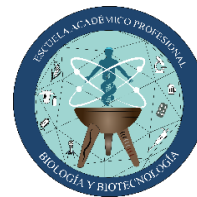




UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E. A. P. BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**EFFECTO *IN VITRO* DE SAPONINAS DE *Sapindus saponaria* L. (CHOLOQUE)
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia*
*coli***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. MERCEDES ELIZABETH CALLA VILLEGAS

ASESOR:

DR. BLGO-MBLGO. CARLOS ROSALES LOREDO

CO-ASESORA:

DRA. Q. F. JÉSSICA NATHALIE BARDALES VALDIVIA

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT ©

MERCEDES ELIZABETH CALLA VILLEGAS

Todos los derechos reservados.

FICHA CATALOGRÁFICA

Calla, M. 2022. **Efecto *in vitro* de saponinas de *Sapindus saponaria* L. (choloque) sobre el crecimiento de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli***
Mercedes Elizabeth Calla Villegas.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Blgo-Mblgo. Carlos Rosales Laredo

Co- asesora: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo
UNC – 2022.

**EFFECTO *IN VITRO* DE SAPONINAS DE *Sapindus saponaria* L. (CHOLOQUE)
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia*
*coli***

AUTOR: Bach. Mercedes Elizabeth Calla Villegas

ASESOR: Dr. Blgo-Mblgo. Carlos Rosales Loredo

CO-ASESORA: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados:

JURADO EVALUADOR



Presidente

M Cs. López Orbegoso, John Víctor



Secretario

Dr. García Izquierdo, Luis Gilberto



Vocal

M Cs. Díaz Aliaga, Arturo Ulises

Cajamarca, 2022 – Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 16:05 horas del día 24 de junio del año 2022, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el Auditorio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Efecto *in vitro* de saponinas de *Sapindus saponaria* L. (Choloque) sobre el crecimiento de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*", de la Bachiller en: Ciencias Biológicas Mercedes Elizabeth Calla Villegas.

Siendo las 16:48 horas del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: APROBADA, con el calificativo de 15, con lo cual la Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra expedita para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

El Jurado Evaluador está integrado por:

Presidente: M Cs. López Orbegoso, John Víctor

Secretario: Dr. García Izquierdo, Luis Gilberto

Vocal: M Cs. Díaz Aliaga, Arturo Ulises

Asesor: Dr. Blgo-Mblgo. Carlos Rosales Loredo

Co-Asesora: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Presidente

M Cs. López Orbegoso, John Víctor

Secretario

Dr. García Izquierdo, Luis Gilberto

Vocal

M Cs. Díaz Aliaga, Arturo Ulises

Asesor

Dr. Blgo-Mblgo. Carlos Rosales Loredo

Laredo

Co-Asesora

Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Tesista

Bach. Mercedes Elizabeth Calla Villegas

A:

Dios,
mi familia,
mis asesores y
todas las personas que me acompañaron en este camino.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser parte de cada uno de mis pasos, por guiarme e iluminarme.

A mi familia, por haber sido mi motivación, soporte, sostén y compañía en cada uno de los pasos que he dado.

A mis asesores por haberme apoyado en la todo el proceso de desarrollo de mi tesis.

Tabla de contenido

Resumen.....	x
Abstract.....	xi
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Bases Teóricas (Marco Teórico y Conceptual).....	8
2.2.1. Los microorganismos	8
2.2.2. Crecimiento microbiano	13
2.2.3. Generalidades de <i>Sapindus saponaria</i> L.	14
2.2.4. Fitoconstituyentes.....	15
CAPÍTULO III.....	18
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	18
3.1. Población. Muestra. Unidad de análisis.....	18
3.2. Diseño metodológico	19
3.2.1. Recolección, transporte y procesamiento del fruto de <i>Sapindus saponaria</i> L.....	19
3.2.2. Obtención del crudo de saponinas	19
3.2.3. Prueba para determinar la presencia de saponinas.....	20
3.2.4. Obtención de las cepas microbianas	20
3.2.5. Efecto inhibitorio.....	21
3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	23
3.4. Técnicas de Procesamiento y Análisis de los Datos	23
3.5. Equipos, materiales y reactivos.....	24
CAPÍTULO IV	26
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	34
CAPÍTULO V	39
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES.....	40
LISTA DE REFERENCIAS	41
APÉNDICES	46

Lista de ilustraciones

<i>Figura 1. Prueba de la espuma</i>	26
<i>Figura 2. Prueba de Salwosky</i>	27
<i>Figura 3. Prueba de Lieberman Burchard</i>	28
<i>Figura 4. Prueba de sensibilidad de E. coli</i>	29
<i>Figura 5. Prueba de sensibilidad de S. aureus</i>	29
<i>Figura 6. Prueba de sensibilidad de Candida spp.</i>	30
<i>Gráfico 1. Concentración del crudo de saponinas vs. medida del halo de inhibición</i>	31
<i>Gráfico 2. Comparación del tamaño de los halos de inhibición</i>	32
<i>Gráfico 3. Comparación de las diferentes cepas de Candida spp</i>	33
<i>Tabla 1. Características de E. coli</i>	52
<i>Tabla 2. Características de S. aureus</i>	53
<i>Tabla 3. Características de Candida spp.</i>	54
<i>Tabla 4. Efecto de las saponinas sobre el crecimiento de Candida spp.</i>	55

Glosario

Bactericida

Efecto causado por un determinado compuesto, el cual es capaz de producir la muerte a bacterias (38).

Fungicida

Efecto causado por un determinado compuesto, el cual es capaz de eliminar o inhibir el desarrollo de hongos o levaduras (39).

Sensibilidad

Efecto causado por una sustancia, la cual es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo determinado a una concentración determinada (40).

Citotoxicidad

Efectos adversos que interfieren con la estructura o procesos celulares o ambos; suceden en todas las células y es esencial para el funcionamiento, supervivencia y proliferación celular (41).

**EFECTO *IN VITRO* DE SAPONINAS DE *Sapindus saponaria* L. (CHOLOQUE)
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia*
coli.**

Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto *in vitro* de saponinas obtenidas a partir de la cáscara del fruto de *Sapindus saponaria* L. (choloque), sobre el crecimiento de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las saponinas fueron extraídas con equipo Soxhlet, estas se sometieron a pruebas analíticas como la de la espuma, de Salwosky y la reacción de Liebermann Burchard, para corroborar la presencia de saponinas. Una vez obtenido el crudo de saponinas se prepararon diluciones con agua destilada al 20%, 40% y 60% para evaluar el efecto sobre el crecimiento de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Las cepas de los microorganismos mencionados se obtuvieron de aislados clínicos adquiridos en el Laboratorio Llontop y en el Hospital II EsSalud - Cajamarca, fueron reactivadas y luego diluidas hasta una concentración equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL); se sembraron empleando la técnica de extensión en placa, sometiéndose a pruebas de sensibilidad en disco embebidos con extracto crudo de saponinas (20%, 40% y 60%). Se obtuvieron como resultados que las saponinas inhibieron el crecimiento de 21 cepas de *Candida* spp. de las 30 que se recolectaron; de las cuales 10 fueron inhibidas a concentraciones de 40% y 60%, 4 a una concentración de 60% y 7 fueron inhibidas con las 3 concentraciones. En el caso de *E. coli* y *S. aureus* no se presentó inhibición. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS en donde se compararon las concentraciones y las medidas de los halos, se tuvo que $p = 0.000$.

Palabras clave: saponinas, *Sapindus saponaria* L., *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Abstract

The objective of this research work was to evaluate the in vitro effect of saponins obtained from the peel of the fruit of *Sapindus saponaria* L. (choloque), on the growth of *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Saponins were extracted with Soxhlet equipment; these were subjected to analytical tests such as foam, Salwosky and Liebermann Burchard reaction, to corroborate the presence of saponins. Once the crude saponins were obtained, 20%, 40% and 60% dilutions with distilled water were prepared to evaluate the effect on the growth of *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The strains of the microorganisms were obtained from clinical isolates acquired at the Llontop Laboratory and at Hospital II EsSalud - Cajamarca, they were reactivated and then diluted to a concentration equivalent to a 0.5 tube on the McFarland scale (1.5×10^8 CFU/mL); they were seeded using the plate extension technique, undergoing disc sensitivity tests embedded with the crude extract of saponins (20%, 40% and 60%). The results obtained were that saponins inhibited the growth of 21 strains of *Candida* spp. of the 30 that were collected; of which 10 were inhibited at concentrations of 40% and 60%, 4 at a concentration of 60% and 7 were inhibited at 3 concentrations. In the case of *E. coli* and *S. aureus* there was no inhibition. For the statistical analysis of the data, the SPSS program was used, where the concentrations and the measurements of the halos were compared, $p = 0.000$.

Keywords: saponins, *Sapindus saponaria* L., *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el uso de plantas para el control de ciertos microorganismos está tomando mayor importancia por los fitoconstituyentes que poseen y los efectos que han mostrado frente a ellos; el uso de productos químicos o productos de origen industrial están generando grandes problemas de contaminación al medio ambiente y a la salud, por otro lado la mayoría de microorganismos presentan resistencias a un elevado número de antibióticos; cada año las tasas de resistencia de los microorganismos aumentan y los tratamientos o modos de prevención son cada vez menos efectivos (1).

Los microorganismos son causantes de diversas enfermedades e infecciones, entre ellos los más comunes son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* spp., que a pesar de pertenecer a la microbiota normal, pueden causar infecciones ya sea por la posibilidad de padecer de trastornos inmunológicos o porque estos microorganismos desarrollan mecanismos de resistencia o supervivencia frente a factores externos como los antibióticos o biocidas que están destinados a eliminarlos o controlarlos. La mayoría de infecciones causadas por *E. coli* son frecuentes y fáciles de combatir con antibióticos de primera línea, sin embargo, si nos vemos afectados por lo mencionado anteriormente, estas infecciones pueden ser reincidentes y por ende difíciles de combatir. Asimismo, *S. aureus* causa infecciones en las vías respiratorias o cutánea y *Candida* spp. puede afectar a nivel bucal o genital (2). Por lo tanto, es importante evaluar opciones para eliminar o mitigar sus efectos.

Sapindus saponaria L. presenta varios fitoconstituyentes, dentro de las cuales están las saponinas, metabolitos secundarios que pueden ser empleadas como tratamientos frente a ciertas infecciones causadas por hongos y bacterias, por lo tanto se debe aprovechar que contamos con este recurso vegetal para estudiar sus efectos y sus beneficios para la sociedad. Así mismo, se debe estudiar su toxicidad ya que son capaces de formar complejos esterol-lisando las membranas de las células (30).

