymers such as Chitosan (Qs) which have shown to have antibacterial and anti-fungal properties. Therefore, the objective of this study was to elaborate Mp composed with chitosan and extract with stem saponins from *Yucca baccata* for potentially to reduce the bacterial load from water. To achieve this, a recirculated bath and ionic gelation system was used for the preparation of the Mp. FTIR, inverted optical microscopy and scanning electronics were used to analyze the size and morphology of the Mp; and the technique of macrodilution and seeded in plate was used to evaluate its antibacterial property with the percentage of growth inhibition against *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. A yield of saponins of 4.19% was estimated. The FTIR analysis showed bands to confirm the presence of steroidal saponins (900 cm^{-1}) in the extract with saponins. Mp of Qs (2% w/v) showed an average diameter of 453 ± 150.43 µm, with white hemispherical shape and apparently uniform surface. Using the solution with Qs (2% w/v) and ExtSap (0.5% w/v), brown hemispherical Mp and uniform surface with an average diameter of 408.88 ± 156.36 µm were obtained. In addition, an association efficiency of 83.37% was estimated, and loading efficiency was of 1.5% and 6% for the Extsap and Qs respectively. The highest percentage of bacterial growth inhibition using Mp Qs / Extsap against *S. tiphy* strain was 99.99%, showing the highest sensitivity ($p < 0.05$) as compared with *E. coli* and *L. monocytogenes* (7% and 56% respectively) at 1.0 g of Mp. *E. coli* showed 99.99% of inhibition at 2.0 g of Mp. In conclusion, the Mp composed of chitosan and saponin´s extract from the stem of *Yucca baccata* had inhibitory effect on the growth of the tested bacteria which are be commonly recognized as water contaminants.

Keywords: Microparticles, Chitosan, Saponins, antibacterial activity.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la escasez y contaminación del agua, es un problema a nivel mundial, porque puede ser un riesgo serio para la salud de la población. Se estima que 842,000 muertes al año son ocasionadas por enfermedades de origen hídrico, que se producen por consumo, contacto y/o escases de agua que se encuentra contaminada. Los principales contaminantes presentes en agua pueden ser compuestos químicos, sedimentos, sólidos suspendidos y compuestos biológicos, como virus, parásitos y bacterias (OMS, 2019). Las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Vibrio cholerae* son algunas de las principales bacterias que provocan problemas gastrointestinales en los humanos. La severidad de estos padecimientos puede ser muy variada dependiendo de la edad, el estado de salud, nutrición, entre otros factores que provocando que la población sea más vulnerable a estos padecimientos (Coria, 2014).

Hoy en día se buscan nuevas alternativas que resulten efectivas contra los microorganismos patógenos contaminantes del agua. En la actualidad ya se cuenta con diferentes métodos que permiten obtener agua potable con la calidad adecuada para el consumo humano. Existen métodos químicos, físicos y/o mecanismos, que ocasiones es necesario el uso combinado de estos para cumplir con el objetivo de la potabilización del agua. Esto ha motivado la búsqueda de nuevos compuestos naturales antibacterianos, como una alternativa, para reducir y prevenir este gran problema de salud pública (Rodríguez *et al*., 2014). En relación a estas nuevas alternativas, se busca que los materiales o compuestos a utilizar sean seguros para la salud, amigables con el medio ambiente, económicos y accesibles para la población.

Durante los últimos años ha aumentado el uso de compuestos naturales, como es el caso de plantas o partes específicas de ellas, debido a que los extractos o compuestos que se extraen pueden contenerte una importante actividad biológica (OMS, 2001; Pereo, 2015). La planta de *Yucca baccata* se pueden obtener metabolitos de saponinas, compuestos con propiedades anticancerígenas, anti-fúngicas, antiparasitarias y antibacterianas (Pereo, 2015). Por otra parte, el quitosano (Qs) es un polímero de origen natural, derivado del proceso de desacetilación termoalcalina de la quitina, que ha destacado como un potencial antimicrobiano que puede ser utilizado contra algunos microorganismos resistentes a antibióticos. Además, es un biopolímero que se ha propuesto como un material de cubierta de sistemas de encapsulación e inmovilización

de compuestos, además de producir sistemas estables y viables para su aplicación en el área alimenticia, cosmética y farmacológica (Villena, 2009).

Ya se ha analizado individualmente la capacidad antibacteriana de los compuestos antes mencionados, pero no se han realizado estudios para examinar el efecto que puedan tener en conjunto, por lo que representa un área disponible para investigación. Por lo anterior, la presente investigación tiene como objetivo el análisis del efecto de las micropartículas compuestas de quitosano y extracto con saponinas de la planta de *Yucca baccata* para su potencial uso en la reducción de la carga bacteriana que pudiera estar presente en agua.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Agua y su Contaminación

El agua es un nutrimento esencial para los seres vivos debido a que interviene en múltiples funciones del cuerpo humano. Por eso, debe de ser limpia y de alta calidad para su consumo sin riesgo. Pero en ocasiones suele contaminarse con facilidad y provocar brotes infecciones importantes (OMS, 2001). Algunos datos de la OMS, establecen que a nivel mundial 842,000 personas mueren cada año como consecuencia de la insalubridad del agua, problemas en el saneamiento e higiene deficiente (WHO, 2011).

El agua salubre y fácilmente accesible es importante para la salud pública y desde 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció que el acceso al agua potable es un derecho humano. En México en 2015, el 95% de la población ya contaba con cobertura de agua potable según el INEGI, pero no necesariamente con la calidad adecuada para su consumo.

Se establece que el agua potable, es aquella que cumple con 48 parámetros de calidad que abarcan desde pH, dureza, conteo de microorganismos, minerales, y otros que son reconocidos por la Norma Oficial Mexicana 127-SSA1-1994. En algunos estudios realizados, como el de Mezari *et al*, 2010, han mencionado que el agua que llega a los domicilios de las familias mexicanas es medianamente aceptable, y durante el abastecimiento a los hogares es donde se produce mayormente el deterioro en su calidad.

La contaminación del agua puede ocurrir por la presencia de compuestos químicos, sedimentos, sólidos suspendidos y compuestos biológicos. Los contaminantes biológicos hacen referencia a microorganismos como bacterias, virus y parásitos intestinales, que tienden a ser peligrosos para el ser humano. Muchas enfermedades infecciosas son causadas por bacterias que se pueden encontrar en el agua, como lo son *Escherichia coli*, *Salmonella* spp*, Yersinia* spp*, Shigella* spp*, Vibrio cholerae* y *Campylobacter jejuni* (Coria, 2014).

Por otro lado, se han realizado algunas investigaciones en diversas regiones de México para analizar la calidad y el abasto del agua potable en la población. En Chihuahua se estudió la calidad del agua que era suministrada al municipio de Ascensión, y el agua muestreada mostró

contaminación microbiológica, ya que los conteos de coliformes totales y fecales fueron superiores a los establecidos en las normas mexicanas, lo que puede ser un factor de riesgo para la salud de esa población (Rubio *et al*., 2015). También en el estado de Sonora, en el municipio de Navojoa se reveló la presencia de contaminación microbiana del agua potable. Debido a la presencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp, lo que alertó a los sistemas de salud y dejó evidencia de que a pesar de que existen diferentes métodos para asegurar la calidad del agua, estos no son del todo efectivos y la contaminación del agua continúa siendo un gran problema a nivel mundial por ser considerado uno de los factores causantes de muerte y enfermedades en muchos países (OMS, 2017; Coria, 2014; Anduro *et al*., 2017).

2.1.2 Enfermedades de Origen Hídrico

El resultado del consumo de agua insalubre o contaminada deriva principalmente en enfermedades conocidas como hídricas o de origen hídrico. Estas enfermedades pueden afectar a los humanos por diferentes vías, como lo son la vía oral, al consumir agua contaminada, tópica, al tener contacto con agua contaminada; o mediante vectores, que pueden desarrollarse en este mismo medio (OMS, 2017).

Estas enfermedades se pueden clasificar en diferentes categorías, dependiendo de su mecanismo de acción: 1) Enfermedades por ingesta de agua potable donde el agente patógeno o sustancias químicas se encuentren presentes en el medio. 2) Las que son producidas cuando algún patógeno vive o su ciclo de vida se desarrolla en el agua, como la malaria. 3) Enfermedades relacionadas con la escasez de agua que impide tener adecuadas prácticas de higiene que pueden poner en riesgo la salud (OMS, 2017). En el cuadro 1 se enlistan las principales enfermedades relacionadas con el agua que afectan a la población, junto con su posible agente causal

La severidad de las infecciones adquiridas por el consumo de agua contaminada, también están influenciadas por el estado de salud y nutricional del hospedero, la edad, el peso, la alimentación, tipo de nutrimentos consumidos, así como la higiene; siendo los niños, adultos mayores y personas inmunodeprimidas las que presentan mayor riesgo (Weiss, 2017; Dobner y Kaser, 2018).

Cuadro 1. Principales enfermedades de origen hídrico.

Grupo de enfermedades	Agente responsable	Enfermedades
Transmitidas por el agua	Virus hepatitis Ay E	Hepatitis infecciosa
	Shigella spp	Gastroenteritis
	Vibrio cholerae	Gastroenteritis
	Escherichia coli	Gastroenteritis
	Campylobacter spp	Gastroenteritis
	Salmonella spp	Fiebre tifoidea
	Giardia lamblia	Giardiasis
	Cryptosporidium spp	Criptosporidiosis
Producidas por carencia de agua	*Salmonella paratyphi*	Fiebre paratifoidea
	Chlamydia trachomatis	Infección en ojos
	Sthapylococcus aureus	Infección en piel
Causada por agentes que se pueden desarrollar en el agua	*Plasmodium vivax*	Malaria
	Flavivirus	Fiebre amarilla
		Dengue

Adaptado de CONAGUA, 2007.

En el año 2012, las enfermedades hídricas estaban entre las primeras 20 con más casos registrados y dentro de los padecimientos que más destacan, son los problemas gastrointestinales, hepatitis, amibiasis, siendo las enfermedades diarreicas la segunda causa de muerte en niños de todo el mundo (OMS, 2017). Una de sus principales causas fue el uso de aguas residuales sin tratamiento en el riego de alimentos que se consumen crudos, pero también se incluyó al agua subterránea, que es una de las principales fuentes de abastecimiento, con contaminación bacteriana y sustancias químicas (Mezari *et al*., 2010; OMS, 2017; Dobner y Kaser, 2018). Generalmente estos padecimientos pueden presentarse en un corto tiempo, pero es necesaria la intervención médica

para evitar consecuencias graves para la salud de la persona o de la población en general (Galdos *et al*., 2017). En su mayoría, los microorganismos patógenos que pueden desencadenar enfermedades por consumo de agua contaminada tienen diferentes características, comportamiento y resistencia, por lo que sus consecuencias pueden ser de igual manera muy variada y por lo tanto esto puede demandar el uso combinado de algunos tratamientos de agua para poder eliminar sus contaminantes (OMS, 2017).

2.1.3Tratamiento de Potabilización del Agua

La lucha contra las enfermedades infecciosas causadas por el consumo de agua contaminada es objetivo primordial de salud pública. Muchos países han buscado diferentes alternativas seguras para mejorar la calidad del agua (OMS, 2017). El principal objetivo de la potabilización del agua es asegurar su calidad., en México se utilizan dos normas referentes a la calidad, el tratamiento adecuado y el abastecimiento del agua. La NOM 127-SSA1 y la NOM 230-SSA1, tienen como objetivo establecer los límites permisibles de contaminantes y los tratamientos de potabilización de agua para el uso y consumo humano, que deben cumplir los sistemas que abastecen el agua de manera pública en territorio nacional.

Dentro de los principales métodos para desinfección del agua se encuentran los físicos-mecánicos (calor, rayos UV, la radiación solar, tamices o filtros) y los métodos químicos (ozono, permanganato de potasio, cobre, plata y halógenos) (Camacho, 2011; Reyes, 2016).

El mecanismo de acción de los agentes físicos generalmente inducen daño a la membrana celular del microorganismo, lo que ocasiona una alteración irreversible que le ocasionando la muerte. Por otro lado, los métodos químicos actúan como desinfectantes o antisépticos y deben tener la propiedad de inactivar a un amplio espectro de microorganismos, de manera rápida, no tóxica, no corrosiva, y sin potencial alergénico. El uso de filtros como método mecánico, consiste en la separación de partículas y pequeñas cantidades de microorganismo que atraviesan un material poroso donde quedan retenidas (Camacho, 2011; Reyes, 2016). En ocasiones es necesario el uso de diferentes procesos de tratamientos combinados, como se enlistan en el cuadro 2, tal como se usan en México para lograr una reducción de los agentes que contaminan el agua (OMS, 2017).

Cuadro 2. Principales métodos utilizados para tratar agua en México

Agente contaminante	Tratamiento
Bacterias, helmintos, protozoarios, virus	Cloro, compuestos de cloro, yodo, ozono, luz ultravioleta; plata iónica o coloidal; coagulación-sedimentación-filtración; filtración en múltiples etapas.
Arsénico, Aluminio, bario, cadmio, cianuros, cobre, cromo total, plomo, fierro, manganeso, mercurio, nitratos y nitritos	Coagulación-floculación, sedimentación-filtración; intercambio iónico u ósmosis inversa.
Cloruros	Intercambio iónico, ósmosis inversa o evaporación.
Fenoles o compuestos fenólicos	Oxidación-coagulación-floculación-sedimentación-filtración; adsorción en carbón activado u oxidación con ozono
Fluoruros	Alúmina activada, carbón de hueso u ósmosis inversa.
Hidrocarburos aromáticos	Oxidación-filtración o adsorción en carbón activado.
Plaguicidas, trihalometanos	Adsorción en carbón activado granular.
Sodio	Intercambio iónico.
Sulfatos	Intercambio iónico u osmosis inversa.
Zinc	Evaporación o intercambio iónico.

Adaptado de NOM-127 SSA1-1994

A pesar de contar diferentes métodos para asegurar la potabilización del agua, en la actualidad se buscan continuamente nuevas alternativas que garanticen la calidad del agua sin afectar la salud de las personas y además sean económicos (Reyes, 2016). Actualmente, estas comprenden el uso de productos naturales seguros como polímeros, extractos de plantas y algunos aceites esenciales.