De lo dicho anteriormente se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto *in vitro* de las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L. (choloque), sobre el crecimiento de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

Frente a lo cual se propuso la siguiente hipótesis:

Las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L. (choloque), inhiben el crecimiento *in vitro* de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Planteándose como objetivo general:

- Evaluar el efecto de las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L. (choloque), sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Y como objetivos específicos:

- Obtener saponinas de la cáscara del fruto de *Sapindus saponaria* L.

- Evaluar el efecto inhibitorio de las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L. (choloque), en concentraciones de 20, 40 y 60 %, sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida* spp.
- Evaluar el efecto inhibitorio las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L. (choloque), en concentraciones de 20, 40 y 60 %, sobre el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Mendes et al. (2021), realizaron un trabajo de investigación titulado “Human nails permeation of an antifungal candidate hydroalcoholic extract from the plant *Sapindus saponaria* L. rich in saponins”, evaluaron la actividad de un extracto hidroalcohólico de *S. saponaria* L. frente a onicomicosis causadas por *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. interdigitale*, a demás evaluaron su citotoxicidad y permeabilidad en la uña de humano. Las saponinas fueron identificadas y caracterizadas por espectrometría de masas de ionización, las pruebas de sensibilidad se realizaron por microdilución en caldo, la citotoxicidad fue probada en células HeLa y la permeabilidad se midió por su capacidad de penetrar uñas sanas por espectrometría fotoacústica y espectrómetro infrarrojo de transformación; con lo cual demostraron que posee una alta actividad antifúngica, la citotoxicidad es mínima, ya que se produjeron cambios ligeros en las células HeLa a una concentración de 781.25 ug/mL, estas células a pesar de los cambios permanecieron vivas y su capacidad para penetrar la uña humana es alta, independientemente de a qué cara de la uña se le haya aplicado el extracto en el lapso de una hora ya había penetrado el espesor total de la uña; concluyeron que su aplicación tópica es efectiva y segura (3).

Gasca et al. (2020), en Brasil, mediante la investigación “Chemical composition and antifungal effect of ethanol extract from *Sapindus saponaria* L. fruit against banana

anthracnose”, se evaluó el efecto del extracto alcohólico de *S. saponaria* L. frente a hongos que echan a perder los frutos de banano. Dicho extracto etanólico al ser enfrentado a estos hongos produjo un efecto inhibitorio similar al del tiabendazol frente a *Colletotrichum musae*, por lo que fue considerado como una buena opción fungicida frente a hongos resistentes a los antimicóticos convencionales. Sin embargo, no mostró efecto significativo frente a *C. gloeosporioides* y *C. boninense* (4).

Carranco (2017), en la Universidad Central del Ecuador, realizó un trabajo de investigación donde se evaluó las propiedades surfactantes del fruto de *Sapindus saponaria* L., para lo cual primero se extrajo las saponinas por maceración que fueron cuantificadas mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), adicionalmente se evaluó el poder surfactante haciendo una comparación con dos surfactantes sintéticos; concluyendo en que poseen características similares y que son una buena opción para reemplazar a los surfactantes sintéticos, con los que se elaboran los detergentes y jabones comerciales (5).

Shinobu et al. (2015), realizaron una investigación titulada “Cellular structural changes in *Candida albicans* caused by the hydroalcoholic extract from *Sapindus saponaria* L.”, en la cual emplean la microscopia electrónica de barrido y microscopia electrónica de transmisión para evaluar la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *S. saponaria* L., evidenciaron que las saponinas presentes en el extracto hidroalcohólico modifican la pared y la membrana generando daños en la estructura y finalmente la lisis celular. Después de 30 minutos de exposición de las levaduras al extracto se observa una notable disminución de las mismas, por pérdida de la pared celular y lisis celular, esto

continúa hasta los 120 minutos; además algunas células empiezan a presentar invaginaciones de la membrana citoplasmática, pérdida del contenido intracelular y volumen celular reducido y a los 240 minutos alcanzan una meseta. Comprobaron este efecto en 125 aislamientos la mayoría a bajas concentraciones, solamente algunos requirieron altas concentraciones, además comprobaron que el efecto es rápido, la mayor parte muere durante los primeros 60 minutos. Concluyeron que el extracto hidroalcohólico es un tratamiento efectivo contra candidiasis; pero deberían emplearse componentes purificados y evaluar su eficacia y toxicidad (6).

Damke et al. (2011), investigaron “*In vivo* activity of *Sapindus saponaria* L. against azole susceptible and resistant human vaginal *Candida* species”, evaluaron la actividad antifúngica de extracto hidroalcohólico y butanólico de *S. saponaria* L., estos extractos fueron congelados con nitrógeno líquido y liofilizados, la sensibilidad se evaluó empleando microdilución en caldo con cepas de *Candida albicans* y *Candida no albicans*, aisladas de pacientes con *Candida* vulvovaginal; se contagiaron ratas con *C. albicans* resistentes y sensibles a azoles y *C. no albicans* resistentes a azoles, luego fueron tratadas por vía intravaginal, para lo cual se emplearon 3 dosis de los diferentes extractos a diferentes concentraciones; durante el tratamiento todo se monitoreó por cultivo (midiendo la UFC/ml luego de un tiempo de la aplicación del tratamiento) y microscopía electrónica de barrido. Además se emplearon células HeLa para evaluar la citotoxicidad de los extractos. Todos sus aislados fueron sensibles frente al tratamiento después de 21 días no observaron citotoxicidad, por lo que señalaron a estos extractos como un tratamiento efectivo, pero es importante determinar el mecanismo antifúngico (7).

Dimas (2011), en la selva peruana realizó la tesis titulada "Evaluación *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* L. sobre huevos y larvas de *Boophilus microplus*", en la cual empleó 5 diferentes concentraciones (6%, 8%, 10%, 15% y 25%) del extracto crudo de *S. saponaria* L., los huevos y larvas fueron empaquetados con papel filtro para luego ser embebidos en el extracto. Las larvas fueron inhibidas a las 5 concentraciones; sin embargo en el caso de los huevos se requirieron concentraciones menores. Concluyeron que los extractos de *S. saponaria* L. serían una herramienta efectiva para el control biológico de huevos y larvas de *Boophilus microplus* (8).

Tsuzuki et al. (2007), realizaron la investigación: "Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L.", donde evaluaron dos tipos de extractos, el extracto hidroalcohólico y el extracto butanólico, de *S. saponaria* L. frente a cepas clínicas de *Candida albicans* y *Candida no-albicans*. Se determinó que el extracto butanólico mostró actividad inhibitoria contra *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. albicans* ATCC 90028. Por otro lado, al enfrentar el extracto hidroalcohólico frente a las cepas de *Candida albicans* y *Candida no-albicans* solo tuvo efecto sobre *C. parapsilosis*. Asimismo, se requieren estudios para determinar su toxicidad y eficacia para poder ser empleadas (9).

Burga y Sangay (2018), en Cajamarca - Perú, realizaron un trabajo de investigación en el que se comparó el contenido de saponinas entre *Quillaja saponaria* (choloque) y *Chenopodium quinoa* (quinua). Cuantificaron las saponinas obtenidas de ambos frutos mediante dos métodos el afrosimétrico y el espectrofotométrico; con lo cual concluyeron que el fruto de *Quillaja saponaria* contiene mayor cantidad de saponinas que el fruto de

Chenopodium quinoa (10).

Ruiz et al. (2017), en Cajamarca, evaluaron el efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios, caracoles del género *Lymnaea*, de *Fasciola hepatica*, en este estudio se obtuvo crudo de saponinas mediante el método de fraccionamiento en Soxhlet, el producto obtenido fue liofilizado y posteriormente diluido a diferentes concentraciones para ser enfrentados con los caracoles, obtuvieron resultados positivos a las 48 horas, brindando una opción para interrumpir el ciclo biológico de la infección por *F. hepatica* (11).

2.2.Bases Teóricas (Marco Teórico y Conceptual)

2.2.1.Los microorganismos

Se encuentran en todo el planeta y actualmente están divididos en los dominios, bacterias o eubacterias, archeas y eucariontes; en el último dominio podemos localizar a hongos, levaduras, protozoarios y algas. Existen gran variedad de microorganismos benéficos que contribuyen en diferentes aspectos a plantas, humanos y animales; como la digestión, la absorción de nutrientes y otros; pero por otro lado también pueden ser perjudiciales ya que pueden causar, enfermedades, infecciones y otros (12).

2.2.1.1.Bacterias

Son microorganismos unicelulares, que no pueden ser observados a simple vista pueden

medir entre 0.5 y 5 μ de longitud. Tienen una gran capacidad para adaptarse a diferentes medios, actualmente se encuentran divididas en bacterias Gram negativas con pared celular, bacterias Gram positivas con pared celular, bacterias sin pared celular y arqueobacterias (12).

En las bacterias Gram negativas con pared celular encontramos diferentes bacterias aerobias y anaerobias; algunas de ellas patógenas como *Neisseria* y *Vibrio*, pero también benéficas como *Rhizobium* y *Acinetobacter*. Las bacterias Gram positivas con pared celular, en su mayoría causan enfermedades en humanos dentro de este grupo encontramos a *S. aureus*. Las bacterias sin pared celular son bacterias que tienen dos o más formas estructurales durante su ciclo de vida y el género más conocido que pertenece a este grupo son los *Mycoplasma*. Las arqueobacterias, son aquellas bacterias que viven en ambientes o condiciones extremas, son genéticamente diferentes a las eubacterias (12).

- ***Escherichia coli***

E. coli es una bacteria anaerobia facultativa, que forma parte de la microbiota normal, la encontramos de manera natural en el tracto gastrointestinal en simbiosis con el hospedero bajo estas condiciones no causa ningún daño; no obstante, si el hospedero sufre algún tipo de debilitamiento en su organismo esta podría causar serias complicaciones. *E. coli* puede causar infecciones a nivel de las mucosas o diseminarse por todo el cuerpo. Las infecciones más comunes causadas por esta bacteria son infección del tracto urinario, sepsis o meningitis y enfermedad entérica - diarreica. Existen varias variantes de *E. coli* enteropatógena, enterohemorrágico y enteroagregativa, entre otras (13).

E. coli es uno de los microorganismos mejores caracterizados y con mayor capacidad de adaptación a diferentes entornos, la diversidad genética de *E. coli* se ve influenciada por el ambiente y el hospedero en el que se desarrolla, cada hospedero posee una cepa predominante de esta bacteria (14). La resistencia de *E. coli* está asociada a la genética y elementos móviles, pueden adquirir resistencia por mutación o por transferencia de genes, se ha pensado mucho en si la resistencia está relacionada a los factores de virulencia pero no es estrictamente de esa manera (15).

En los últimos años *E. coli* ha generado gran preocupación a nivel mundial, se han visto limitadas las opciones de tratamiento, esto ha sido generado por a un alto consumo de antibióticos en los diferentes campos como la medicina y la ganadería; sin embargo la mayoría de ellos son consumidos en ausencia de vigilancia médica. En muchos casos esta resistencia puede ser transferida a los demás microorganismos que componen la microbiota intestinal, para controlar un poco la propagación de resistencia es necesario disminuir el uso de fármacos, fomentado por un uso prudente de estos o reemplazándolos (16).

- ***Staphylococcus aureus***

Este microorganismo se puede encontrar como cocos en racimo, es una bacteria Gram positiva, no esporulada y sin cápsula; es considerado altamente patógeno bajo ciertas circunstancias, la más virulenta; puede poner incluso en riesgo la vida y también causar infecciones simples en tejidos blandos. Esto se vuelve más complicado aún, ya que presenta resistencia a una gran variedad de antibióticos, dejando escasas posibilidades para los tratamientos. Este microorganismo puede formar parte de la microbiota normal del

humano, encontramos entre el 25 y 30% de la población sana; puede adquirirse por contacto o por el ambiente (17).

S. aureus es uno de los microorganismos que cada vez se está volviendo más resistente a los antibióticos y más virulento, emplea una variedad de factores de virulencia para generar infecciones en el hospedero; diversos genes están siendo estudiados, los genes causante de la infección o los genes que deben tratarse para controlar o evitar la infección, esta bacteria posee una parte de su genoma que es conservado y solo una parte es variable en la que se produce transferencia horizontal de genes, lo cual genera la variación de los factores de virulencia y la resistencia a antibióticos; sin embargo un tratamiento efectivo que se ha estado empleando frente a esta bacteria es la vancomicina ya que presentan resistencia a la metilina; pero en los últimos hallazgos se han encontrado que ya están desarrollando cierta resistencia a la vancomicina (18,19)

2.2.1.2. Levaduras

Las levaduras se diferencian de las bacterias por su tamaño y estructura, pertenecen al grupo de los ascomicetos; en su mayoría, sobreviven en ambientes con presencia de azúcares, son anaerobias facultativas, desarrollan además un metabolismo fermentativo, pueden vivir en simbiosis con algunos animales y también pueden desarrollar pseudohifas (20). Actualmente definen a las levaduras como hongos con predominio unicelular durante su ciclo vital, las levaduras son empleadas en la industria del pan y la cerveza; pero también existen levaduras que causan enfermedades en los seres humanos como *Candida albicans* que afecta por lo general a personas inmunosuprimidas (12).

- ***Candida* spp.**

Estas especies son levaduras unicelulares, aunque algunos pueden producir hifas o pseudohifas. Las infecciones por *Candida* spp. han ido en aumento en los últimos años, desarrollan su patogenicidad principalmente en pacientes inmunocomprometidos, forman parte de la microbiota de la piel, las mucosas, el tracto gastrointestinal y el aparato genitourinario humano; también podemos encontrarlas en animales y plantas. La causa de las infecciones por *Candida* se pueden dar por levaduras propias del organismo humano y en algunos casos también pueden transmitirse de persona a persona (21,22).

C. auris posee características similares a *C. albicans* y actualmente es una de las especies emergentes ya que presentan una alta resistencia a varios fármacos y es altamente transmisible a nivel nosocomial, por lo general este tipo de *Candida* es resistente al fluconazol. *C. glabrata* posee reducida sensibilidad a fluconazol y también a los demás antifúngicos a pesar de ser una de las más comunes. *C. haemulonii* está relacionado a infecciones superficiales y es uno de los patógenos menos virulentos dentro de las especies de *Candida* (23). *C. albicans*, es tal vez una de las más conocidas por su potencial patógeno tiene la capacidad de adherirse a las células y produce hifas lo cual facilita la invasión celular (24).

La patogenicidad de *Candida* se debe a diversos factores como la formación de biopelículas y la emisión de sustancias que causan daño celular; las proteínas aspárticas son una de las más peligrosas, están relacionadas con el daño tisular, la adhesión y la invasión. Se están evaluando los genes que interfieren dentro del desarrollo de la enfermedad para desarrollar

nuevos tratamientos efectivos, debido a la resistencia a los antifúngicos que se han desarrollado; como el empleo de sustancias que posean la capacidad de bloquear la expresión de ciertos genes y así evitar que se desencadene la enfermedad o mitigar sus efectos (24,25).

2.2.2. Crecimiento microbiano

Está determinado por el aumento del número de células o de la masa total microbiana, en esta investigación observaremos si se produce alguna alteración en el número de colonias de los cultivos bacterianos o fúngicos. En el caso de las bacterias, en su mayoría se dividen por fisión binaria, esto consiste en la duplicación del material genético y la formación de dos células hijas. Por otro lado las levaduras, generalmente se dividen por gemación; es en un proceso de reproducción asexual en la que hay una división de núcleos y formación de nuevas levaduras sin la participación de gametos (26–28).

- **Efecto inhibitorio**

El efecto inhibitorio es la capacidad de cierta sustancia para limitar el crecimiento microbiano o su desarrollo. Mediante el crecimiento en placa, caldo o microdilución; en placa se da por la aplicación de la sustancia en ciertos puntos, en donde podemos evidenciar si existe esa limitación o interferencia en el crecimiento microbiano. A los medicamentos capaces de inhibir el crecimiento o el desarrollo se lo conoce como antimicrobiano, estos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos, y fungicidas; en el caso de las plantas si presentan este efecto inhibitorio se les dice que poseen efecto antimicrobiano (29).

2.2.3. Generalidades de *Sapindus saponaria* L.

El género *Sapindus* está formado por más de doce especies distribuidas en los trópicos y subtropicos del mundo. *Sapindus saponaria* L. es una especie originaria de Perú, que existe desde años atrás, se han encontrado restos arqueológicos pertenecientes a culturas ancestrales. En cada fruto del “choloque” podemos encontrar diferentes metabolitos secundarios como saponinas, taninos, azúcares, aceites, entre otros; en general los metabolitos son importantes en todas las plantas ampliamente distribuidas (30).

2.2.3.1. *Sapindus saponaria* L.

S. saponaria L. es un vegetal que en Perú se conoce comúnmente como “boliche” o “choloque”, podemos encontrar este árbol en bosques secos pluviestacionales o bosques secos andinos, son árboles que pueden medir de 8 a 15 m de altura. Poseen copa redonda, corteza escamosa y verdosa, hojas compuestas, imparipinadas con bordes enteros y lanceolados. Planta monoica, flores unisexuales en inflorescencias de racimo compuesto; flores masculinas con 5 sépalos y pétalos, estambres 7-8; flores femeninas con periantio reducido o nulo. El fruto es una drupa monosperma, castaño, de 1,5 cm de diámetro con una cáscara semitransparente, una sola semilla de color negro, lustrosa, muy dura (31). Se ha observado el crecimiento de esta planta en algunas zonas de Cajamarca como San Marcos, Jaén y Chota.

Todas las partes de este árbol son empleadas con distintos fines, pero la parte que más se usa es el fruto, este es empleado gracias a las distintas propiedades que se le han

encontrado, ya sea como abortivo, inductor del parto o para el tratamiento del dolor uterino; y también tiene propiedades antiedematosas, venotónicas, broncolíticas, citotóxicas frente a varias neoplasias, antiinflamatoria, hipocolesterolémica. Se ha encontrado además que las saponinas por vía oral presentan toxicidad, irritan las mucosas bucofaríngeas y digestivas, ocasionando dolor abdominal, vómitos y diarreas (30).

2.2.4. Fitoconstituyentes

Podemos encontrar dos tipos de sustancias necesarias para el metabolismo de las plantas: los metabolitos primarios, que son aquellos que son esenciales para el funcionamiento de las células y los organismos y los metabolitos secundarios, que no tienen una función definida en los procesos metabólicos básicos de las plantas, se encuentran en pequeñas cantidades y los tipos que se producen están restringidos según las especies o géneros de las plantas; estos pueden cumplir funciones como pigmentos, atrayentes o repelentes y otros. Se agrupan en cuatro grandes grupos, como son, los terpenos, los glucósidos, los compuesto fenólicos y los alcaloides (32).

- **Glicósidos**

Los glicósidos poseen un enlace glicósido entre dos azúcares, una de ella unida a un grupo hidroxilo, este ayuda a que se solubilicen en el protoplasma de las células. Podemos encontrar a los glicósidos ampliamente distribuidos en la naturaleza como pigmentos en las plantas, sustancias que dan sabor a los frutos, y otros; existen tres tipos de glicósidos: las saponinas, los glicósidos cardíacos y los glicósidos cianogénicos (32).

- **Saponinas**

Las saponinas forman parte del desarrollo normal de algunas plantas o como un mecanismo de defensa, también es posible encontrarlas en algunas especies marinas como las estrellas de mar; algunos factores que influyen en su producción son la disponibilidad de agua, luz y nutrientes. Se le atribuyen muchos beneficios a las saponinas entre ellos su capacidad para actuar como antibacteriano y antifúngico, al actuar como antibacteriano puede unirse al colesterol de la bicapa lipídica, alterando la permeabilidad de la membrana plasmática y como antifúngico forma complejos con esteroides, lo que causa una desintegración en la membrana (33,34).

El término saponinas está altamente relacionado con el jabón, ya que desde la antigüedad se le atribuye esta característica, debido a su capacidad para formar espuma al entrar en contacto con soluciones acuosas. Están constituidas por una aglicona y un azúcar. Las saponinas tienen propiedades espumantes, emulsificantes, farmacológica, medicinal, hemolíticas y otras; son dulces y amargas; por todas estas propiedades se han vuelto importantes para la investigación; sin embargo todo lo natural se ha ido reemplazando por productos químicos que en muchos casos son nocivos para la salud y el ambiente (35,36).