Además, durante los últimos años se han creado nuevos sistemas de tratamiento basados en el uso de superficies funcionalizadas con compuestos bioactivos que pueden usarse para desarrollar membranas filtrantes (Díaz *et al*., 2015; Arcila y Peralta, 2016).

Es importante estudiar nuevas técnicas y materiales que tengan uso potencial en procesos de potabilización del agua que incluyan la reducción de costos energéticos y operacionales, que permitan su implementación y sostenibilidad, (Caviedes *et al*., 2015). Así como desarrollar sistemas que incluyen productos naturales que han surgido durante los últimos años como nuevas alternativas para evitar daños a la salud, mejorando la calidad del agua (Fuentes *et al*., 2014).

2.2 Quitosano

Los polisacáridos son carbohidratos poliméricos compuestos por cadenas largas de monosacáridos unidos con enlaces glucosídicos. Son una fuente importante de energía para diferentes seres vivos tales como la celulosa, o tener funciones estructurales como la quitina el cual es el segundo biopolímero más abundante en la tierra (Velázquez, 2013; Barragán *et al*., 2016).

La quitina es un polisacárido natural formado por unidades residuales lineales de N-acetil-D-glucosamina con uniones β-1-4. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, ya que es el principal componente estructural de algunas algas, hongos, insectos, arácnidos. La mayor fuente se consigue del exoesqueleto de cangrejo y camarón, que se obtienen como subproducto desaprovechado en la industria pesquera (Fornaguera y Gómez, 2011; Ferraro *et al*., 2015). El Qs se obtiene mediante un proceso químico de desacetilación termoalcalina de la quitina, que induce la formación de una estructura principal de poli β-1-4 glucosamina con carga catiónica (Fig. 1) y determinado grado de acetilación. Este polímero es considerado biocompatible, no tóxico, hemostático, bioadhesivo y biodegradable enzimáticamente. Además de destacarse por tener función antioxidante, antifúngica, antibacteriana y su capacidad para atrapar metales pesados (Ferraro *et al*., 2015; Porchezhiyan y Noorjaham, 2017).

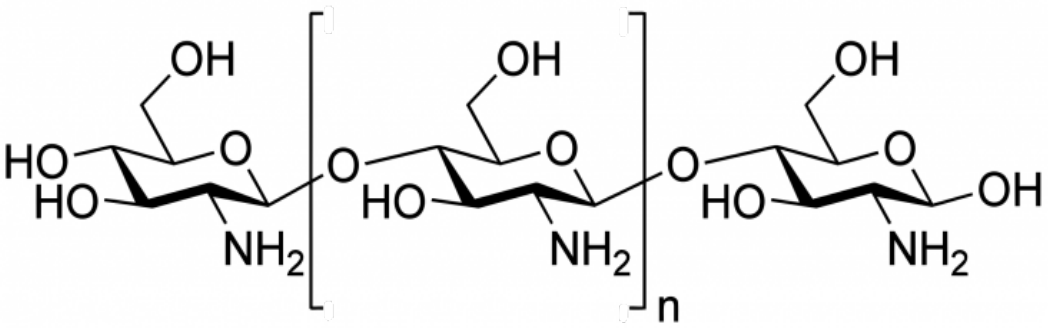


Figura 1. Estructura química de quitosano

El grado de acetilación de Qs se puede definir como el número total de unidades de N-acetil-D-glucosamina que hay en el biopolímero y es una medida de pureza del biomaterial, siendo uno de los parámetros estructurales más importantes de la quitina y el quitosano (Gacén, 1996; Barragán *et al*, 2016). La quitina se encuentra 100% acetilada y el quitosano se puede hallar en diferentes rangos que van desde 10 hasta 90% de desacetilación y sus grupos amino permiten que se solubilice fácilmente en medios ácidos, confiriéndole una innumerable cantidad de aplicaciones (Giraldo, 2013).

2.2.1 Efecto Antibacteriano de Qs y Mecanismo de Acción

Con el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, se han investigado productos que pudieran funcionar de manera alternativa, por lo que el uso de quitosano en el área farmacológica ha sido ampliamente estudiado. La actividad antimicrobiana de quitosano ha sido demostrada contra diferentes bacterias, hongos y su amplia actividad ha sido estudiada considerando factores como el pH, naturaleza del microrganismo, grado de acetilación, peso molecular de Qs (Kong *et al*., 2010).

Existe evidencia que el efecto antibacteriano por quitosano depende de la naturaleza del microorganismo, debido a las diferencias que existen en la membrana celular de las bacterias (Fig. 2). Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa de lipopolisacáridos que proporcionan a las bacterias propiedades superficiales hidrofílicas, esta membrana sirve como

barrera de macromoléculas y toxinas hidrofóbicas. En el caso de las Gram positivas la pared celular se compone de peptidoglicanos y de ácido teicoico que es esencial para el correcto funcionamiento de múltiples enzimas; por lo que la actividad antibacteriana del compuesto depende de las características superficiales de las células y su interacción con el Qs, haciendo más o menos eficiente su actividad antimicrobiana (Giraldo, 2015; Ayala, 2015; Karavanja *et al*., 2019).

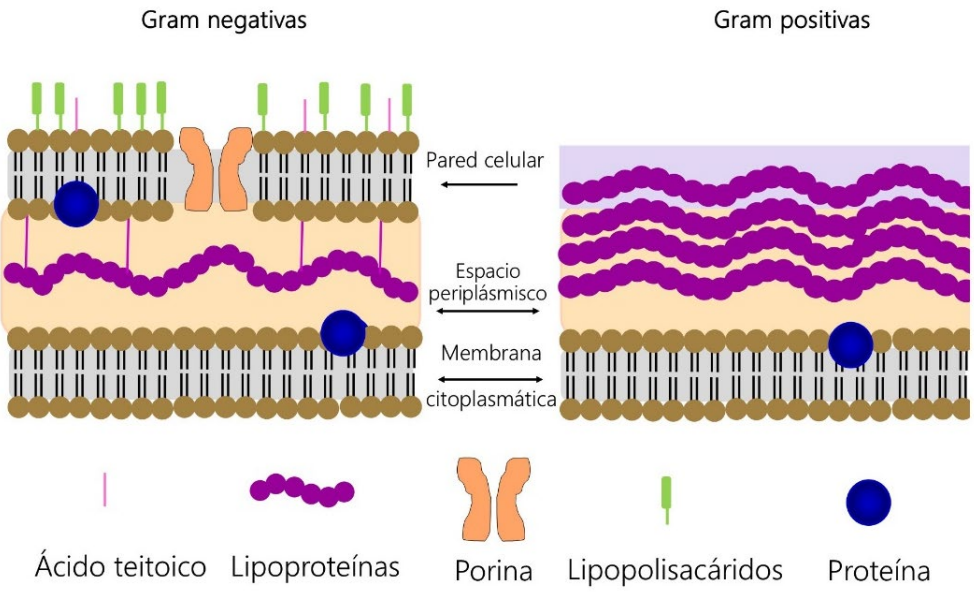


Figura 2. Representación general de la pared celular de bacterias Gram negativas y positivas.

Numerosas publicaciones han mencionado que la actividad antibacteriana de Qs tiene relación a su peso molecular y grado de acetilación. Se ha establecido que la atracción, interacción iónica y la movilidad, en cadenas de tamaños más pequeños podría facilitar más la unión a la membrana celular bacteriana (Abedian *et al*., 2019). De acuerdo a reportes previos, se ha encontrado actividad antibacteriana de quitosano contra *Salmonella entérica* spp, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y se ha reportado que Qs de peso molecular bajo puede inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella entérica* (Balachandar *et al*., 2017).

Por otro lado, Fang *et al*. (2014), analizaron la aplicación de micropartículas de Qs para la reducción de *Vibrio vulnificu*s y *Vibrio parahaemolyticus* presentes en mariscos crudos. Los tratamientos que se utilizaron para la reducción de *Vibrio* spp afectaron la calidad de los mariscos y se buscó una nueva forma de tratar la contaminación. Se utilizaron micropartículas cargadas con Qs en diferentes concentraciones y se observó la disminución en el crecimiento de las bacterias de *Vibrio* spp., pero se realizaron modificaciones en el uso de agua o la temperatura para obtener mejores resultados. Por lo anterior, se ha concluido que el Qs tiene efecto antibacteriano contra distintas bacterias ya sea Gram negativas o positivas, por ejemplo *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli, Aeromona hidrophila, Edwardsiella ictaluri, Flavobacterium columnare* y *Burkholderia* spp (Kamjumphol *et al*., 2016).

Otro factor de importancia que se ha reportado en la literatura, es el efecto que puede ejercer el grado de acetilación que presenta el compuesto, donde se ha mencionado que el efecto antibacteriano es superior cuando el grado de acetilación disminuye. Lo anterior puede deberse a que a un mayor índice de desacetilación se tienen mayor cantidad de grupos aminos libres con cargas electrostáticas disponibles para interaccionar con la membrana bacteriana (Karavanja *et al*., 2019).

El efecto del pH en la actividad antibacteriana de Qs se ha demostrado en diferentes investigaciones y se considera como uno de los factores más importantes. Se ha reportado que la mayor actividad se da cuando existen medios ácidos y la actividad puede ir debilitándose mientras aumenta el pH. Lo anterior puede deberse a que la mayoría de los grupos aminos presentes en la estructura solo están protonados a pH ácidos y por lo tanto en pH neutro o alcalinos no pueden ejercer el efecto antibacteriano (Kong *et al*., 2010; Karavanja *et al*., 2019).

Después de numerosas investigaciones se ha logrado proponer para Qs tres principales mecanismos de la acción antibacteriana. El primero es el más reportado y propone que las cargas positivas (NH_3) de la estructura de Qs interaccionan con las cargas negativas que se encuentran en la membrana de algunas bacterias, lo que puede provocar alteración y permeabilidad de la membrana, y esto inhibe el crecimiento de la bacteria. Durante el mecanismo de acción contra las Gram positivas, Qs se une no covalentemente al ácido teicoico de la capa de los peptidoglicanos, afectando la división celular, la protección contra estrés ambiental y uniones con receptores de la superficie. Contra bacterias Gram negativas, el mecanismo propuesto 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; Verlee *et al.*, 2017).

El segundo mecanismo consiste en la unión de Qs con el ADN celular mediante los grupos aminos protonados, lo que podría conducir a la inhibición en la síntesis de ARN microbiano y proteínas. El tercer mecanismo, propone el efecto quelante donde Qs se une de manera selectiva a metales traza, lo que inhibe la producción de toxinas y el crecimiento microbiano (Rabea *et al.*, 2003; Verlee *et al.*, 2017; Balachandar *et al.*, 2017).

Algunos reportes mencionan que para aumentar la actividad antimicrobiana que pueda tener quitosano, es mejor utilizarlo en sistemas de micro o nano partículas, ya que pueden aumentar la bioactividad y mejorar las interacciones de Qs con la membrana bacteriana. Además, se reporta que las micropartículas pueden tener mayor estabilidad y es posible la incorporación de algunos compuestos bioactivos para combinar su efecto contra microorganismos patógenos. Sin embargo la actividad antibacteriana de micro o nanopartículas de Qs aún no es concluyente y es necesario seguir realizando investigaciones que proporcionen más evidencia sobre la eficacia de estos sistemas (Ardila *et al*., 2017; Aires *et al*., 2019).

Se han reportado distintas investigaciones sobre el uso de micropartículas de Qs con función antibacteriana. Jeon *et al*., (2014) hizo análisis *in vitro* e *in vivo* sobre Mp de Qs para estudiar su efecto contra *Escherichia coli* O157:H7, donde utilizando la concentración 0.2% de Mp de Qs, inhibieron por completo a la bacteria y cuando el sistema fue aplicado en un modelo animal, tuvo diferencia en la disminución del crecimiento de la bacteria, además concluyeron que al controlar las condiciones de trabajo como el pH, podían aumentar la actividad antibacteriana de las Mp.

Durante una investigación realizada en 2016 por Zhengxin *et al*., en la universidad de Florida se elaboraron micropartículas de Qs. Se observó actividad antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli,* y *Salmonella* spp., que habían mostrado resistencia a antibióticos y después de haber estado en contacto con Qs, no produjeron más mutantes concluyendo que el quitosano es un candidato para tratar enfermedades infecciosas por varios días, sin provocar resistencia.

2.2.2 Aplicaciones de Quitosano

Desde la década de los noventas, la sobreexplotación de los recursos sintéticos y la contaminación que estos producen, han conducido a la búsqueda de su reemplazo por biopolímeros. Tras el paso de los años se han estudiado otros biopolímeros con un potencial alto para el desarrollo e innovación de nuevos materiales. Qs ha adquirido gran importancia en distintas áreas e incluso hasta desde el punto de vista comercial, por sus múltiples usos en diferentes industrias, como la alimentaria, cosmética y biomédica (Velázquez, 2013; Giraldo, 2013).

En la industria de los alimentos, el Qs ha sido utilizado para múltiples funciones, dentro de las que destaca el desarrollo de recubrimientos comestibles para proteger alimentos. Esta función se lleva a cabo por la presencia de grupos amino ($-NH_2$) en la estructura química, que le confieren propiedades únicas e ideales para la conservación y seguridad de los alimentos. Una de las características importantes en las películas biodegradables de Qs es la resistencia y flexibilidad que permiten una mejor manipulación y protección para los alimentos (Giraldo, 2013).

Los recubrimientos comestibles o películas biodegradables, cuentan normalmente con beneficios extras que resultan muy convenientes para sus usos y aplicaciones, ya que muchas de ellas contienen antimicrobianos naturales y además propiedades que retrasan el deterioro de frutas, hortalizas, granos y carnes. Un ejemplo de esta utilización es en productos cárnicos, donde retrasan la aparición de malos olores y se ha demostrado que cuando el Qs es utilizado en concentraciones mayores al 0.02%, puede reducir la carga de *Escherichia coli*, alargando la calidad del producto (Velásquez, 2013; Mármol *et al*., 2012; Bautista *et al*., 2017).

Otra de las áreas donde el uso de quitosano se ha explotado durante los últimos años, es en la biomedicina. En esta área su aplicación se ha ido extendiendo cumpliendo múltiples funciones, que van desde su utilización en membranas de hemodiálisis, suturas biodegradables, agente cicatrizante o sustituyente de piel, ayudando en la liberación de la insulina y su uso en sistemas liberadores de fármacos (Velásquez, 2013). Se ha buscado desarrollar alternativas poco invasivas que permitan acarrear compuestos bioactivos sin generar daño, utilizando principalmente las mucosas ocular, nasal y oral (Goycoolea *et al*., 2009, Morales-Burgos *et al*., 2018). Además, es importante aprovechar una de las características del biopolímero, que es la protección de macromoléculas bioactivas, que puede ser utilizado en diferentes áreas de la industria en general.