- **Importancia de las saponinas**

Aun no es comprendido por qué forman parte del rol biológico de las plantas, algunos consideran que son generadas como parte del sistema de defensa de las plantas por su composición y características. Tienen efectos ya probados de estudios *in vitro*, que

representan diferentes beneficios como antifúngico, antiviral, antibacterial, anticancerígeno y/o antiinflamatorio (34).

- Crudo de saponinas

El extracto crudo de saponinas está referido, a la extracción de saponinas empleando un solvente como etanol o agua, en este caso se empleará etanol y butanol, como ha quedado registrado en el desarrollo de la metodología de la presente investigación (37).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1.Población. Muestra. Unidad de análisis

Unidad de análisis

Cepa de *Candida* spp. que fue sometida a las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L.

Cepa de *Staphylococcus aureus* que fue sometida a las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L.

Cepa de *Escherichia coli* que fue sometida a las saponinas del extracto crudo del fruto de *Sapindus saponaria* L.

Población

Todas las cepas de *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* obtenidas en el Laboratorio Llontop y en el Hospital II EsSalud de Cajamarca.

Muestra

Treinta aislamientos purificados en cultivo de cada uno de los siguientes microorganismos: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

3.2. Diseño metodológico

3.2.1. Recolección, transporte y procesamiento del fruto de *Sapindus saponaria* L.

Los frutos fueron recolectados de manera manual del centro poblado de Yamaluc, distrito de Huambos, provincia de Chota, departamento de Cajamarca; luego llevados al Laboratorio del Centro de Investigación y Control de Enfermedades Transmisibles (CICET), en donde se separó la cáscara del fruto; la cual fue colocada en una estufa para ser deshidratada a 35°C durante 24 horas (Apéndice 1) (42).

3.2.2. Obtención del crudo de saponinas

La cáscara del fruto de “choloque” fue machacada en un mortero manual. Este procedimiento se realizó mediante una extracción con etanol, para lo cual se colocaron 300 mL de etanol acuoso al 80% y 50 g de cáscara del fruto de *S. saponaria* L., se maceró durante 24 horas, se eliminó la parte acuosa y se conservó las cáscaras, que fueron secadas en el horno, luego se hizo un reflujo durante dos horas en un equipo Soxhlet; se dejó reposar 24 horas el extracto, se llevó a un sistema de reflujo añadiendo 150 ml de etanol y 100 ml de agua destilada por 2 horas; seguido de eso se le agregó sulfato de sodio anhídrido y fue concentrado en baño María mediante la eliminación del alcohol por 48 horas; finalmente se llevó a la estufa hasta sequedad. Se obtuvieron entre 7 y 9 gr aproximadamente de crudo de saponinas en cada extracción que se realizó (Apéndice 2) (8,42).

3.2.3. Prueba para determinar la presencia de saponinas

Prueba de la espuma

En un tubo de ensayo se colocó 1 g del crudo de *S. saponaria* L. con 3 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente. La presencia de espuma por más de cinco minutos indica una reacción positiva (42).

Prueba de Salwosky

En un tubo de ensayo se colocó 0.5g de crudo de saponinas, se le agregó cloroformo y ácido sulfúrico. Una coloración anaranjada indica una reacción positiva (42).

Prueba de Lieberman Burchard

En un tubo de ensayo se colocó 0.5g de crudo de saponinas, se agregó anhídrido acético y cloroformo. Se refrigeró un momento y se le añadió ácido sulfúrico. La coloración verde indica la presencia de saponinas esteroides y una coloración roja o sus derivados, rosada o violeta indica la presencia de saponinas triterpénicas (42).

3.2.4. Obtención de las cepas microbianas

Se obtuvieron 30 cultivos puros de origen clínico por cada especie: *S. aureus*, *E. coli* y *Candida* spp., las mismas que fueron recolectadas en el Hospital II Essalud - Cajamarca y en el Laboratorio de Análisis Clínicos Llontop.

Cepas de *Candida* spp.

Las cepas de *Candida* spp. fueron sembradas por agotamiento en Agar Sabouraud con cloranfenicol y se incubaron a 37°C de 24 a 48 horas, luego se realizó una coloración Gram y adicionalmente se realizó la prueba de tubo germinativo a 37°C, a todas las cepas para determinar si probablemente son cepas de *Candida albicans* o no. Se conservaron las cepas en crioviales con Agar Sabouraud (Apéndices 3 y 4).

Cepas de *S. aureus*

Una vez obtenidas las cepas de *S. aureus* fueron sembradas por agotamiento en Agar Nutritivo, se incubaron a 37°C por 24 horas, luego se realizó una coloración Gram y adicionalmente se realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa. Se conservaron en crioviales con Agar Base Sangre (Apéndices 3 y 4).

Cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se sembraron por agotamiento en Agar Nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 horas, luego se realizó una coloración con Gram para verificar que las colonias obtenidas son puras y están aptas para realizar la investigación. Se conservaron en crioviales con Agar Nutritivo (Apéndices 3 y 4).

3.2.5. Efecto inhibitorio

Efecto del crudo de saponinas sobre el crecimiento de *S. aureus*

Luego de evaluar el crecimiento de *S. aureus*, se tomaron algunas colonias que fueron

diluidas en solución salina estéril hasta una concentración equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland, luego se realizó la siembra por extensión con un hisopo estéril en placas con Agar Müeller Hinton, por triplicado; además en cada placa se colocaron tres discos separados, el primero fue de papel filtro con 20 µL de agua destilada estéril (control negativo), el segundo fue un disco de tetraciclina de 30 µg (control positivo) y el tercero fue de papel filtro con 20 µL de extracto de saponinas con la concentración elegida (20%, 40%, 60%), en placas separadas. Se incubó a 37°C por 24 horas y se evaluó el crecimiento (43).

Efecto del crudo de saponinas sobre el crecimiento de *E. coli*

Luego de evaluar el crecimiento de *E. coli*, se tomaron algunas colonias que fueron diluidas en solución salina estéril hasta una concentración equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland, luego se realizó la siembra por extensión con un hisopo estéril en placas con Agar Müeller Hinton, por triplicado; además en cada placa se colocaron tres discos separados, el primero fue de papel filtro con 20 µL de agua destilada estéril (control negativo), el segundo fue un disco de tetraciclina de 30 µg (control positivo) y el tercero fue de papel filtro con 20 µL de extracto de saponinas con la concentración elegida, en placas separadas (20%, 40%, 60%). Se incubó a 37°C por 24 horas y se evaluó el crecimiento (43).

Efecto del crudo de saponinas sobre el crecimiento de *Candida spp.*

Luego de evaluar el crecimiento de *Candida spp.*, se tomó una o media colonia que fueron diluidas en solución salina estéril hasta una concentración equivalente al tubo 0.5 de la

escala de McFarland, luego se realizó la siembra por extensión con un hisopo estéril en placas con Agar Müeller Hinton, por triplicado; además en cada placa se colocaron tres discos separados, el primero fue de papel filtro con 20 µL de agua destilada estéril (control negativo), el segundo fue un disco de fluconazol de 30 µg (control positivo) y el tercero fue de papel filtro con 20 µL de extracto de saponinas con la concentración elegida, en placas separadas (20%, 40%, 60%). Se incubó a 37°C por 24 horas y se evaluó el crecimiento (43).

3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

Técnica: Observación de los resultados de las pruebas de laboratorio.

Instrumentos: Formato de resultados de laboratorio (Tablas 1, 2, 3, 4).

3.4. Técnicas de Procesamiento y Análisis de los Datos

Los resultados obtenidos fueron colocados en una hoja de cálculo en Excel, posteriormente se procesaron en el programa SPSS v. 23 y se analizaron con ANOVA, con el cual se realizó el análisis estadístico descriptivo con el establecimiento de las frecuencias con las que se compararán las diferentes concentraciones y las medidas de los halos, se tuvo que $p=0.000$.

3.5.Equipos, materiales y reactivos

3.5.1.Equipos

- Baño María
- Soxhlet
- Incubadora
- Sistema de reflujo
- Autoclave (olla)
- Estufa
- Refrigeradora
- Balanza
- Microscopio

3.5.2.Materiales

- Pipetas
- Puntas amarillas
- Placas de Petri
- Mechero
- Asas de seimbra
- Matraces
- Tubos de ensayo
- Algodón
- Gasa

- Papel para esterilizar
- Hilo
- Probeta
- Hisopos estériles
- Papel filtro

3.5.3. Reactivos

- Etanol
- Agua destilada
- Medios de cultivo: Agar Nutritivo, Agar Müeller Hinton, Agar Saboraud
- Antibióticos en disco: tetraciclina 30ug y fluconazol 30ug
- Ácido sulfúrico
- Anhídrido acético
- Cloroformo
- Sulfato de sodio anhídrido

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Las pruebas cualitativas realizadas para la confirmación de la presencia de saponinas dieron todas positivas, como lo podemos observar:

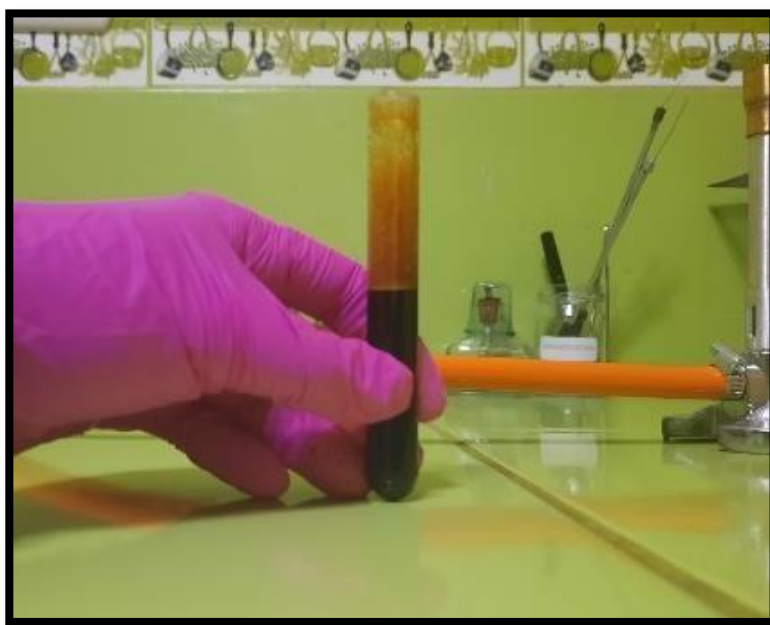


Figura 1. Prueba de la espuma

En la Figura 1 se puede observar una reacción positiva para la prueba de la espuma, hay presencia de espuma de más de 1 cm de altura y además la presencia de la espuma fue durante un tiempo prolongado.



Figura 2. Prueba de Salwosky

En la Figura 2 se puede observar una reacción positiva para la prueba de Salwosky, se observa la presencia de una sustancia anaranjada, lo cual es positivo en presencia de saponinas.

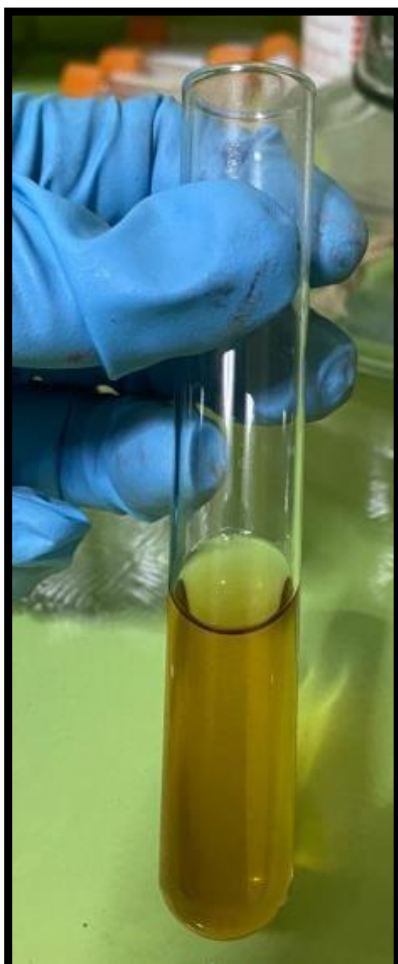


Figura 3. Prueba de Lieberman Burchard

En la Figura 3 se puede observar una reacción positiva para la prueba de Lieberman Burchard, se formó una coloración anaranjada lo cual indica presencia de saponinas triterpénicas.



Figura 4. Prueba de sensibilidad de S. aureus



Figura 5. Prueba de sensibilidad de E. coli



Figura 6. Prueba de sensibilidad de *Candida* spp.

En el caso de *S. aureus* y *E. coli*, no se pudo observar inhibición del crecimiento, no hubo formación de halos al ser sometidos a las pruebas, para ninguna cepa a ninguna concentración del extracto como se puede observar en las Figura 4 y 5. En el caso de *Candida* spp. si hubo algunas cepas que al ser sometidas a las pruebas y bajo ciertas concentraciones eran inhibidas (Figura 6); la flecha indica la zona de medición del halo. observaremos estos datos en los Gráficos 1, 2 y 3.

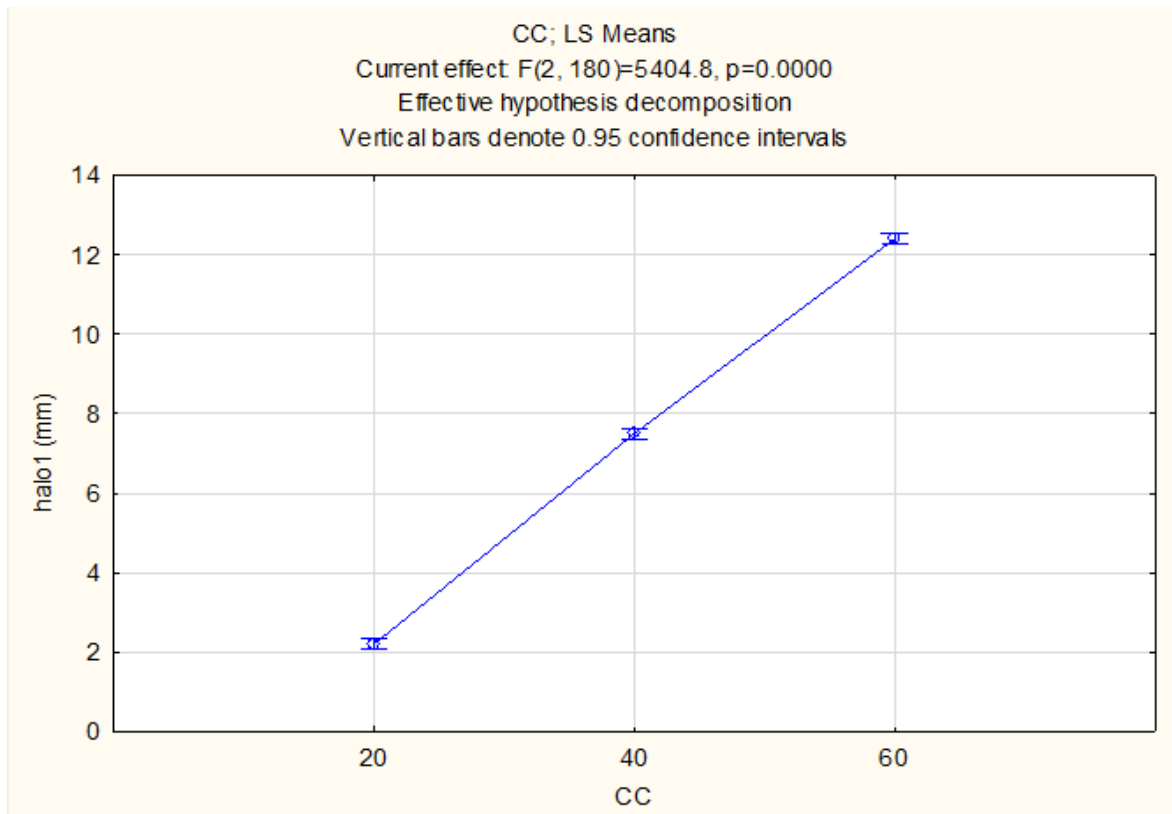


Gráfico 1. Concentración del crudo de saponinas vs. medida del halo de inhibición para *Candida* spp.

En el Gráfico 1, podemos observar que a una contracción mayor (60%), de crudo de saponinas, el halo de inhibición que se forma es de mayor tamaño.

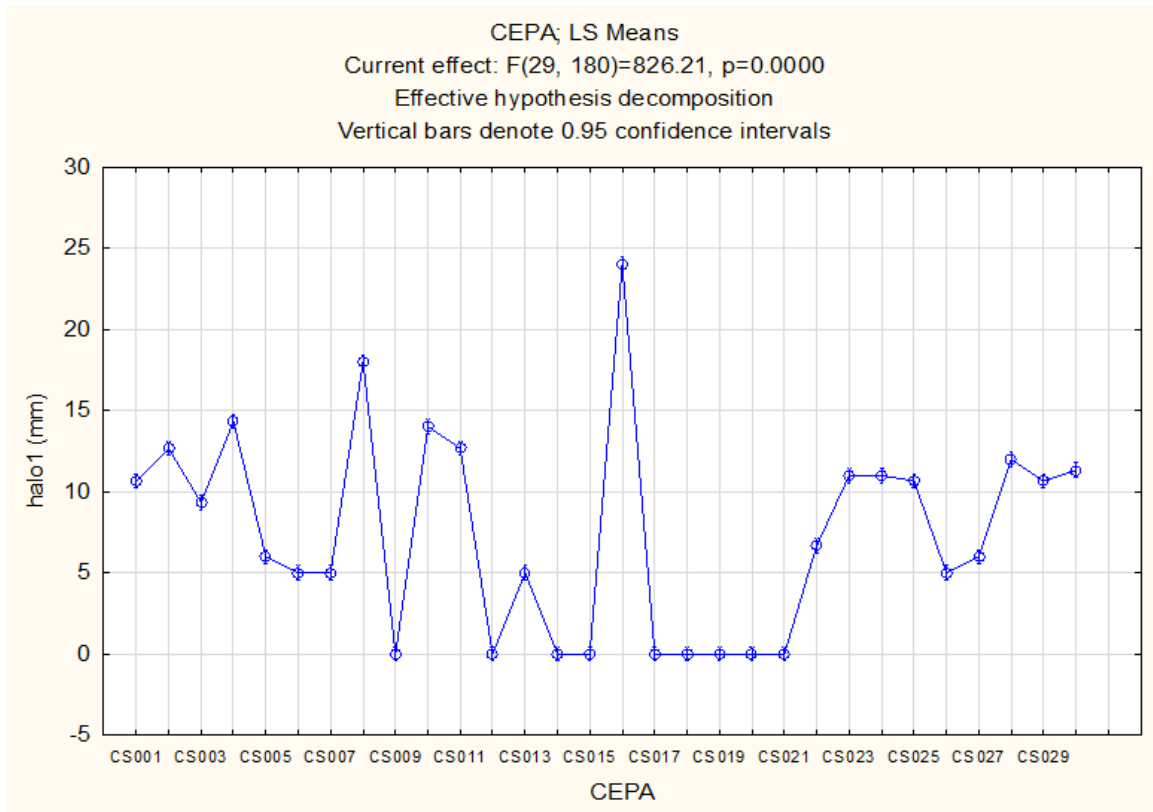


Gráfico 2. Comparación del tamaño de los halos de inhibición formados por *Candida* spp.

En la Gráfico 2, podemos observar el comportamiento de las cepas de *Candida*; las cepas 9, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, y 21 no presentaron halo de inhibición a ninguna concentración, todas las demás si presentaron halos de inhibición de diferentes longitudes siendo la cepa 16 con la que se obtuvo el halo de inhibición de mayor tamaño (22, 24 y 26 mm).

Las saponinas inhibieron el crecimiento de 21 cepas de *Candida* spp. de las 30 que se recolectaron; 10 fueron inhibidas a concentraciones de 40% y 60%, 4 a una concentración de 60% y 7 fueron inhibidas con las 3 concentraciones. La medida promedio de los halos que se obtuvo fue 18.4 mm. Podemos observar la medida promedio de los halos de inhibición en la Tabla 4, en el apéndice 5.