2.3. Saponinas

El creciente interés de las actividades biológicas de compuestos presentes en las plantas, ha logrado que se investigue cada vez más sobre sus contenidos fitoquímicos. En específico las saponinas son compuestos de origen vegetal, pero también se pueden encontrar en algunos organismos marinos (Yildirim y Kutlu, 2015). Químicamente son considerados glucósidos anfipáticos, que están compuestos por partes libres de glucósidos como glucosa, ramnosa y xilosa, y una parte lipídica que puede ser triterpenica o esteroidal (Fig.3) (Mena *et al*., 2015; Parra *et al*., 2018).

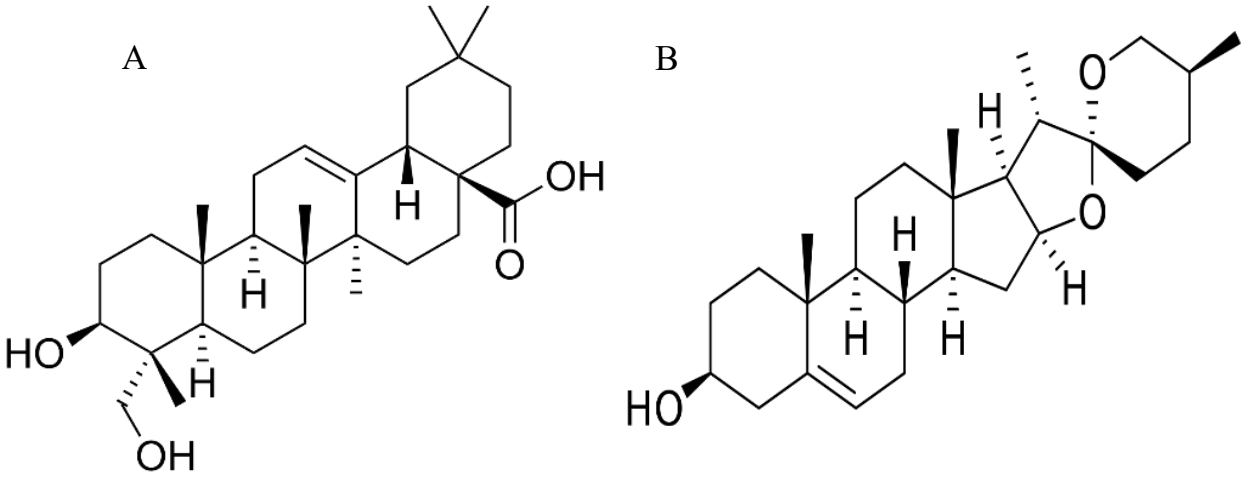


Figura 3. Estructura química general de una saponina triterpénica (A) y esteroidal (B)

Las saponinas están distribuidas ampliamente en la naturaleza, y se encuentran en algunas plantas pertenecientes a la familia *Agavaceae*, como *Yucca baccata*. La concentración de saponina que puede obtenerse de la planta dependerá de la parte de la *Yucca* seleccionada, la especie, factores ambientales y agronómicos relacionados al crecimiento de la planta (Güclu y Mazza, 2007). La planta de *Yucaa baccata* (Fig. 4) es una de las 40 especies de *Yucca* que se encuentra distribuida alrededor del mundo. Se encuentra principalmente en los desiertos de Coahuila, Sonora, California, Nevada, Colorado, Nuevo México y Texas (USDA, 2018).

Figura 4. Planta de *Yucca baccata* de una zona aledaña al municipio de Cananea, Sonora.

Se ha mencionado en diferentes investigaciones que las saponinas pueden interferir en la replicación del ADN celular previniendo la proliferación de células cancerosas de distintos tipos de cáncer como los de pulmón, colon, ovario, renal, próstata y mama. Con base a este hallazgo, se cree que la actividad citotóxica de las saponinas depende de su estructura, ya que puede interactuar con la membrana celular y también disminuir la tensión superficial de una solución acuosa. Se le atribuyen otras propiedades como las antivirales, antiinflamatorio, anti-fúngica y antibacteriana (Cabrera, 2005; Avello y Cisternas, 2010; Piacente *et al*., 2005; Carmona *et al*., 2017).

2.3.1 Función Antibacteriana de las Saponinas

Las saponinas son cada vez más investigadas por su actividad antibacteriana, especialmente contra bacterias Gram positivas como por ejemplo *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Además de ha demostrado que pueden tener efecto contra protozoarios y hongos. Su mecanismo de acción frente a las bacterias y protozoos, de manera general parece sustentarse en la formación de un complejo entre la saponina con las partes liposolubles como los esteroles de la membrana produciendo, lisis y muerte celular (Rodríguez, 2016).

Dependiendo la naturaleza de la saponina, se ha propuesto que las saponinas esteroidales como sitio de acción los mecanismos donde se llevan a cabo los procesos de síntesis que son vitales para la célula bacteriana. Las saponinas triterpénicas, tienen dos mecanismos. Cuando es hidrocarbúrica, generalmente tiene acción depresora sobre la tensión superficial, lo que ocasiona cambios en el entorno provocando que se altere la selectividad de la membrana citoplasmática de la bacteria y esto limita el intercambio de sustancias. Por otro lado, cuando su naturaleza es alcohólica, tienden a alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula ocasionando su muerte (Reddy *et al*., 2015).

En 2016 se evaluó la actividad antimicrobiana de plantas de *Yucca shidigera* y *Trigonella foenum-graecum*, frente a patógenos de importancia clínica. Se encontró que los extractos de las plantas podrían llegar a ser una excelente alternativa natural para tratar enfermedades nosocomiales por su alta efectividad antimicrobiana (Rodríguez *et al*., 2016). Un estudio llevado a cabo en Cuba reveló que las saponinas de *Solanum dolichosepaulm bitter* (frutillo) actuaba contra *Escherichia coli*, pero su efecto dependía de la concentración bacteriana y la presencia de otros metabolitos que podrían potenciar su actividad (Ramírez, 2017).

En investigaciones se ha demostrado que las saponinas provenientes de *Yucca*, tienen efecto antibacteriano específicamente contra bacterias Gram positivas y no actúan contra bacterias Gram negativas, pero este dato no es concluyente. Se ha demostrado que algunas cepas de *Escherichia coli* utilizan las saponinas para mejorar su crecimiento. Naturalmente, las membranas externas de la pared celular de las bacterias Gram negativas libres de colesterol están cubiertas en un 90% con lipopolisacáridos que contienen al lípido A, donde las saponinas interactúan y aumentan la permeabilidad de la pared celular bacteriana. Las células lesionadas o debilitadas pueden volverse más susceptibles a la acción de los desinfectantes convencionales, incluso a concentraciones bajas (Kregiel *et al*, 2017; Reddy *et al*., 2015).

2.3.2 Aplicaciones de las Saponinas

Las aplicaciones de las saponinas se ha extendido en diferentes áreas, como la alimentaria, minera, farmacéutica, y cosmética, esta última incluye la preparación de jabones y productos similares. En

la industria minera, su principal función es ayudar a la flotación de metales para que se desechen en el agua. Su uso en la tecnología de alimentos es la de facilitar la formación de espumas en las bebidas (Tapia *et al*., 1979; Quelal, 2010, Usiña, 2017). Otras, investigaciones demuestran que ayudan a la absorción de vitaminas, fármacos y además puede generar efectos sobre el colesterol en sangre. Actualmente, los estudios que evalúan sus propiedades son limitados y por lo tanto es un campo que permanece abierto a la investigación, sobre todo seguir buscando maneras eficaces de utilizar su actividad biológica para diferentes áreas de la industria y aprovechar al máximo las propiedades que hasta hoy se han estudiado (Wink, 2010; Tapia *et al*., 1979; Quelal, 2010).

3. HIPÓTESIS

Las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata* tienen actividad antibacteriana.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto antibacteriano de las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata.*

4.2 Específicos

1. Elaborar las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata.*

2. Caracterizar las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata.*

3. Evaluar las propiedades antibacterianas de las micropartículas compuestas por quitosano y extracto con saponinas de la planta *Yucca baccata.*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de la micropartículas se utilizó quitosano extraído a partir de cáscaras de camarón en el laboratorio de biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., con un peso molecular de 29,000 g/Mol y un grado de acetilación de 22%. El Qs fue disuelto en ácido acético glaciar (99.7% de pureza) al 0.2 M (v/v) dejándose en agitación constante por 24 h. Se utilizó tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma Aldrich 99%) para la gelificación iónica. Las saponinas inmovilizadas en las Mp fueron extraídas con n-butanol (JT Baker 99.4%) de la planta de *Yucca baccata*. Para la cuantificación de saponinas se utilizó un estándar de diosgenina (Sigma Aldrich 93%), ácido sulfúrico (JT Baker 98%), metanol (JT Baker 99.8%), p-Anisaldehído (Sigma Aldrich 98%). Para los ensayos microbiológicos se utilizaron las cepas ATCC reactivadas en caldo Mueller-Hilton (MH) (Difco Ref: 225250, Lote: 3240477) y sembradas en agar Mueller-Hilton (Difco Ref: 275730, Lote: 23193000), como control se utilizó sulfato de Kanamicina (Sigma Aldrich, Lote: BCBK4930V). Se utilizó agua bidestilada durante todo los procedimiento, excepto cuando se indica agua Milli-Q.

5.1 Elaboración de Mp compuestas de Qs/Extsap

5.1.1 Extracción de Saponinas de la Planta *Yucca baccata*

Las plantas fueron colectadas en Cananea Sonora, se etiquetaron y pesaron individualmente y se cortaron en piezas pequeñas (1 cm de grosor) para secarlas por exposición al sol durante 14 días. El tallo fue la parte elegida a estudiar, debido a que un estudio previo de nuestro grupo reveló a que este contiene la más alta concentración de saponinas de esa planta. Las piezas se molieron en un equipo Thomas-Whiley (Model 4, Laboratory Mill, EE.UU) hasta obtener un polvo con tamaño de partícula de aproximadamente 2 mm, el cual se procesó para la extracción y cuantificación de saponinas (León, 2012).

5.1.2 Elaboración y Cuantificación del Extracto con Saponinas (Extsap) de *Yucca baccata*

Para realizar la extracción de las saponinas se utilizó el método descrito por Newbold *et al*., (1997). El polvo obtenido del tallo de *Yucca baccata* (33 g/L), se suspendió en agua bidestilada dejando la mezcla por 24 h con agitación constante a temperatura de 25-30°C. Después se centrifugó a 3000 rpm (1008 *x g*) (Hermlee LaborTechnik Z200, Alemania) durante 10 min a temperatura de 4°C. Se filtró y se agitó la suspensión acuosa obtenida en un volumen igual de n-butanol y se dejó en agitación constante por 24 h. Posteriormente se realizó la separación de la fase acuosa; y la fase butanólica remanente fue secada usando evaporación a presión reducida a 65°C. Posteriormente se procedió a liofilizar la muestra del extracto, y el total obtenido fue pesado, etiquetado y almacenado hasta su uso.

Se realizó un análisis de UV-visible (Thermo Scientific, Genesys 10uv scanning, EE.UU.) para cuantificar las saponinas presentes en el extracto usando la técnica espectrofotométrica de Baccou *et al*., (1997). Para ello se pesaron 2 mg del extracto butanólico con saponinas del tallo de *Yucca baccata* y 2 mg del estándar de diosgenina (93%), y se aforaron con metanol a 10 mL. por separado. Con la solución de diosgenina se realizaron diluciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL (Fig. 5) para construir una curva calibración. Por otro lado, 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 bidestilada. De cada solución se agregaron 1 mL a cada una de las diluciones preparadas de diosgenina y a la muestra del extracto, se homogenizaron y se calentaron en un baño de agua a 100°C. El 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, el cual también se sometió a en un baño de agua a 100°C (Corning Hot Plate Stirrer PC351, EE.UU.).

Las muestras fueron preparadas por triplicado y se leyeron a 430 nm usando celdas de cuarzo de 1 cm^3. Con las lecturas obtenidas se realizó una curva de calibración (Fig. 6) para estimar la ecuación de la recta (Ecuación 1). De acuerdo a la técnica de cuantificación de saponinas, en presencia de sustancias esteroidales la coloración de la reacción final debe ser de color azul o verde y las triterpénicas, varía desde rosa, rojo o violeta (Hernández y Hermosilla, 2014).