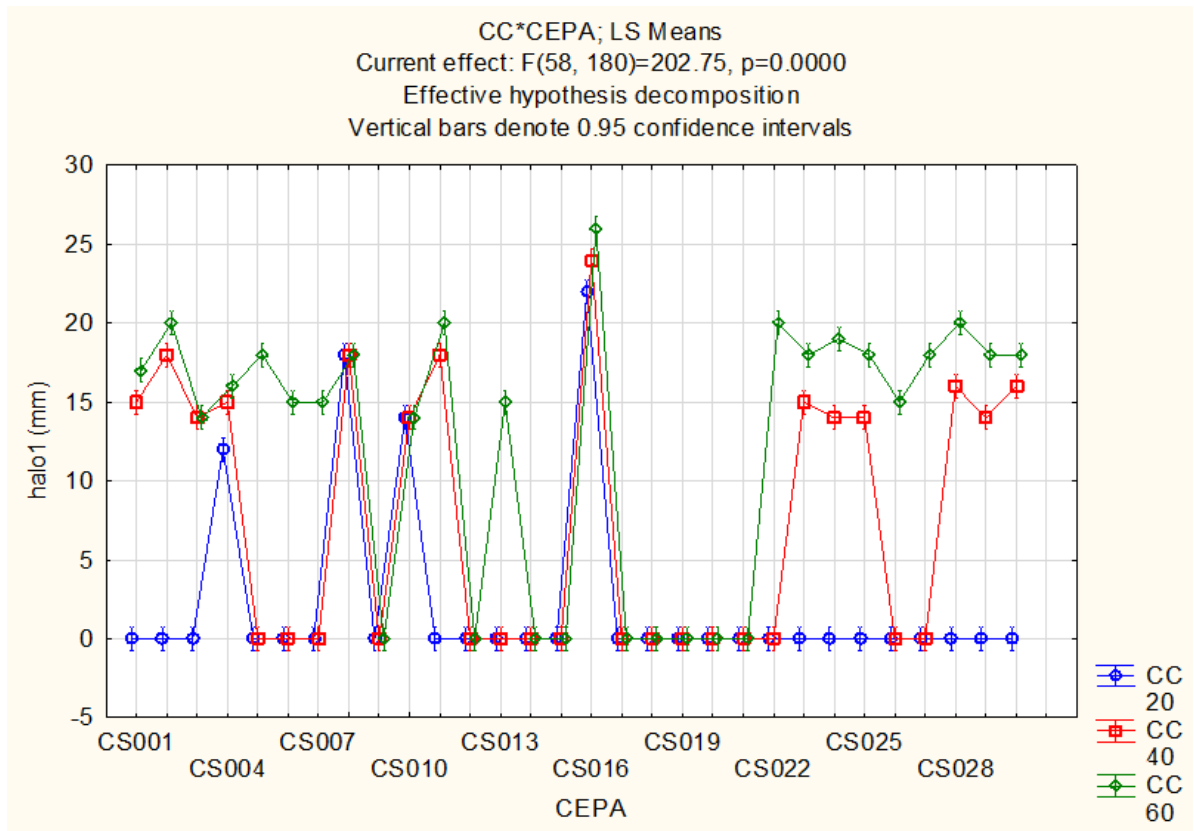


Gráfico 3. Comparación de las diferentes cepas de *Candida* spp.

En la Gráfico 3 se observa el comportamiento de las diferentes cepas, las medidas de los halos formados a las diferentes concentraciones.

DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de las saponinas obtenidas del fruto de *S. saponaria* L. sobre el crecimiento de tres microorganismos, como son *E. coli*, *S. aureus* y *Candida* spp.; estudios anteriores señalan que las saponinas tienen efecto sobre varios microorganismos incluso actualmente se está evaluando su capacidad antiviral (34). *S. saponaria* L. es una planta que posee varios fitoconstituyentes entre los que destacan las saponinas triterpénicas en diferentes zonas de la planta, en este caso se eligió la cáscara de fruto por ser una de las partes de la planta con mayor contenido de saponinas, después de las semillas (44).

Encontramos a los microorganismos ampliamente distribuidos por todo el planeta, existen muchos microorganismos beneficiosos no solo para el ser humano sino también para plantas y animales; pero algunos de ellos bajo ciertas condiciones pueden llegar a ser perjudiciales. En este caso *E. coli* forma parte de la microbiota normal del ser humano y de otros animales; pero pueden generar graves infecciones por ejemplo cuando las defensas del ser humano bajan o cuando nos encontramos frente a variantes patógenas como la *E. coli* enterohemorrágica u otras, ya que existen más de seis tipos de variantes patógenas en *E. coli* (12).

En la evaluación del efecto inhibitorio que podía ejercer *S. saponaria* L. sobre *E. coli*, no se obtuvieron resultados positivos; sin embargo las saponinas tienen antecedentes de usos como antibacterianos ya que se unen al colesterol de la bicapa lipídica alterando su

permeabilidad, la gran mayoría de bacterias presenta bicapa lipídica en su membrana plasmática (33). Yábar y Reyes (2017) realizaron un trabajo de investigación en el que elaboraron un desinfectante a base de un extracto acuoso de saponinas extraídas de *Chenopodium quinoa*, a distintas concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100%), en dos tiempos (5 y 10 min), y a diferentes cargas microbianas (alta, media y baja); obtuvieron que a mayor carga microbiana se requería mayor tiempo de exposición y mayor concentración de extracto (45). Probablemente la composición de las saponinas o la interacción entre las saponinas y el microorganismos haya interferido en el efecto inhibitorio de *S. saponaria* L. sobre *E. coli*, por ello no se obtuvieron resultados positivos.

Por otro lado, *S. aureus*, también puede formar parte de la microbiota normal de los seres humanos; pero es uno de los causantes principales de infecciones nosocomiales, puede causar sepsis, conjuntivitis y algunas infecciones a las vías respiratorias, ya que se alberga principalmente en las zonas mucosas del organismo humano. Como se mencionó anteriormente las saponinas poseen actividad antimicrobiana ya que alteran la membrana plasmática pudiendo generar lisis celular (33); sin embargo tampoco fue posible inhibir su crecimiento con saponinas de *S. saponaria* L.

Long et al. (2013), llevaron a cabo una investigación en la que aislamientos de *S. aureus* meticilino resistentes, fueron sometidos al efecto de las saponinas triterpénicas de *Glycyrrhiza* spp. Este estudio fue realizado *in vivo* e *in vitro*, y obtuvieron que la carga microbiana no disminuía pero que el tamaño de la herida infectada si disminuía, esto dependía del tiempo de exposición, señalando que las saponinas generaban una

disminución de los neutrófilos (46). Probablemente haya ocurrido algo similar en esta investigación ya que no se observó inhibición del crecimiento por lo que es necesario optimizar el tratamiento y purificación para mejorar y facilitar la absorción, favoreciendo la posibilidad de obtener mejores resultados.

Así como las saponinas tienen un efecto bactericida también poseen un efecto antifúngico, que está dado por la formación de complejos con esteroides lo que causa la desintegración de las membranas (34), las levaduras pueden producir hifas o pseudohifas y esto hace que desarrollen su patogenicidad. *Candida* spp., causa infecciones al pasar de su estado de levadura a un estado de micelio, estas se ven favorecidas por la invasión y el daño celular (24). Shinobu et al. (2015), evidenciaron que las saponinas pueden generar daños en la pared y membrana de *Candida* spp., causando finalmente la lisis celular, este efecto se veía favorecido por el tiempo de exposición de los cultivos al extracto hidroalcohólico (6). Lo cual coincide con esta investigación cuyos resultados fueron positivos frente a la exposición de saponinas sobre *Candida* spp., 21 aislamientos de los 30 que fueron evaluados presentaron inhibición en su crecimiento.

Díaz (2009) en una revisión que realizó informó que las saponinas presentan una gran diversidad estructural, las saponinas con una cadena de azúcares unida al carbono 3, son las que se caracterizan por presentar actividad antimicrobiana; se dice que esta característica se ve favorecida por la ramificación, en el caso de saponinas linealizadas por perder el azúcar terminal y esto hace que se produzca una pérdida de la actividad antimicrobiana. Las saponinas al formar complejos con esteroides forman poros en la membrana, alterando la

permeabilidad (48). Esta revisión nos estaría explicando que es lo que ocurre entre las saponinas y las membranas celulares, y además una de las posibles razones por las que no todas las saponinas poseen el mismo efecto esto es por su diversidad estructural.

De los 9 aislamientos de *Candida* spp. que no fueron inhibidos, 8 dieron positivo para la prueba de tubo germinativo lo que señalaría que podrían pertenecer al grupo de *Candida albicans*; sin embargo, esto no se puede afirmar hasta que no se desarrollen más pruebas que lo confirmen. Solo el aislamiento número 12 que no fue inhibida, no dio positivo para la prueba de tubo germinativo. El hecho de que estos aislamientos no hayan sido inhibidos podría estar relacionado con el desarrollo de alguna resistencia, probablemente ya hayan sido expuestos anteriormente a otros tipos de saponinas, quizás tengan algún componente diferente en su estructura que evadió el efecto de las saponinas o podrían haber necesitado una mayor concentración de saponinas e incluso mejores métodos de purificación.

Otros estudios realizados en los que se emplean saponinas para inhibir el crecimiento concuerdan con esta investigación; como Damke et al. (2011), realizaron un estudio *in vivo* en el que se infectó ratas con *C. albicans* y *C. no albicans*, luego administraron como tratamiento un liofilizado de saponinas y obtuvieron resultados positivos; además de que no le causó alteraciones en la piel (7); y por su lado Tsuzuki et al. (2007), evaluaron la actividad antifúngica de dos tipos de extracto, obtuvieron resultados positivos con el extracto butanólico para *C. albicans* y *C. no albicans* y en el caso del extracto hidroalcohólico solo obtuvieron resultados positivos frente a un tipo de *C. no albicans* (9).

E. coli, *S. aureus* y *Candida* spp. se encuentran dentro de la lista de las infecciones más comunes en seres humanos, se han empleado una gran variedad de antibióticos contra ellos, últimamente la mayoría de ellos ya no muestran efectos inmediatos para el control de la infección, esto se debe a que han generado resistencia a los antibióticos aparte de que tienen una resistencia natural a otros antibióticos (47), es necesario evaluar nuevos métodos para el control de estas infecciones, el empleo de plantas y métodos naturales han recobrado importancia en las últimas décadas ya que no generan resistencia; al probar el uso del crudo de saponinas se da como opción un tratamiento natural para *Candida* spp.

Gasca et al. realizaron una investigación en la que inhibió el crecimiento del hongo *C. musae* (4); Mendes et al. (2021) desarrolló un extracto hidroalcohólico con el que logró inhibir onicomiasis humanas causada por *T. rubrum*, *T. metagrophylla* y *T. interdigitale*, y además evaluó la toxicidad empleando células HeLa, la variación celular fue mínima pero continuaron con vida lo cual señala que podrían ser empleadas directamente en humanos (3). En este caso como los organismos a tratar fueron hongos, probablemente el mecanismo de acción haya sido el mismo que en el caso de las levaduras y por ello fueron inhibidos; pues pueden presentar características estructurales similares.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se concluye que el crudo de saponinas obtenidas de *S. saponaria* L., no tuvieron efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *S. aureus*.

El crudo de saponinas de *S. saponaria* L., inhibió el crecimiento en 21 aislamientos de las 30 cepas evaluadas de *Candida* spp., esto se evidenció con la formación de halos (medida promedio de los halos: 18.4 mm).

RECOMENDACIONES

En futuras investigación se recomienda realizar estudios más a fondo sobre las saponinas de *Sapindus saponaria* L., evaluar la concentración exacta de las saponinas que se logran obtener, ampliar el muestreo y optimizar los procesos de purificación y obtención de saponinas.

LISTA DE REFERENCIAS

1. Hansen LJ, Johnson ML. Conservation and toxicology: Integrating the disciplines. *Conserv Biol.* 1999;13(5):1225–7.
2. Rodriguez J, Prado D. Microbiología: lo esencial y lo práctico. Organ Panam la Salud [Internet]. 2005;225–6. Available from: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51601/MicrobiologiaPractico_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Mendes V, Veiga FF, Castro LV, Sato F, Baesso ML, Vesco B, et al. Human nails permeation of an antifungal candidate hydroalcoholic extract from the plant *Sapindus saponaria* L. rich in Saponins. *Molecules.* 2021;26(1).
4. Gasca CA, Dassoler M, Dotto G, de Medeiros YK, Gomes SM, Masrouah C, et al. Chemical composition and antifungal effect of ethanol extract from *Sapindus saponaria* L. fruit against banana anthracnose. *Sci Hortic (Amsterdam)* [Internet]. Elsevier; 2020;259(June 2019):108842. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108842>
5. Carranco D. Análisis de las propiedades surfactantes de saponinas obtenidas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. Vol. 91, Universidad Central Del Ecuador. 2017.
6. Shinobu-Mesquita CS, Bonfim-Mendonça PS, Moreira AL, Ferreira ICP, Donatti L, Fiorini A, et al. Cellular structural changes in *Candida albicans* caused by the hydroalcoholic extract from *Sapindus saponaria* L. *Molecules.* 2015;20(5):9405–18.
7. Damke E, Tsuzuki JK, Cortez DA, Ferreira IC, Bertoni TA, Batista MR, et al. *In vivo* activity of *Sapindus saponaria* against azole-susceptible and -resistant human vaginal *Candida* species. *Complement Altern Med.* 2011;11.
8. Dimas P. Evaluación *in vitro* de los extractos crudos de *Sapindus saponaria* sobre hembras ingurgitadas de *Boophilus microplus* (acari: ixodidae). *Sci Tech.* 2011;I(67).
9. Tsuzuki JK, Svidzinski TI, Shinobu CS, Silva LF, Rodrigues-Filho E, Cortez DA, et al. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *An Acad Bras Cienc.* 2007;79(4):577–83.

10. Burga W, Sangay C. Comparación de la concentración de saponinas entre *Chenopodium quinoa* “quinua” y *Quillaja saponaria* “choloque.” 2018;101.
11. Ruíz L, Díaz H, Sánchez DQ. Efecto molusquicida del liofilizado de saponinas triterpénicas obtenidas de las cáscaras de los frutos de *Sapindus saponaria* L. “choloque” frente a hospederos intermediarios de *Fasciola hepatica* [Internet]. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. 2017. Available from: <http://repositorio.upagu.edu.pe/handle/UPAGU/470>
12. Sánchez M, Gonzáles T, Ayora T, Martínez Z, Pacheco N. ¿Qué son los microbios? Ciencia [Internet]. 2017;68(2):8–12. Available from: http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/QueSonMicrobios.pdf
13. Kai A, Konishi N, Obata H. [Diarrheagenic *Escherichia coli*]. Nippon rinsho Japanese J Clin Med. 2010;68 Suppl 6(1):203–7.
14. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;8(3):207–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2298>
15. Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. Virulence. 2012;3(1):18–28.
16. Von H, Marre R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. Int J Med Microbiol. 2005;295(6-7):503–11.
17. Robinson FP, Shalit M. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Anti-Corrosion Methods Mater. 1964;11(4):11–4.
18. Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: Superbug, super genome? Trends Microbiol. 2004;12(8):378–85.
19. Fitzgerald JR. Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.; 2014; 21:542–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.020>
20. Mandigan M, Martinko J, Bender K, Buckley SD. Biología de los Microorganismos. Vol. 14^a, Pearson. 2015. 1131 p.

21. Moreno J, Scerpella E, Rastogi A, Sasken H. Infecciones causadas por *Candida* spp. resistente al fluconazol en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Reporte de un caso. *Rev Medica Hered.* 2013;6(3).
22. Cuenca-Estrella M. Infecciones por *Candida* spp. infecciones superficiales y profundas. *Medicine (Baltimore).* 2002;8(68):3615–24.
23. Colombo AL, Júnior JN, Guinea J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(6):528–38.
24. Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: Role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses.* 2014;57(1):1–11.
25. Salci TP, Negri M, Abadio AK, Svidzinski TI, Kioshima ÉS. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. *Drug Discov Today [Internet]. Elsevier Ltd;*2018;23(4):802–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.003>
26. Universidad de la República de Uruguay. Crecimiento bacteriano. 2011;(C):6.
27. Prescott LM, Harley JP, Klein D. Crecimiento microbiano. *Microbiol* 4a edición. 1999;115–36.
28. Reproducción y crecimiento microbiano. 2009;1–23. Available from: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_6_crecimiento.pdf
29. Yevenes L, Reyes Y, Campos P, Saragoni F. Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. *Av en Periodoncia e Implantol Oral.* 2003;15(1):19–24.
30. Orlando M, Guirado AA. Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L. 2005;10.
31. Ministry of Agriculture of Ecuador. Bosques Secos Ecuador. Bosques Secos en Ecuador y su Divers [Internet]. 2012;162–87. Available from: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2012/10/Bosques-Secos4.pdf>
32. Ávalos A, Elena G. Metabolismo secundario de las plantas. *Hidrobiológica.* 1998;8(2):125–32.

33. Guclu Ö, Mazza G. Saponins: Properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2007;47(3):231–58.
34. Sharma P, Tyagi A, Bhansali P, Pareek S, Singh V, Ilyas A, et al. Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives. *Food Chem Toxicol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2021;150(December 2020):112075. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112075>
35. Troisi J, Pulvento C, National I, National I, Vega A. Estado del arte de la Quinoa en el mundo 2013. 2014;(October).
36. Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* 2007;68(3):275–97.
37. Galindo J, González N, Abdalla AL, Alberto M, Lucas RC, Dos Santos KC, et al. Effect of a raw saponin extract on ruminal microbial population and *in vitro* methane production with star grass (*Cynodon nlemfuensis*) substrate. Vol. 50, *Cuban Journal of Agricultural Science.* 2016. p. 77–88.
38. Market A, Health A. Antibióticos y antimicrobianos. *Agrovetmarket* [Internet]. 1909;15. Available from: <https://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/antibioticos-y-antimicrobianos%0Ahttp://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/antibioticos-y-antimicrobianos>
39. Pérez W, Forbes G. ¿Qué es un fungicida? 2007;3–6.
40. Bravo L. Resistencia antibiótica en *Pseudomonas aeruginosa*: situación epidemiológica en España y alternativa de tratamiento. España; 2018.
41. Casado II, Mora NI, Ferrer GI, Fernández SI, Pino DI. Citotoxicidad *in vitro* y potencialidades de los compuestos quinoides como agentes antitumorales Cytotoxicity *in vitro* and potential of quinoid compounds as antitumor agents. *Rev Cuba Hematol Inmunol y Hemoter* [Internet]. 2016;32(1):30–42. Available from: <http://scielo.sld.cu>
42. Tomás C, Huamán M, Aguirre M. Extracción y clasificación de la saponina de *Sapindus saponaria* L., “Boliche.” *Rev Peru Química e Ing Química.* 2010;13(2):36–9.
43. Garcia A, Rhoden SA, Bernardi-Wenzel J, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA. Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. *J Appl Pharm Sci.* 2012;2(10):035–40.
44. Tamargo B, Salas E, Plaza LE, Blanco Y, Otero A, Sierra G. Determinación de saponinas y

otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Rev Cuba Plantas Med* [Internet]. 1996;20(1):106–16. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es

45. Yábar E, Reyes V. Eficacia de un desinfectante biodegradable a base de saponinas de quinua (*Chenopodium Quinoa* Willd) en el control de crecimiento de *Escherichia coli*. *Prospect Univ*. 2017;6.
46. Long DR, Mead J, Hendricks JM, Hardy ME, Voyich JM. 18B-Glycyrrhetic Acid inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* survival and attenuates virulence gene expression. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2013;57(1):241–7.
47. Macias A, Mera L. *Microbiología y Salud*. 2019. 150 p.
48. Díaz N. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET Rev Estud Transdiscipl* [Internet]. 2009;1(2):32–55. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=179214945004>

APÉNDICES

Apéndice 1. *Sapindus saponaria* L. (muestra).



Machacando las cáscaras de *Sapindus saponaria* L.



Maceración de cáscaras de *Sapindus saponaria* L.

Apéndice 2. Obtención de saponinas



Extracción de saponinas con el equipo Soxhlet.