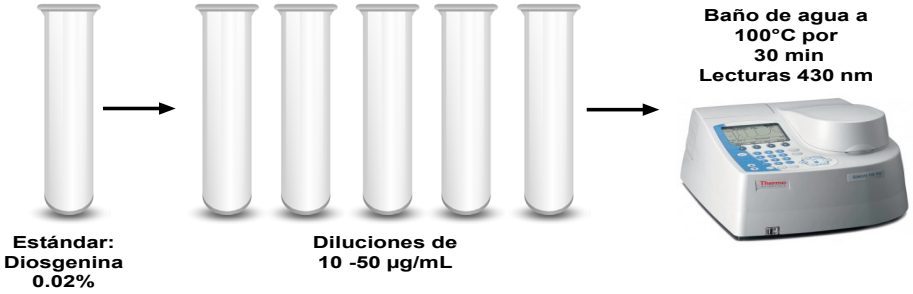


Figura 5. Esquema general de la cuantificación de saponinas del tallo de *Yucca baccata*

$$Ecuación\ 1: Y = Ax + B \quad (1)$$

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

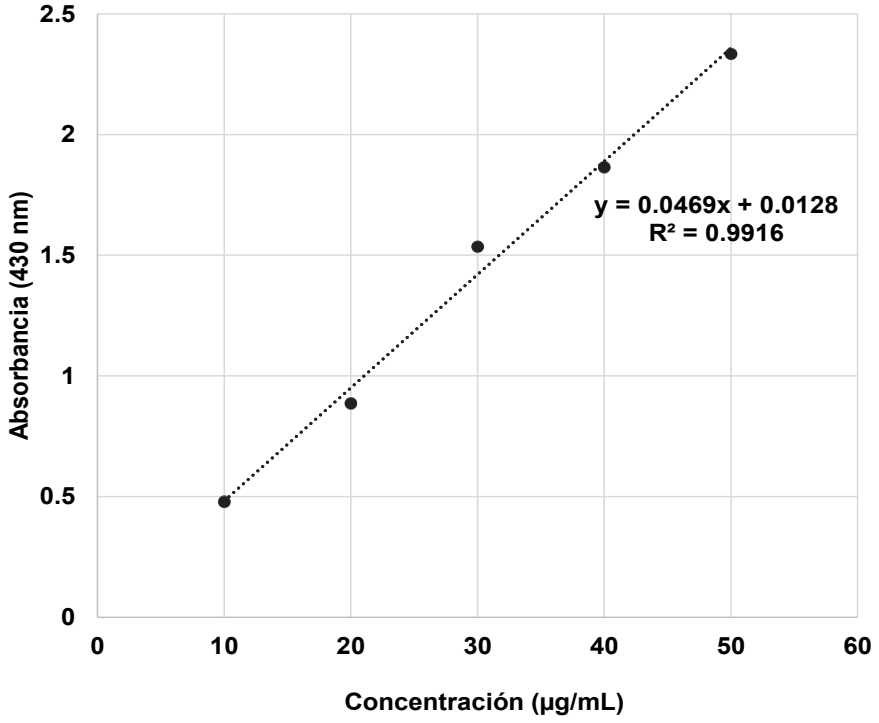


Figura 6. Curva estándar de diosgenina 93% utilizada para la cuantificación de saponinas esteroidales del extracto del tallo de *Yucca baccata.*

5.1.3 Preparación de la Solución de Qs/Extsap Para la Elaboración de las Mp y Gelificación Iónica

Para la elaboración de las Mp se utilizaron 120 mL de dos soluciones, la primera con una solución de Qs (2% p/v) en ácido acético (0.2 M v/v) y la segunda mezclando Qs (2% p/v) en ácido acético (0.2 M v/v) y extracto con saponinas (0.5% p/v) en agua bidestilada, que se preparó pesando y agitando el polvo del extracto, calentando a 50°C por 1 h y los sólidos no disueltos se removieron centrifugando a 6000 rpm (4000 *x g*) por 30 minutos. Las soluciones se mezclaron para homogenizar los componentes y la solución resultante se colocó en un baño de sonicación (Branson 1510R-MT, EE.UU.) para eliminar las burbujas que se produjeron con la agitación de las soluciones. La solución del baño reticulante se utilizó TPP (2% p/v) disuelto en agua bidestilada (Dima *et al*., 2013).

Para la elaboración de las Mp se utilizó el método de goteo controlado y baño recirculado. En la Fig. 7 se muestra el diagrama con el sistema para elaborar las Mp, compuesto por una bomba peristáltica (Easy-load master flex I/P, EE.UU.) usada para la recirculación de la solución TPP, una bomba para jeringa (Razel R99-EJ, EE.UU.) que se encargaba de controlar la presión (14.7 cc/h) de la solución de Qs/Extsap para formar las Mp y una bomba de vacío que suministraba una presión de 3 kg/cm^2 de aire para controlar el tamaño y la forma de las Mp.

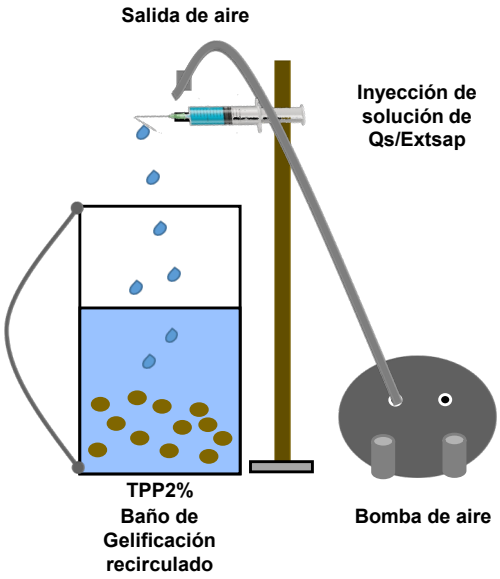


Figura 7. Sistema de elaboración de Mp

Una vez elaboradas, las Mp se dejaron en la solución de TPP en reposo por 30 minutos. Posteriormente, las Mp se recuperaron mediante lavados con agua bidestilada para neutralizarlas y dejarlas a un pH ≈7, y posteriormente se guardaron en agua Milli-Q en refrigeración 4 °C. El baño de recirculado de TPP se pudo reutilizar hasta cinco veces durante el proceso y la formación de las Mp se mantuvo estable.

5.2. Caracterización de las Mp

Para la caracterización de las Mp se utilizó un microscopio óptico de luz invertida (AmScope XSB-1ª, China) para medirlas y analizar su morfología. Se utilizó el objetivo 4X del microscopio acoplado a una computadora con el programa toupView 3.7, que permite visualizar y medir el diámetro horizontal en µm de las Mp, y conservar imágenes fotográficas de las mismas. El análisis de las características externas e internas de las Mp se realizó mediante microscopia electrónica de barrido con un equipo JSM 5410 LV scanning microscope (Japón) en el laboratorio del área de polímeros y materiales de la Universidad de Sonora. Para el análisis se eliminó la mayor cantidad

de agua posible de las Mp elaboradas, y se tomó una muestra, las cual fue congelada (FREZZE, EE.UU.) y liofilizada durante 24 horas, y se guardó en una estufa a 65 °C (Lindberg/Blue M01490A-1, EE.UU.) para tener la menor cantidad de humedad en la muestra. Posteriormente, la muestra se colocó en cinta de carbono y para darle propiedad de conductor, se recubrió con oro y se analizó al alto vació usando los objetivos de 35X, 500X.

El análisis con espectroscopia infrarroja transformada de Furier (FTIR) (Nicolet iS50 FT-IR Thermo scientific, EE.UU.) permitió detectar las frecuencias de resonancia (vibración) de las moléculas, debido a la presencia de enlaces característicos en Qs y de aquellos en saponinas que absorben luz infrarroja a diferentes longitudes de onda (Brugnerotto *et al*., 2001). El análisis de espectrofotometría se realizó con lecturas de absorbancia entre 4000 - 400 cm^{-1}. Se analizó la muestra de saponinas obtenida de la planta de *Yucca baccata* así como el quitosano y las Mp formadas por quitosano y por el extracto con saponinas, para analizar si existía interacción entre los componentes de las Mp. El Qs obtenido se identificó con las bandas características reportadas en la literatura y el espectro de las saponinas fue comparado con una saponina esteroidal comercial diosgenina con 93% de pureza de Sigma como referencia.

Se utilizó el espectrofotómetro de UV-visible para el análisis de eficacia de inmovilización, donde se colocó 1 g de Mp Qs/Extsap suspendidas en 5 mL en agua bidestilada, a las cuales se les realizó lectura en UV-visible cada hora (triplicado), utilizando un blanco de agua bidestilada y haciendo lecturas durante 25 h analizando la pérdida del Extsap y así cuantificar la cantidad de extracto que se quedó inmovilizada en las Mp. Para la medición de las lecturas antes se realizó un barrido de la muestra y se encontró que a la absorbancia a los 280 nm fue la más alta, por lo que cada lectura se hizo en esa longitud de onda.

Con las lecturas de la muestra se realizó la curva de calibración (Fig. 8) con R^2 de 0.99 y con la ecuación de la recta (Ecuación 2) se utilizó para calcular la concentración de Extsap perdido de las Mp.

Ecuación 2: $Y = Ax + B$ (1)

Dónde: Y es igual a la concentración de saponinas, X es igual a el resultado de la lectura a una absorbancia de 280 nm, a y b son las constantes dadas por la ecuación de la recta.

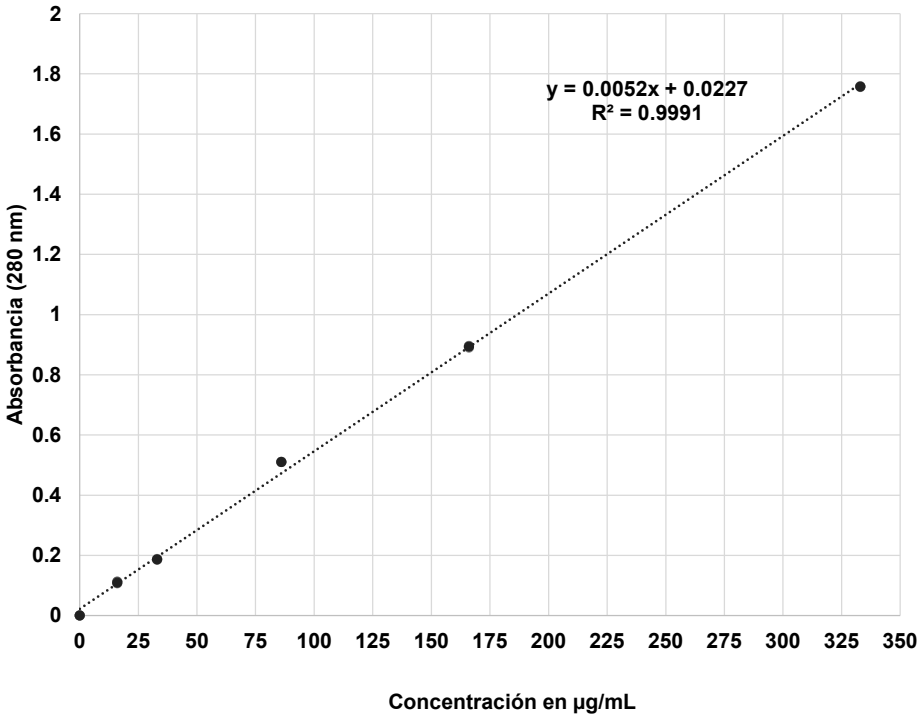


Figura 8. Curva de calibración de UV-visible para medición de eficiencia de asociación y eficiencia de liberación del Extsap de las Mp compuestas.

$$Ec.3\ Eficiencia\ de\ asociación = \frac{total\ del\ Extsap\ - pérdida\ de\ Extsap}{total\ de\ Extsap}\ x\ 100$$

$$Ec.4\ \ Eficiencia\ de\ carga = \frac{total\ de\ Extsap - \ pérdida\ deExtsap}{Peso\ total\ de\ Mp} x\ 100$$

5.3 Evaluación Antibacteriana Estimación del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento

Para el análisis microbiológico se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram negativa), *Salmonella tiphy* ATCC 14028 (Gram negativa), *Listeria monocytogenes* ATCC 76446 (Gram positiva) que fueron reactivadas en caldo MH y sembradas en agar MH a 37 °C durante 24 h. La propiedad antibacteriana de las Mp fue evaluada mediante la técnica de diluciones seriadas,

donde se utilizaron tubos estériles con 5 mL de caldo de cultivo (MH) inoculado con las cepas bacterianas mencionadas cuyo número se ajustó usando la escala de Mc Farland 0.5 (1,5 x 10.8 UFC/mL). Se realizó un conteo inicial del inoculo estandarizado de la bacteria tomando 0.1 mL del caldo MH el cual se sembró por duplicado en placa con agar MH a 37 °C durante 24 horas, el resultado del conteo de estandarización se tomó como referencia de crecimiento (conteo inicial).

Después de estandarizar el inoculo de la bacteria en los 5 mL de caldo MH, se agregaron de manera separada las Mp de Qs y las Mp Qs/Extsap en diferentes cantidades de 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se utilizó Kanamicina (1mg/mL) como control positivo y como control negativo el caldo MH con el inoculo de la bacteria.

Después de la incubación de las 24 h, se hicieron diluciones seriadas con solución salina al 0.85%, se tomó 0.1 mL del caldo inoculado MH con las cepas y se sembró por duplicado en placa con agar MH e incubado a 37 °C (Thermo Scientific Heratherm 66L, EE.UU.) durante 24 h (conteo final).

Con los resultados del conteo inicial y el conteo final en placa se estimó la inhibición del crecimiento de las cepas cuando estaban en contacto con las Mp y el resultado se expresó en porcentaje (Dima *et al*., 2013).

5.4 Diseño de Experimentos

Para la elaboración de las Mp se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2 para el análisis de las condiciones óptimas de elaboración entre tres variables de presión de aire y dos de flujo de inyección de la solución. Para la comparación del tamaño del diámetro de las Mp de quitosano y las Mp compuestas se aplicó la prueba de t-student. Se utilizó estadística descriptiva para datos de caracterización de las Mp (media, desviación estándar), y para los resultados del estudio microbiológico se realizó un diseño completamente al azar utilizando el análisis de Student Newman Keul´s para la comparación del porcentaje de inhibición de crecimiento entre los tratamientos de Mp de quitosano, Mp compuestas y el control. Se asignó un valor de $P<0.05$ para establecer las diferencias significativas y se realizó el análisis de comparación POST-HOC para la comparación entre grupos con el programa estadístico STATA 12.0.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Elaboración y Caracterización de Mp Compuestas por Qs/Extsap Elaboradas

6.1.1Rendimiento de Extracción y Cuantificación de Saponinas

Para la elaboración de las Mp se utilizó el extracto obtenido a partir del proceso de evaporación a presión reducida y liofilización del extracto butanólico de la planta de *Yucca baccata*, se observó un polvo fino de coloración amarillo-café con un peso correspondiente a 2.02 g por cada 48g de peso del tallo de la planta, que en porcentaje fue de 4.19%.

Se han reportado diferentes estudios sobre extracción de saponinas en plantas usando diversos procedimientos, concluyendo que el uso de solventes como el etanol, butanol, metanol y la mezcla de estos, son la mejor opción de extracción debido a la naturaleza polar que caracteriza a las saponinas (Rodríguez *et al*., 2017). Asimismo, se ha reportado que el butanol es el solvente con el que se obtiene mayor rendimiento de obtención de extractos con saponinas, en comparación con metanol y etanol. Algunos autores han reportado valores de rendimiento cercanos a los obtenidos en este estudio (4.19%). Flores *et al*., en 2013 obtuvieron un rendimiento de 3.90% utilizando butanol como solvente de extracción usando la planta de *Melisa Officinalis* "Toronjil". En otra investigación donde se compararon métodos de extracción de saponinas a partir de hojas de Agave *brittoniana Trel* y además se utilizaron tres solventes diferentes, se obtuvo mayor rendimiento cuando la extracción se realizó extracción con Soxhletl con butanol con un 12.3%, en comparación de la trituración de hojas frescas con un 9.73% y con maceración y etanol 4.70% (Fundora, 2016).

El análisis de FTIR confirmó que el extracto tenía saponinas del tipo esteroidal. En la Fig. 9 se observa el espectro de la muestra analizada y el estándar de diosgenina (93%), con vibraciones características de las saponinas esteroidales en las bandas cercanas a 3347 cm^{-1} correspondiente a los enlaces O-H; en 2916 cm^{-1} a la de los enlaces de C-H; de 1703 cm^{-1} a la del grupo C=O; de 1604 cm^{-1} para los enlaces C=C; y en 1040 cm^{-1} para los enlaces de C-O. Quillay *et al*., (2017) y Guerra *et al*., (2008) también publicaron resultados similares a los encontrados en nuestro estudio.

Además, en 2008, Flechas *et al*., observaron que el espectro de una saponina esteroidal tiene bandas dentro de los 900 cm^{-1} que es producido por el enlace del carbono 25 de su aglicona.

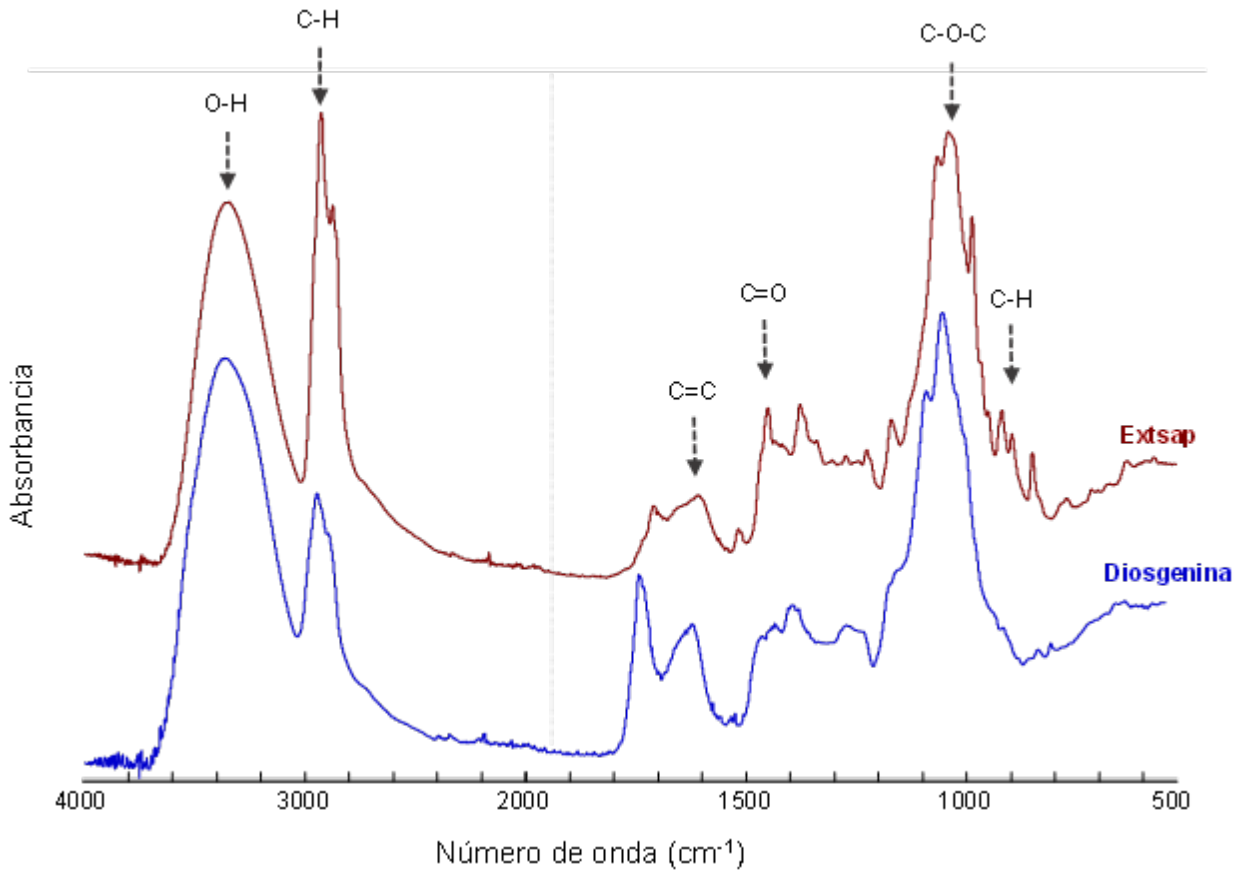


Figura 9. Espectro FTIR del Extsap de *Yucca baccata* y la referencia estándar de Sigma diosgenina 93% de pureza.

Se obtuvieron 31.40 µg de saponinas por mL de saponinas (equivalentes de diosgenina) por cada 200 µg de extracto butanólico, lo que representa una concentración de saponinas aproximada de 21.96% p/p del tallo de la planta de *Yucca baccata*. En la cuantificación de las saponinas de *Yucca baccata*, la coloración obtenida de la reacción fue de color verde, lo que confirma junto con el análisis de FTIR que se trata de saponinas esteroidales presentes en el extracto del tallo de la planta (Hernández y Hermosilla, 2014).

Se han reportado diferencias en el contenido de saponinas dependiendo de la parte de la planta que se utiliza para la extracción. En 2015, Mena *et al*., realizaron un estudio del contenido de saponinas en plantas conocidas como "jaboncillo", donde las saponinas se concentraron principalmente en frutos y semillas, con 750 mg/mL y 173 mg/mL respectivamente en comparación con la cantidad de 30.5 mg/mL contenidos en su tallo. En el caso de la planta de *Yucca baccata* se ha encontrado que las saponinas se concentran principalmente en el tallo (Pereo, 2015). Se ha reportado que el contenido de saponinas entre las diferentes plantas, depende de la variedad a la que pertenece, el clima, el suelo, la disponibilidad de agua, procedimientos de colecta y el tipo de almacenamiento de las muestras (Parra *et al*., 2018; Alcazár, 2016).

6.1.2 Descripción de Tamaños de las Mp Elaboradas

La distribución de tamaños medidos después de la elaboración de las Mp fue muy variado, obteniéndose una media general para las Mp de quitosano de 453.74 ± 150.43 μm, mientras que las Mp compuestas con el extracto con saponinas de la planta de *Yucca baccata* tuvieron una media general de 408.89 ± 156.36 μm. Después del análisis estadístico el resultado reveló que no existe diferencia ($P<0.05$) en el tamaño cuando se tiene inmovilizado el Extsap en las Mp. En la Fig. 10 se muestra la distribución de tamaño de las Mp por rangos de diámetro expresado en porcentaje, en la que se puede observar que la mayor cantidad de Mp se encuentran dentro de un diámetro entre 200-350 μm, y en el caso de las Mp de Qs presentaron rangos de tamaños de hasta 800-950 μm, mientras que la mayor distribución de las Mp Qs/Extsap se encontraban mayormente distribuidas dentro los rangos de menor tamaño. Como se puede observar tanto en la distribución de tamaños como en la media general, se observa que las Mp compuestas por Qs/Extsap presentaron rangos menores de diámetro que las Mp de Qs, lo anterior puede ser el resultado de la característica surfactante que tienen las saponinas, lo que brinda estabilidad a la solución, ayudando en la reducción del tamaño.

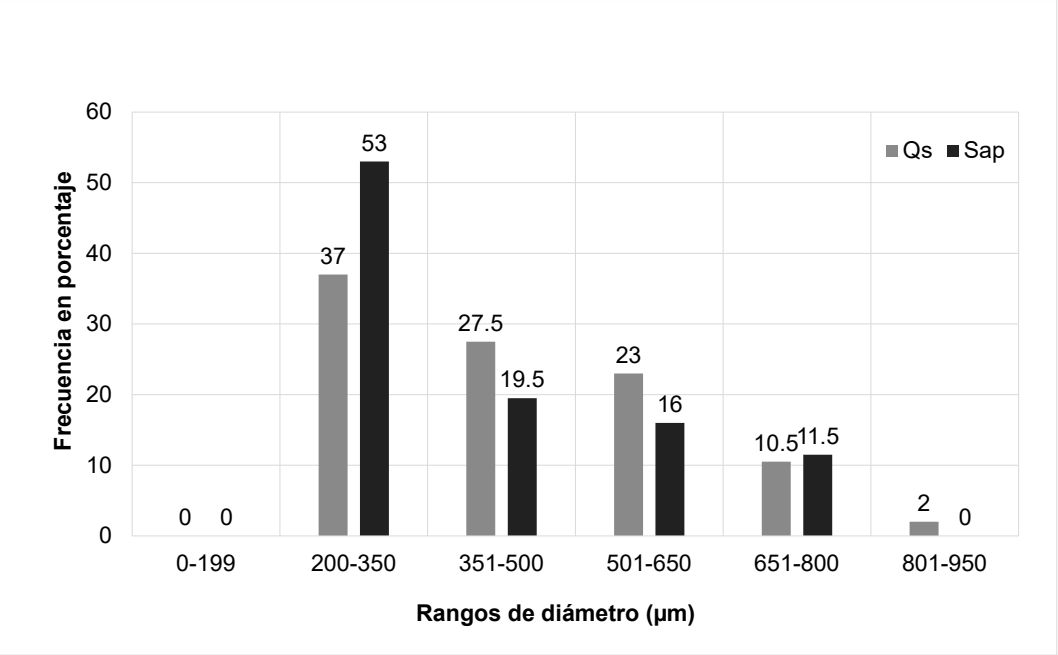


Figura 10. Distribución de tamaños de las Mp elaboradas.

Samrot *et al*., en 2016, elaboraron Mp de Qs por gelificación ionotrópica y goteo controlado, y obtuvieron partículas casi esféricas con tamaños variados comprendidos entre 50 a 300 nm. Ellos concluyeron que sus partículas presentaron tamaños más grandes cuando dentro de la matriz polimérica se encapsulaba algún componente y/o debido a que las interacciones que puedan presentarse entre sí. Así mismo, Moreno *et al*., (2018) encontraron que al utilizar micropartículas para suministro de vacuna oral de Qs encapsulando un antígeno de ovoalbúmina y saponinas, el tamaño de las partículas aumentaba y su estabilidad disminuía, y los autores atribuyeron esto a las interacciones que pudieron tener los componentes encapsulados.

Saniti *et al*., (2019) usaron una solución de saponinas y quitosano en pH ácido como estabilizantes de espumas, observando mayor eficacia cuando los compuestos estaban mezclados, ya que en conjunto presentaban mayor estabilidad las soluciones y además se disminuía el tamaño de las burbujas de la espuma, provocando mayor estabilidad. En algunas investigaciones se ha reportado que es de gran importancia el sistema de elaboración en el que se realizan las Mp, así como la técnica de gelificación, ya que tienen relación con el control de tamaño de las partículas (Lopera *et al*., 2009; Goycoolea *et al*., 2018; Riquelme y Arancibia, 2019).

6.2.2 Morfología de las Mp Elaboradas

El análisis de la superficie de las Mp que se realizó con el microscopio óptico de luz invertido reveló Mp predominantemente uniformes. El estudio mostró que las Mp de la solución de Qs formadas tenían un color blanco y uniforme, y en su mayoría eran esféricas como se muestran en la Figura 11 (A). Algunas de ellas mostraban daño en su superficie lo que pudo ser causado por el tiempo de permanencia en el baño de gelificación iónica, ya que al no completar su gelificación se sometieron a movimientos que posiblemente dañaron su morfología. Las Mp compuestas con el extracto con saponinas presentaron una coloración café y en su mayoría presentaron morfología aparentemente esférica como se pueden apreciar en la Figura 11 (B). La superficie de las Mp reveló residuos de Qs de algunas partículas que se colapsaron y se adhirieron a las Mp que se encontraban cerca.

Algunas investigaciones han concluido que el tiempo de reposo de las partículas para reticulares con el agente gelificante es importante al igual que la concentración de la solución utilizada para el baño de gelificación. Samrot *et al*., (2016) observaron que la concentración de TPP y el pH a la hora de elaborar sus partículas, tenían influencia en la mayor homogeneidad de sus Mp.

En 2012, Swamy *et al*., elaboraron microesferas de Qs y polimetil-metacrilato para la liberación de fármacos antihipertensivos. Los autores usaron la técnica de emulsión para formar sus Mp con superficies lisas y esféricas en un rango de tamaño promedio de 10 µm. Ellos concluyeron que las excelentes características que presentaron sus microesferas, se relacionaron a la dispersión correcta de todos los elementos en las soluciones trabajadas.

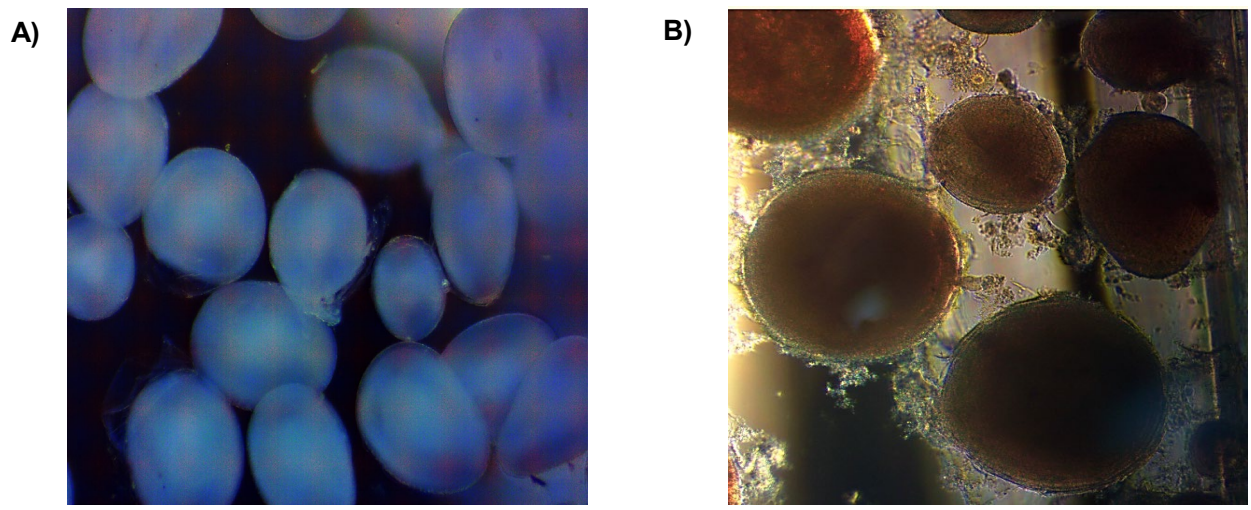


Figura 11. Imágenes de microscopia con objetivo 4x de las Mp realizadas mediante gelificación iónica. La imagen A1 y A2 son las Mp de Qs y la B1 y B2 son las Mp de Qs/Extsap.