Filtración del extracto hidroalcohólico

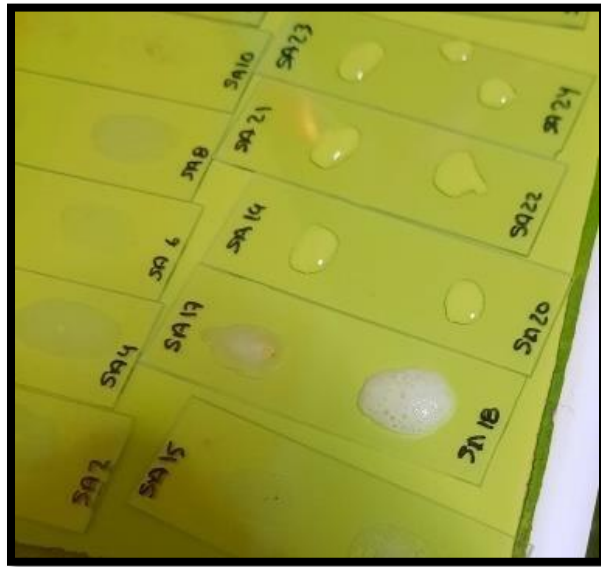


Evaporación hasta sequedad

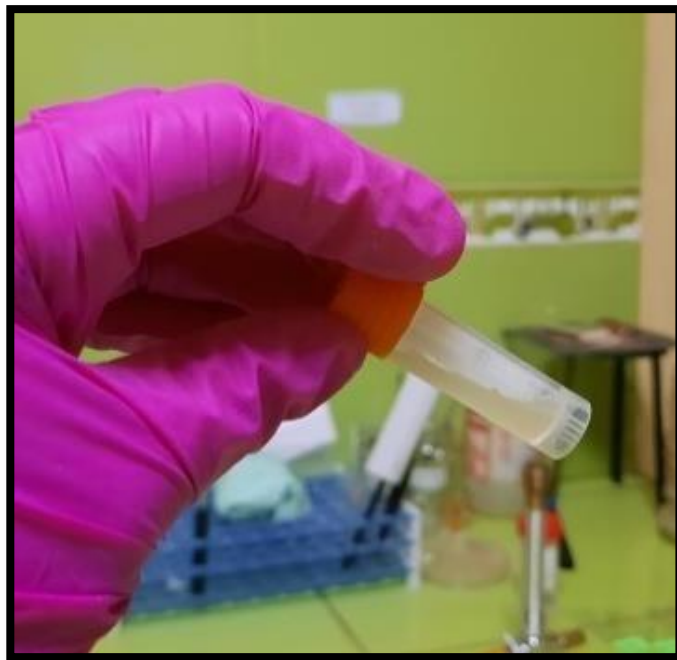


Crudo de saponina

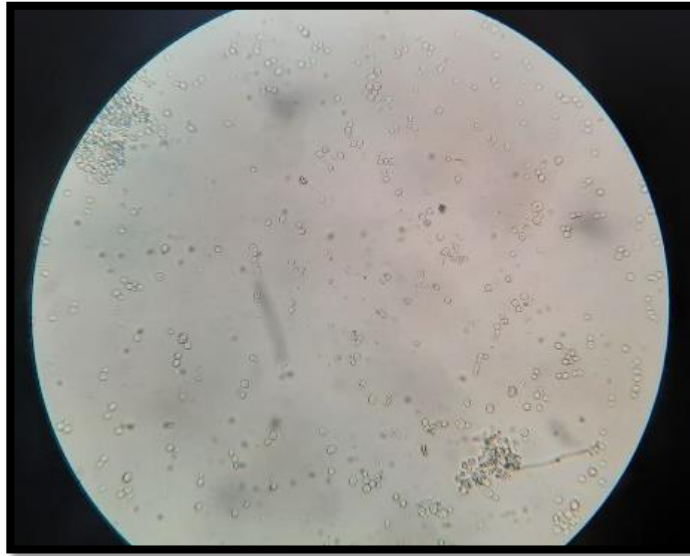
Apéndice 3. Microorganismos



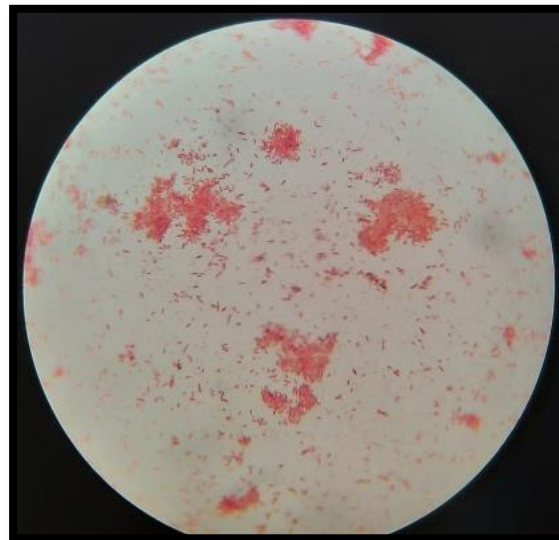
Prueba de catalasa (*S. aureus*)



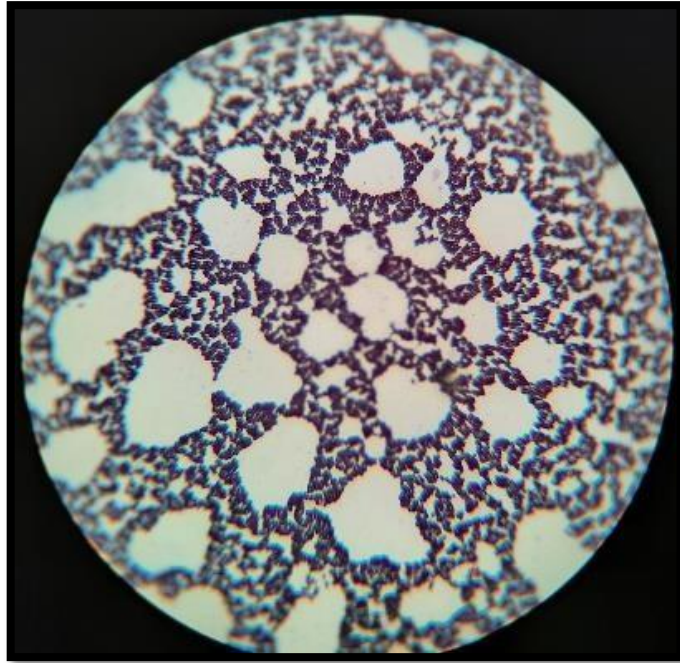
Prueba de coagulasa (*Candida* spp.)



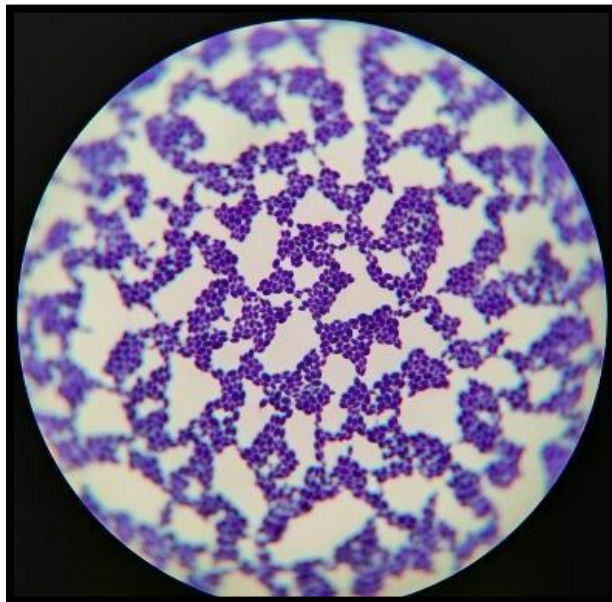
Prueba de tubo germinativo (*Candida* spp.)



E. coli



S. aureus



Candida spp,

Apéndice 4. Características de los microorganismos

Tabla 1. Características de *E. coli*

CEPA	GRAM	FORMA
EC001	GN	CB
EC002	GN	CB
EC003	GN	CB
EC004	GN	CB
EC005	GN	CB
EC006	GN	CB
EC007	GN	CB
EC008	GN	CB
EC009	GN	CB
EC010	GN	CB
EC011	GN	CB
EC012	GN	CB
EC013	GN	CB
EC014	GN	CB
EC015	GN	CB
EC016	GN	CB
EC017	GN	CB
EC018	GN	CB
EC019	GN	CB
EC020	GN	CB
EC021	GN	CB
EC022	GN	CB
EC023	GN	CB
EC024	GN	CB
EC025	GN	CB
EC026	GN	CB
EC027	GN	CB
EC028	GN	CB
EC029	GN	CB
EC030	GN	CB

Leyenda:

- **GN:** Gram negativo
- **CB:** Cocco bacilo

Tabla 2. Características de *S. aureus*

CEPA	GRAM	FORMA	CATALASA	COAGULASA
SA001	GP	C	+	+
SA002	GP	C	+	+
SA003	GP	C	+	+
SA004	GP	C	+	+
SA005	GP	C	+	+
SA006	GP	C	+	+
SA007	GP	C	+	+
SA008	GP	C	+	+
SA009	GP	C	+	+
SA010	GP	C	+	+
SA011	GP	C	+	+
SA012	GP	C	+	+
SA013	GP	C	+	+
SA014	GP	C	+	+
SA015	GP	C	+	+
SA016	GP	C	+	+
SA017	GP	C	+	+
SA018	GP	C	+	+
SA019	GP	C	+	+
SA020	GP	C	+	+
SA021	GP	C	+	+
SA022	GP	C	+	+
SA023	GP	C	+	+
SA024	GP	C	+	+
SA025	GP	C	+	+
SA026	GP	C	+	+
SA027	GP	C	+	+
SA028	GP	C	+	+
SA029	GP	C	+	+
SA030	GP	C	+	+

Leyenda:

- **GP:** Gram positivo
- **C:** Coco

Tabla 3. Características de *Candida* spp.

CEPA	T. GERM.
CS001	LG
CS002	+
CS003	-
CS004	+
CS005	+
CS006	+
CS007	LG
CS008	+
CS009	+
CS010	-
CS011	+
CS012	-
CS013	+
CS014	+
CS015	+
CS016	+
CS017	-
CS018	+
CS019	+
CS020	+
CS021	+
CS022	LG
CS023	+
CS024	LG
CS025	+
CS026	+
CS027	-
CS028	+
CS029	+
CS030	+

Leyenda:

- **LG:** levaduras gemantes

Apéndice 5. Control de resultados

Tabla 4. Efecto de las saponinas sobre el crecimiento de *Candida* spp.

CEPA	MEDIDA DE HALO SEGÙN CONCENTRACIÒN (mm)		
	20%	40%	60%
CS001	0	15	17
CS002	0	18	20
CS003	0	14	14
CS004	12	15	16
CS005	0	0	18
CS006	0	0	15
CS007	0	0	15
CS008	18	18	18
CS009	0	0	0
CS010	14	14	14
CS011	0	18	20
CS012	0	0	0
CS013	0	0	15
CS014	0	0	0
CS015	0	0	0
CS016	22	24	26
CS017	0	0	0
CS018	0	0	0
CS019	0	0	0
CS020	0	0	0
CS021	0	0	0
CS022	0	0	20
CS023	0	15	18
CS024	0	14	19
CS025	0	14	18
CS026	0	0	15
CS027	0	0	18
CS028	0	16	20
CS029	0	14	18
CS030	0	16	18