Con los resultados obtenidos de la microscopia electrónica de barrido se pudo observar de manera más exacta la superficie de las Mp usando los objetivos 35X y 500X. Las micrografías con aumento de 35X revelaron que las Mp de Qs/Extsap (Fig. 14A) se encontraron colapsadas debido el proceso de liofilización que fue requerido para poder realizar las observaciones en el microscopio, mientras que las Mp de Qs presentaron estructuras completas y con superficie rugosa (Fig. 14B). Aguirre en 2011, elaboró Mp para encapsular biomoléculas, y el análisis de morfología reveló el colapso de algunas que encapsulaban las biomoléculas de interés. También observó que las Mp no eran esféricas, pero no mencionaba si el daño era dado por el encapsulamiento o el proceso previo requerido para el análisis, como sucedió en nuestro estudio. Barros *et al*., (2018) encontraron que cuando elaboraron Mp de Qs sin cargar ningún componente, se obtuvo mayor homogeneidad en la forma y tamaño, pero se tenían estructuras porosas y de superficie rugosa.

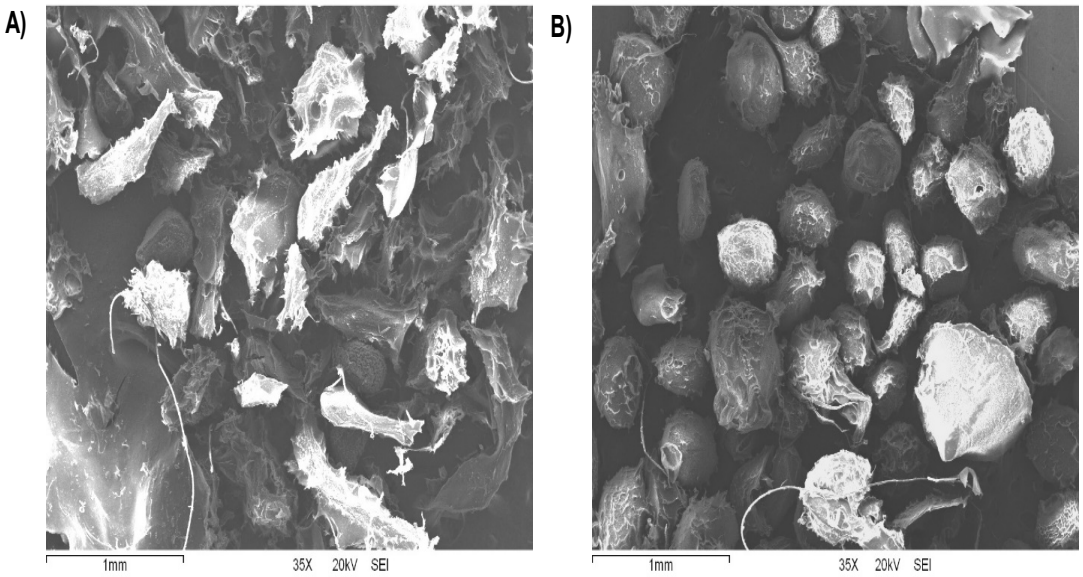


Figura 12. Micrografía de las Mp liofilizadas de Qs/Extsap (A) y Qs (B) utilizando aumento de 35X por microscopía electrónica de barrido.

Con las micrografías de aumento de 500 X, se pudo observar de manera más profunda el resultado de la liofilización antes mencionada. Las superficies de las Mp tenían diferencias claramente visibles, ya que aquellas que contenían el extracto presentaban mayor daño o su estructura se encontraba colapsada y se podían apreciar huecos, que pudieron ser provocados por el proceso de congelamiento, paso previo a la liofilización. Como se puede observar en la Figura 13, en la comparación de las dos micrografías obtenidas, las Mp de Qs presentaron una estructura menos dañada y de superficie más lisa. Estos datos, no son concluyentes ni generales de todas las Mp, ya que el proceso fue la principal causa del daño en la estructura, por lo que es necesario analizar otras técnicas para comprobar si se puede evitar este tipo de daños. Las Mp que se utilizaron para las pruebas microbiológicas, no presentaron colapso en su estructura debido a que no se liofilizaron y se utilizaron en húmedo, manteniendo su estructura y forma original.

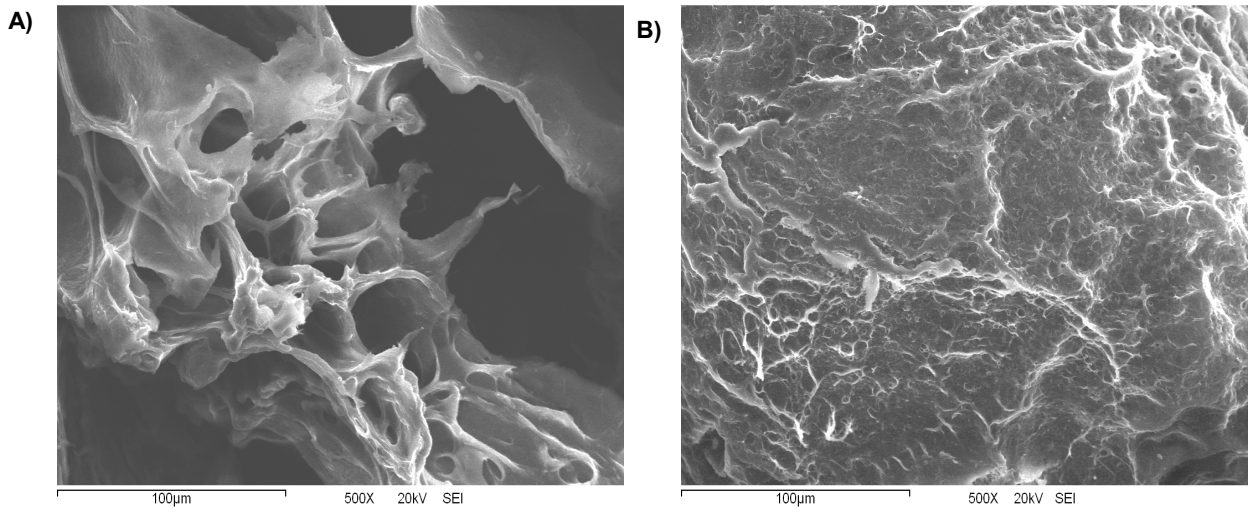


Figura 13. Micrografía de las Mp liofilizadas de Qs/Extsap (A) y Qs (B) observadas con aumento de 500X.

6. 2. 3. Eficiencia de Asociación y Carga del Extsap y Conformación de las Mp compuestas Qs/Extsap

Durante el proceso de elaboración de las Mp inmovilizando el Extsap, se pudo observar una coloración ligeramente café en el baño de gelificación donde se formaron las Mp, por lo posiblemente era debido a la pérdida del extracto. La eficiencia de asociación fue de 83.37%, lo que indica que se obtuvo una pérdida de 16.63% del extracto durante la elaboración de las Mp. Por otro lado, la eficiencia de carga de las micropartículas indica que por cada gramo de Mp se tiene 6% de Qs y 1.5% del Extsap en peso húmedo.

Para verificar la estabilidad del Extsap dentro de las Mp, se analizó la pérdida del extracto durante un tiempor determinado. Los resultados mostrados en la Fig. 14, la pérdida del Extsap se da de manera rápida dentro de las primeras 10 horas, para luego encontrar estabilidad, teniendo una pérdida máxima del Extsap de 149.27 ± 2.76 µg, lo que represente menos del 10% de la carga inicial. Este tipo de comportamiento se ajusta a un modelo de BoxLucas, donde se da una cinética de difusión de orden uno, que se caracteriza por una pérdida del componente de manera rápida durante las primeras horas que se administra, pero después llega a un equilibrio (Clussler, 2009).

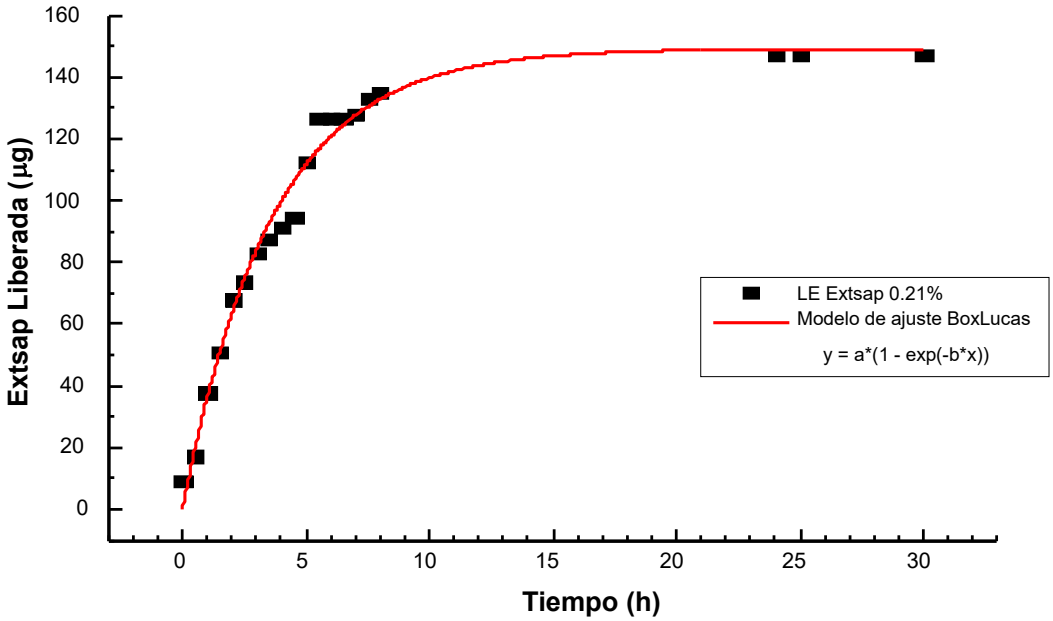


Figura 14. Cuantificación de pérdida del Extsap de las Mp compuestas.

La pérdida del Extsap pudo deberse a la conformación de las Mp, ya que es posible que el extracto a se quedó en la superficie de la Mp y no dentro de la red de quitosano entrecruzado con TPP, lo que facilitó su pérdida durante la elaboración o cuando se tenía en el medio acuoso.

En una investigación realizada por Luque-Alcaraz *et al*., (2016) donde elaboraron nanopartículas de quitosano para acarrear aceites esenciales como antimicrobianos, encontraron una eficiencia de asociación de 88% muy similar a lo encontrado en este estudio.

Caro-León *et al*., (2018) usaron nanopartículas de Qs elaboradas con secado supercrítico CO_2, donde incorporaron β-lactoglobulina en su estructura y obtuvieron una eficiencia de asociación del 74.2% con una eficiencia de carga del 37.1%. Además mencionaban que la pérdida de la β-lactoglobulina se debía a que esta se encontraba en la superficie de las nanopartículas y esto facilitaba su difusión en el medio, tal como sucedió en este estudio con el Extsap.

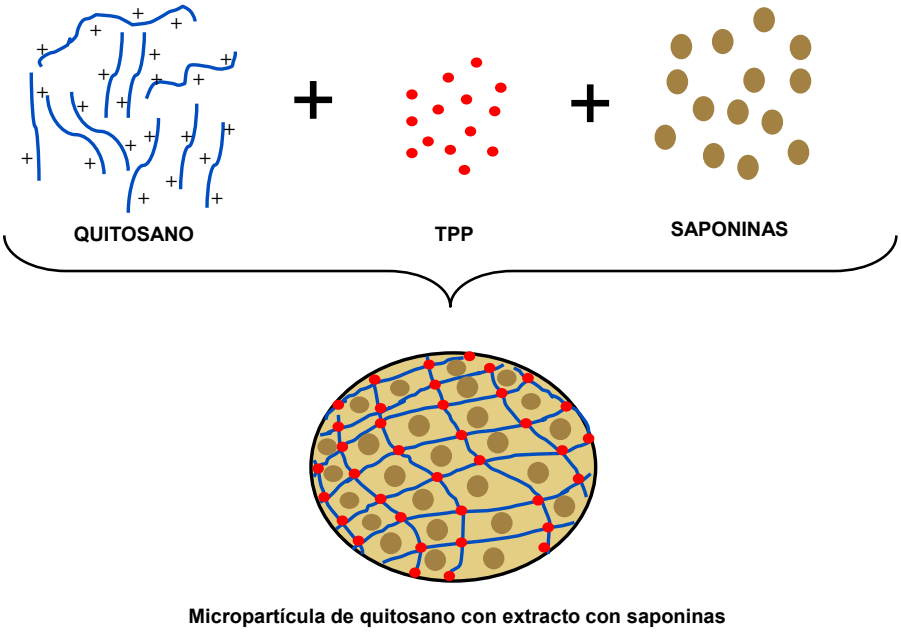


Figura 15. Esquema hipotético de la conformación de la micropartícula compuesta con quitosano y el extracto con saponinas de la planta de *Yucca baccata.*

En la Figura 15, se pueden observar la hipótesis de la conformación de la Mp cuando contiene inmovilizado el ExtSap, donde se tiene a las cadenas de Qs libres y al ser mezclados con la solución del extracto con saponinas y un agente gelificante (TPP) que ayudó a entrecruzar las cadenas de quitosano, se forma una red, lo que provoca que la saponina quede dentro de esa red, integrándose a la estructura interna de la Mp.

Para analizar si existía interacción entre los componentes de la estructura, se realizó un análisis de FTIR de la Mp compuesta. Se encontró que el espectro del análisis (Fig. 16) corresponde a las bandas características de Qs, donde el grupo O-H muestra la vibración a los 3358 cm^{-1}, el grupo N-H cercano a los 3208cm^{-1}, del grupo C-H a 2868cm^{-1}, del grupo amida a 1645 cm^{-1}, y del grupo C-O-C a las 1070 cm^{-1}; todas ellas características del espectro de quitosano, lo que concuerda con la literatura (Agulló *et al*., 2004). Además en el espectro de las Mp Qs/Extsap se observó la aparición de una banda a las 1200 cm^{-1} y a los 900 cm^{-1}, que puede deberse a la presencia de fosfatos del TPP que se utilizó para entrecruzar las Mp, como ya se ha reportado previamente (Salazar y Negrón, 2013).

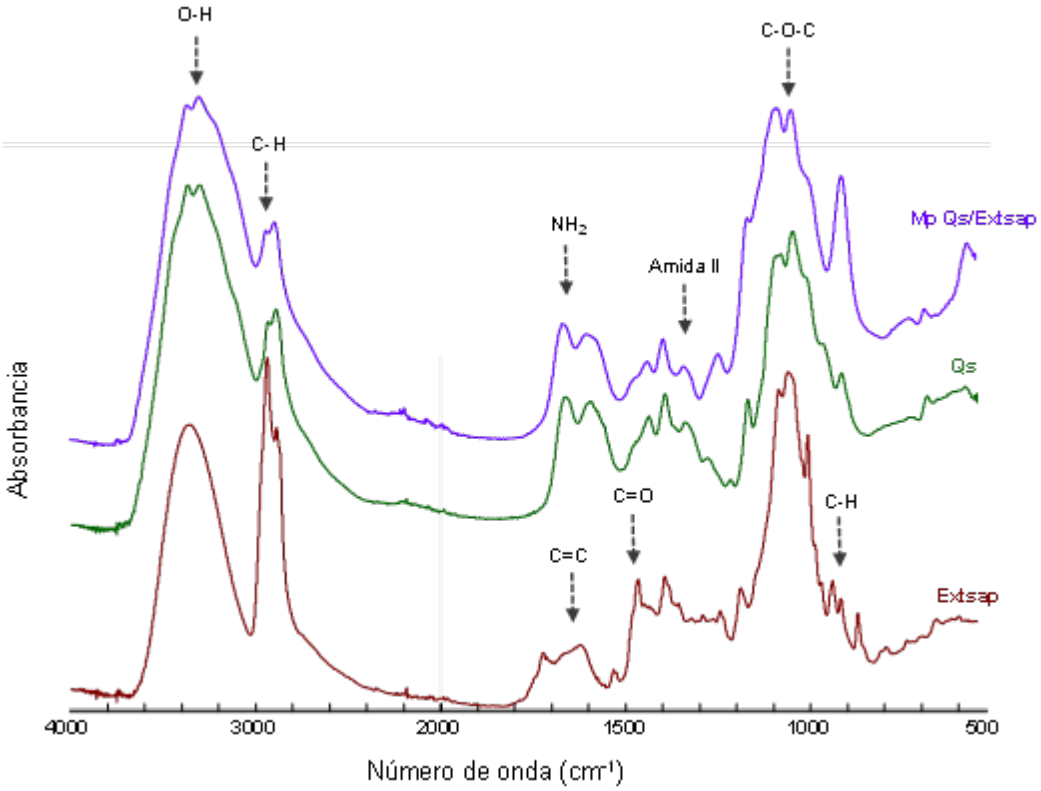


Figura 16. Espectro FTIR de Mp Qs/Extsap.

6.2 Ensayo Microbiológico de las Mp Compuestas por Qs/Extsap

En la actualidad existe información limitada sobre la evaluación antibacteriana de la mezcla de extractos con saponinas de la planta de *Yucca baccata* y Qs, pero existe evidencia por separado de cada uno de los componentes de las Mp. De acuerdo a la literatura el Qs al parecer tiene mayor efecto antimicrobiano sobre bacterias Gram negativas, lo cual podría explicarse a la carga catiónica del biopolímero que se une a las cargas aniónicas de la bacteria. Por otro lado, las saponinas tienen mayor eficacia antimicrobiana contra las Gram positivas, explicado por la estructura ya que las lipoproteínas de la membrana celular que permiten la unión con la parte lipídica de las saponinas (Reddy *et al*., 2015). En el Cuadro 4, se observan los resultados expresados en porcentajes de inhibición de crecimiento con las bacterias estudiadas.

El efecto antibacteriano de las Mp se esperaba que fue por el contacto de las bacterias suspendidas en el medio de cultivo MH y las cantidades de Mp agregadas. Los resultados obtenidos demuestran

que las cepas utilizadas fueron mayormente sensibles al estar en contacto con las Mp compuestas por Qs/Extsap, en comparación de las Mp de Qs solo. La bacteria más sensible a las Mp Qs/Extsap, fue la cepa de *S. typhi* porque mostró una inhibición mayor de 50% en contacto con la cantidad más pequeña usada de Mp (0.1 g) y de 99.99% a partir de 1.5 g de Mp Qs/Extsap. La cepa de *E. coli*, fue más sensible a las Mp compuestas en comparación a la observada con las Mp de Qs, pero en ambas, la cantidad de 2.0 g de Mp inhibió su crecimiento en un 99.99%. Por otro lado, *L. monocytogenes* demostró que al estar en contacto con 1.0 g de Mp de Qs/Extsap tuvo una eficacia del 56%, en comparación de las Mp de Qs que inhibió el crecimiento un 29%. Contrario a lo esperado, esta cepa solo presentó inhibición de 10% cuando se adicionó la cantidad de Mp más alta (2.0 g) de Mp Qs/Extsap.

Cuadro 2. Resultados de la evaluación antibacteriana de las Mp de Qs y Mp Qs/Extsap.

Bacteria	Cantidad de Mp (g)/5 mL MH	Mp Qs % de inhibición	Mp Qs/Extsap % de inhibición	Kanamicina
Escherichia coli ATCC 25922	0.1	00.00 ± 22.63 a	00.00 ± 0.07 a	99.99 ± 0.00 b
	0.5	00.00 ± 2.12 a	00.00 ± 1.41 a	99.99 ± 0.00 b
	1.0	00.00 ± 0.01 a	07.41 ± 1.41 a	99.99 ± 0.00 b
	1.5	37.03 ± 1.41 a	19.12 ± 5.65 a	99.99 ± 0.00 b
	2.0	99.99 ± 0.01 a	99.99 ± 2.82 a	99.99 ± 0.00 b
Salmonella Typhi ATCC 14028	0.1	54.23 ± 1.41 b	89.37 ± 4.95 b	99.99 ± 0.00 b
	0.5	66.36 ± 2.12 b	78.76 ± 0.70 b	99.99 ± 0.00 b
	1.0	65.62 ± 6.36 b	93.91 ± 1.41 b	99.99 ± 0.00 b
	1.5	94.59 ± 0.01 b	99.99 ± 0.01 b	99.99 ± 0.00 b
	2.0	99.99 ± 0.01 b	99.99 ± 0.01 b	99.99 ± 0.00 b
Listeria monocytogenes ATCC 76446	0.1	00.00 ± 2.82 a	00.00 ± 1.41 a	99.99 ± 0.00 b
	0.5	00.00 ± 0.01 a	00.00 ± 4.95 a	99.99 ± 0.00 b
	1.0	29.03 ± 1.41 a	56.25 ± 4.24 a	99.99 ± 0.00 b
	1.5	00.00 ± 2.12 a	00.00 ± 11.31 a	99.99 ± 0.00 b
	2.0	00.00 ± 0.71 a	10.00 ± 0.01 a	99.99 ± 0.00 b

Media ± DE. Diferente literal entre columnas significa diferencia entre grupos. ATCC: American Type Culture Collection.

Una investigación sobre la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de *Rumex criapus L.* contra bacterias de *S. aureus* (ATCC25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25992), concluyó que ambas cepas mostraron tener tan alta sensibilidad al extracto aplicado a una concentración del

30%, que incluso fue similar al antibiótico utilizado como control. La actividad antibacteriana del extracto etanólico ha sido atribuida a diferentes compuestos que se encuentran en la planta como taninos, flavonoides y saponinas (Soto *et al*., 2015). En este estudio se observó que *Escherichia coli* mostró sensibilidad a las Mp compuestas pero a una concentración mayor al de Kanamicina.

Otra investigación que evaluó el afecto antimicrobiano de microesferas de quitosano contra *Escherichia coli*, reveló una inhibición hasta de 97.5%. Al final se observó que en la medida de cambiar el pH desde 5.0 a 7.0, el efecto contra *Escherichia coli* fue mayor (Kong *et al*., 2008). En la presente investigación, los resultados del ensayo antibacteriano con las Mp se obtuvieron en condiciones neutras, ya que el medio de cultivo fue ajustado a un pH de 7.2 y las Mp tenían un pH de 7.0 (ajustado por lavados). En otra investigación donde se evaluó el efecto antibacteriano de micro y nano partículas contra *S. Typhi* y *S. aureus*, además del pH, el cambio en la temperatura y el tamaño de la partícula influían en la eficacia de actividad antibacteriana (Aridila *et al*., 2018).

Por lo anterior, es importante realizar más pruebas para poder analizar el comportamiento de las Mp en otras condiciones de pH, y con otras especies bacterianas.

En el presentes estudio observó un posible efecto sinérgico en las Mp compuestas por quitosano con el extracto de saponinas, ya que la concentración de 0.1 g inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* un 30% más que las Mp que solo contenían quitosano, además de presentar mayor efecto en el crecimiento tanto de *E. coli* y *L. monocytogenes*. Durante el ensayo microbiológico, no se observó daño en la estructura de las Mp de Qs ni en las Mp de Qs/Extsap.

7. CONCLUSIÓN

El sistema de baño recirculado y gelificación iónica permitieron obtener Mp compuestas por Qs/Extsap del tallo de *Yucca baccata* con un rango de tamaño de diámetro promedio de 408.88 ± 156.36 µm, con una estructura aparentemente esférica de coloración café, y con un contenido promedio de 14.94 mg/ml del extracto con saponinas.

Las Mp compuestas por Qs/Extsap tuvieron efecto antibacteriano en condiciones neutras (pH 7.0), contra cepas de *Salmonella tiphy*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytgenes* que ya han sido reconocidas como contaminantes microbiológicos en el agua potable. Los hallazgos de este estudio permitieron concluir que las Mp compuestas representan una posible alternativa como un sistema para aplicarse en la reducción de la carga bacteriana del agua.

8. RECOMENDACIONES

Debido al tiempo que conlleva la elaboración de las Mp elaboradas en este trabajo, se podrían explorar nuevas técnicas de elaboración u optimización, para tener mayor cantidad de estas en menos tiempo para análisis adicionales. De igual forma, se recomienda realizar un análisis más detallado de estructura de la Mp el cual revele la forma en la cual se distribuyen el quitosano y el extracto con saponinas.

Por otra parte, es recomendable modificar las condiciones de trabajo durante el ensayo microbiológico que proporcione más información sobre los posibles cambios que puedan observarse en la acción antibacteriana de las Mp compuestas por Qs y el Extsap de la planta de *Yucca baccata*. De igual forma, el cambio de las condiciones de trabajo puede incluir el uso de un mayor número de cepas bacterianas y la aplicación de técnicas microbiológicas que permitan obtener mayor información, como por ejemplo, las concentraciones mínimas inhibitorias, mínimas bactericidas y sobre la viabilidad de la célula bacteriana para poder estimar las concentraciones óptimas para agregar de las Mp de Qs/Extsap que presenten el efecto antibacteriano deseado, además de buscar un dispositivo para poder probar las Mp compuestas de manera *in vivo*.

9. REFERENCIAS

Abedian, Z., Jenabian, N., Akbar, A., Zabihi, E., Tashakorian, H., Rajabnia, M., Sadighian, F., Bijani, A. (2019). Antibacterial activity of high-molecular-weight and low-molecular-weight chitosan upon oral pathogens. Journal of conservative Dentistry. 22. (2). 169-174 pp.

Aguirre, P. (2011). Preparación de micropartículas de quitosano para microencapsulación de biomoléculas (tesis de pregrado). CIMAT, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Aires, C. P., Kawakita, E., Ré, A. C., Peixoto, M. P., Ferreira, M. P., Ricomini-Filho, A. P., Freitas, O. (2019). Effect of Chitosan Dispersion and Microparticles on Older Streptococcus mutants Biofilms. Molecules. 24. (9).

Agulló, E., Mato, R., Peniche, C., Tapia, C. (2004). Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Revistas de plásticos modernos. 81. 535. 81- 83 pp.

Alcazár, 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.

Anduro, J. A., Cantú, E. U., Campas, O. N., López, C. J., Sánchez, D. I., Félix, F. A. (2017). Diagnóstico de la calidad sanitaria del agua de pozo en comunidades del sur de Sonora, México Rev Salud Publica Nut. 16. (1). Revista Facultad De Ciencias Básicas. 11. (2). 136-153 pp.

Arcila, H., Peralta J. (2016). Agentes naturales como alternativas para el tratamiento del agua. Rev. Facultad de Ciencias Básicas. 11. (2).

Ardila, N., Daigle, F., Heuzey, M.-C., Ajji, A. (2017). Effect of Chitosan Physical Form on Its Antibacterial Activity Against Pathogenic Bacteria. Journal of Food Science. 82. (3). 679-686 pp.

Avello, M., Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situaciones en Chile. Rev. Méd. Chile. 138. (10).

Ayala, G. (2015). Efecto antimicrobiano del quitosano: una revisión de la literatura. Scientia Agroalimentaria. 2. 32-38 pp.

Baccou, J. C., Lambert, F., Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. Analyst. 102. (1215). 458-65 pp.

Balachandar, S., Dhanabalan, R., Manikandan, A., Rajendran, R. (2017). Elucidation of antibacterial properties of chitosan against bacterial contaminants of water. International Journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences. 7. (4). 341- 345 pp.

Barragán, C., Delgado, E., Andrade, A. (2016). Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potencioélectrica, FT-IR y Raman. Journal CIM. 4. (1). 769-776 pp.

Barros, L. V., Oliveira, M. E., Amorim, R. V. (2018). Design and evaluation of chitosan-based Microparticles as models of protein delivery systems. IJPSR. 9. (2).

Bautista, L. (2009). Elaboración y caracterización de micropartículas parenterales por el método A1/O/A2- evaporación del solvente optimizado: biopolímeros útiles, factores tecnológicos y de formulación y su aplicación en un fármaco hidrosoluble (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. Polymer. 42. (8). 3569–3580 pp.

Cabrera, J. (2005). Actividad biológica de extractos de plantas usadas para el tratamiento de cáncer e infecciones en Tepatepec, Hidalgo (tesis de pregrado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Camacho, N. C. (2011). Tratamiento de agua para consumo humano. Ingeniería industrial. 29. 153.179 pp.

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).

Caro-León, F. J., Argüelles-Monal, W., Carvajal-Millán, E., López-Franco, Y., Goycoolea-Valencia, F. M., Román del Barrio, J., Lizardi-Mendoza, J. (2018). Production and characterization of supercritical CO2 dried chitosan nanoparticles as novel carrier device. Carbohydrate Polymers. 198. 556-562 pp.

Caviedes, D. I., Muñoz, R. A., Perdomo, A., Rodríguez, D., Sandoval, J. I. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales: Una Revisión. Revista Ingeniería y Región. 13. (1). 73-90 pp.

Comisión Nacional del Agua CONAGUA. (2007). Programa nacional hídrico 2007-2012. SEMARNAT. Recuperado de: conagua.gob.mx/CONAGUA07/Contenido/Documentos/PNH_05-08.pdf

Coria, L. (2014). Electrodos modificados con quitosano y partículas de platino para la determinación rápida de *Escherichia coli* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Ingenierías.

Cussier, E. L. (2009). Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems. Third edition. Cambridge. 549-567 pp.

Department of agriculture of United States (USDA). (2018). Natural Resources Conservation Service. Recuperado de https://www.fs.fed.us/wildflowers/plant-of-the-week/yucca_baccata.shtml

Díaz, Y. J., Cruz, G. A., López, W. E., Valdés, L. R., Morales, M. L. (2015). Uso de un polímero natural (quitosano) como coagulante durante el tratamiento de agua para consumo. INGENIARE. 19.

Dima, J. B., Sequeiros, D., Yaritzky, N. E. (2013). 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, Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.

Dobner, J., Kaser, S. (2018). Body mass index and the risk of infection from underweight to obesity. Clinical Microbiology and Infection. 24. (1). 24-28 pp.

Fang, L., Wolmarans, B., Kang, M., Jeong, K., Wright, A. (2014). Application of Chitosan Microparticles for Reduction of Vibrio Species in Seawater and Oysters (*Crassostrea virginica*). Appl Environ. Microbiol. 81. 640-647 pp.

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.

Flechas, H., Sánchez, L., Silva, J. (2008). Tamizaje fitoquímico y cálculo de rendimiento de sapogeninas esteroidales de tres procedencias de *Solanum quitoense* var. *septentrionale* "Naranjillo". Rev. Colombia Forestal. 11. 201-214 pp.

Flores, T. Huamán, J., Tomás. G. 2013. Estudio comparativo de tres metodologías cuantitativas de extracción de saponinas de la *Melisa Officinalis* "Toronjil". Per. Quim. Ing. Quìm. 16. (5).

Fornaguera, J., Gómez, G. (2011). Bioquímica: la ciencia de la vida. EUNED. Costa Rica. 173 – 187 pp.

Fuentes, L., Mendoza, I., Díaz, P., Hernández, Y., Zambrano, A., Villegas, Z. (2014). Potencial coagulante de la tuna *Opontia cochinellifera (L) mil (Cactaceae*) En aguas para consumo humano. BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS. 46. (2). 173 – 187 pp.

Fundora, M. (2016). Procedimiento para la extracción de saponinas con actividad antiinflamatoria a partir de hojas de *Agave brittoniana Trel*. (tesis de pregrado). Universidad central Martha Abreu de las Villas.

Gacén, J., Gacén, I. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. Boletín INTEXTER. 67-71.

Galdos, A., Carmona, J., Sánchez, H., Morales, J., Torres, A., Gómez, S. (2017). Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico por consumo de agua en San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México. Tecnol. Cienc. Agua. 8. (1).

Giraldo, J. (2013). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. Bolivia. 67-71 pp.

Giraldo, S. E., Bernal, M. C., Robayo, A., Pardo, A. Z., Molano, L. G. (2015). Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá. NOVA. 13. (23). 75-82 pp.

Goycoolea, F. M., Remuñan, C., Alonso, M. J. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Real Academia Nacional de Farmacia. 1. 1-29 pp.

Goycoolea, F. M., Sreekumar, S., Moerschbacher, B. M., Rivera-Rodríguez, G. R. (2018). Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and Microparticles. Scientific Reports. 8. (4695).

Guerra, J. O., Meneses, A., Simonet, A. M., Macías, F. A., Noguiras, C., Gómez, A., Escario, J. A. (2008). Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. Rev. biol. Trop. 56. (4)

Güçlü-ünstündağ, O., Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 47. 231-258 pp.

Hernández, A. C., Hermosilla, V. J. (2014). Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala (tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de ciencias químicas y farmacia. Guatemala.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2015). Censos Económicos, 2014 y resultados definitivos 2015, Información Ambiental. Consumo de agua y personal ocupado. Recuperado: https://www.inegi.org.mx/programas/ce/2014/

Jeon, S. J., Oh, M., Yeo, W., Galvão, 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).

Kamjumphol, W., Chareonsudjai, P., Chareonsudjai, S. (2017). Antibacterial activity of chitosan against *Burkholderia pseudomallei*. Rev. Microbiology Open. 7.

Kong, M., Chen, X. G., Liu, C. G., Meng, X. H., Yu, L.J. (2008). Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *Escherichia coli*. Colloids Surf B Biointerfaces. 65. (2). 197-202 pp.

Kong, M., Guang, X., Xing, K., Jin, H. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International Journal of Food Microbiology. 144. 51-53 pp.

Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Z., Leitgeb, M. (2019). Chitosan-Based (Nano) Materials for novel Biomedical Applications. Molecules. 24. (10). 1960 pp.

Kregiel, D., Berlowska, J., Witonska, I., Antolak, H., Proestos, C., Babic, M., Babic, L., Zhang, B. (2017). Saponin-Based, Biological-active surfactants from Plants. Chapter 6. Application and Characterization of Surfactants. INTECH open science. Ed. 1st.

León, R. C. (2012). Actividad antiparasitaria del extracto de saponinas de *Yucca baccata* del desierto sonorense empleando jerbos (*meriones unguicilatus*) infectados con *Giardia lambia* (tesis de maestría). CIAD A. C. Hermosillo, Sonora.

Lopera, S., Gallardo, C. (2010). Estudio de la fotodegración de ácido fólico encapsulando en microesferas de goma arábiga y maltodextrina. Rev. Cubana Farm. 44 (4).

Luque-Alcaraz, A. G., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea, F. M., Higuera-Ciapara, I., Argüelles-Monal, W. (2016). Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. RSC Advance. 6. 59250-59256 pp.

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Gutiérrez, E. (2012). Quitina y quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. Rev. Tec. URU. 1.

Mezari, M. H., Espinosa, A. C., López, Y. V., Arredondo, H., Díaz, T., Equihua, Z. (2010). Visión integral sobre el agua y la salud. En: Jiménez C. B., M.L. Torregrosa A. y L. Aboites A. (Eds.). El Agua en México: cauces y encauces. AMC-Conagua. México. 291-316. 291-316 pp.

Mena, L., Plaza, L., Tamargo, B., Salas, E., Blanco, Y., Sierra, G., Otero, A. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria L*. (jaboncillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales 2015. 20. (1). 106-116 pp.

Morales–Burgos, A. M., Carvajal-Millan, E., Sotelo–Cruz, N., Campa–Mada, A. C., Rascón–Chu, A., López-Franco, Y., Lizardi-Mendoza, J. (2018). Polysaccharides in alternative methods for insulin delivery. Chapter 4. Biopolymer Grafting. 175-197 pp.

Moreno, J. A. S., Panou, D. A., Stephansen, K., Chronakis, I. S., Boisen, A., Mendes, A. C., Nielsen, L. H. (2018). Preparation and Characterization of an Oral Vaccine Formulation Using Electrosprayed Chitosan Microparticles. AAPS PharmSciTech.

Newbold, C. J., Hassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E., Wallace, R. J. (1997). Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. Br J Nutr. 78. (2). 237-49 pp.

Norma Oficial Mexicana NOM-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. Recuperado de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html

Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. Recuperado de: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: https://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/Execsums.pdf

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Progress on drinking-water, sanitation and hygiene, Descriptive note. Recuperado de: https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/jmp-2017/en/

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). Agua. Nota descriptiva. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water

Parra, M., Plazas-Leguizamón, N. Z., Carvajal, D. C., Ferreira, S. K., Parra, D. J. (2018.) Descripción de las saponinas en quinua (*Chenopodium quinoa willd*) en relación con el suelo y el clima: Una revisión. Informador Técnico. 82. (2). 241-249 pp.

Pereo, G. D. (2013). Actividad antibacteriana del extracto in vitro del extracto butanólico del tallo de *Yucca baccata* e identificación de sus fracciones con saponinas (tesis de maestría). CIAD A. C. Hermosillo, Sonora.

Piacente, S., Pizza, C., Oleszek, W. (2005). Saponins and phenolic of *Yucca schidigera* Roezl: Chemistry and bioactivity. Phytochem Rev. 4. 177–190 pp.

Porchezhiyan, V., Noorjaham, S. (2017). Eco-friendly food preservation: Studies on the synergistic preservative effect of Chitosan. Journal of Advanced Applied Scientific Research. 1. (7).

Quelal, M. (2010). Análisis de la cadena agroproductiva de la Quinua, en las provincias de Chimborazo e Imbabura (tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional de Quito.

Quillay, M. A., Arana, Y. A., Jaramillo, C. G., Cuenca, S., Rojas, L. L., Alcivar, V. J. (2017). Contenido de saponinas y actividad cicatrizante de "*Cecropia peltata*" y "*Parthenium hysterophorus"*. Revista cubana de Farmacia. 51. 3.

Rabea, E. I., Mohamed, E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and mode of action. American Chemical Society. 4. (6).

Ramírez, A., Isaza, G., Pérez, J. E., Martínez., M. M. (2017). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum Dolichosepalum bitter* (frutillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 22. (1).

Reddy, V., Bikash, S., Bobbu, P., Anitha, D., Tarrre, V. (2015). Triterpenoid saponins: a review on biosynthesis, applications and mechanism of their action. Int. J Pharm Pharm Sci. 7. (1). 24-28 pp.

Reyes, M. (2016). Uso del cloro en las plantas de tratamiento de aguas residuales domesticas: desinfección y formación de subproductos (tesis de maestría). Centro de investigación interdisciplinario para el desarrollo integral regional unidad Durando.

Riquelme, N., Arancibia, C. (2019). Obtención de nanoemulsiones utilizando saponinas de quillay como sustituto de un surfactante sintético. Mundo nano. 12. 23.

Rodríguez, C. (2014). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Cultivated in Mexico. J. Mex. Chem. Soc. 58. (4). 452-455 pp.

Rodríguez, L. (2016). Uso de anticoccidial natural a base de saponinas procedentes de *Yucca shidigera* y *Trigonella foenum-graecum* sobre la incidencia de coccidias y respuesta bioeconómica en pollos de engorde (tesis de pregrado). Universidad privada Antenor Orrego Facultad de ciencias agrarias.

Rubio, H. O., Balderrama, L. R., Burrola. E., Aguilar, G. N., Saucedo, R. A. (2015). Niveles de contaminación del agua potable en la cabecera municipal de Ascensión, Chihuahua, México. Nova scientia. 7. (14).

Salazar, M. C., Negrón, A. Preparación y caracterización de películas de quitosano despolimerizado y reticulado con tripolifosfato de sodio. Rev. Soc. Quím. Perú. 79. (3).

Samrot, A. V., Akanksha, Jahnavi T., Padmanaban, S., Philip, S.A., Burman, U., Rabel, A. M. (2016). Chelators influenced synthesis of chitosan–carboxymethyl cellulose microparticles for controlled drug delivery. Appl Nanosci. 6.1219–1231 pp.

Santini, E., Jarek, E., Ravera, F., Liggieri, L., Warszynski, P., Krzan, M. (2019). Surface Properties and Foamability of Saponin and Saponin-Chitosan Systems. Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces. 181. 198-206 pp.

Soto, M. R., Soto, K., Santos, A. A., Moncayo, N. K. (2015). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus L*. Revista Química Viva. 3.

Swamy, B. Y., Prasad, C. V., Prabhakar, M. N., Rao, K. C., Subha, M. C., Chung, I. (2012). Biodegradable Chitosan-g-Poly (methacrylamide) Microspheres for Controlled Release of Hypertensive Drug. J Polym Environ. 21.1128–1134 pp.

Tapia, M., Gandarillas, H., Alandia, S., Cardozo, A., Mujica, A. (1979). La quinua y la kañiwa: cultivos andinos. Bogotá, CIID. Oficina Regional para América Latina. 228.

Usiña, K. (2017). Análisis de las propiedades surfactantes de saponinas obtenidas de los frutos de *Sapindus saponaria L*. (tesis de pregrado). Universidad Central de Ecuador.

Velázquez, L. (2013). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Revista Iberoamericana de polímeros. 4. (19).

Villena, M. J. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. ARS Pharmaceutica, 50. (1).43-50 pp.

Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. Carbohydrate Polymers. 164. 268-283 pp.

Weiss, G. (2017). Nutrition and infection. Clinical microbiology and infection. 24. (1).

WHO. (2011). WHO Public Health & Environment Global Strategy Overview. Recuperado de: https://www.who.int/phe/publications/PHE_2011_global_strategy_overview_2011.pdf

Wink, M. (2010). Introduction: biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. Annual Plant Reviews 2010. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. Second Edition, 40. (1). 1-19 pp.

Yildirim, I., Turkan, K. (2015). Agentes contra el cáncer: saponina y tanino. Rev. Int. De Química biológica. 9. (6). 332.340 pp.

Zhengxin, M., Donghyeon, K., Adegbola, T., Sanghoon, K., Galvao, K., Jeong, C. (2016). Chitosan Microparticles Exert Broad-Spectrum Antimicrobial Activity against Antibiotic-Resistant Micro-organisms without Increasing Resistance. ACS Appl. Mater. Interfaces. 8. 10700−10709 pp.