



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



Proyecto de Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

---

Evaluación de la actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori* de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. obtenidos mediante secado por aspersión.

---

**Autor:** Edison Fabricio Núñez Fuentes

**Tutor:** Ph.D. Orestes López Hernández

**Ambato-Ecuador**

**Julio - 2016**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**PhD. Orestes Darío López Hernández**

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 16 de Mayo de 2016.



---

Ph.D. Orestes López Hernández  
C.I. 1754784864  
**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Edison Fabricio Núñez Fuentes, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



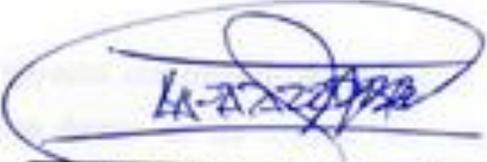
---

Sr. Edison Fabricio Núñez Fuentes  
C.I. 180469432-9  
**AUTOR**

## APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



---

Presidente del Tribunal



---

Lic. Mg. Yunys Pérez Betancourt  
C.I. 175647274-0



---

Lic. Mg. Danay Fernández Rivero  
C.I. 175718120-9

Ambato, 20 Junio de 2016

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Proyecto de Investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Sr. Edison Fabricio Núñez Fuentes  
C.I. 180469432-9  
**AUTOR**

*“El temor de Jehová es el  
principio de la sabiduría,  
Y el conocimiento del Santísimo  
es la inteligencia.”*

Proverbios 9:10

**Un agradecimiento especial al Dr. Orestes López, por su apoyo, ánimo y esmero al momento de investigar.**

# ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

## PAGINAS PRELIMINARES

Portada.....	I
Aprobación por el tutor.....	II
Declaración de autenticidad.....	III
Aprobación del tribunal de grado.....	IV
Derechos de Autor.....	V
Agradecimiento.....	VI

## TEXTO

### CAPÍTULO I

#### EL PROBLEMA

1.1. Tema de investigación.....	4
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos .....	5
1.3.1. Objetivo general .....	5
1.3.2.-Objetivos específicos .....	5

### CAPÍTULO II

#### MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos .....	6
2.2. Hipótesis.....	8
2.2.1. Efecto de la relación materia vegetal/agua (MV/A) y tiempo sobre el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles de <i>Rhizophora mangle</i> L..	8
2.2.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los polifenoles del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L. frente a <i>Helicobacter pylori</i> . .....	8
2.3.-Señalamiento de variables de la hipótesis.....	9
2.3.1. Evaluación del rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles de las cortezas de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	9
2.3.2. Análisis del efecto de los polifenoles del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L. sobre el crecimiento de la cepa <i>Helicobacter pylori</i> . .....	9

**CAPÍTULO III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1. Materiales.....	10
3.2. Métodos.....	10
3.2.1. Material vegetal.....	10
3.2.2.-Escala de laboratorio.....	10
3.2.2.1.-Obtención del extracto líquido.....	10
3.2.2.2.-Determinación de la humedad. ....	11
3.2.2.3.-Determinación de sólidos solubles totales (SST). ....	11
3.2.3.-Escala de banco.....	12
3.2.3.1.-Obtención del extracto líquido.....	12
3.2.3.2.-Concentración del extracto líquido. ....	12
3.2.4.-Secado por aspersión (Spray dryer). ....	12
3.2.5.-Espectroscopía Infrarroja (IR). ....	13
3.2.6.-Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	13
3.2.7.-Evaluación antibacteriana. ....	14
3.3.-Estadística .....	18

**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1. Análisis y discusión de resultados.....	19
4.1.1. Escala de laboratorio. ....	19
4.1.1.1. Determinación de la humedad y cenizas de las cortezas de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	19
4.1.1.2.-Determinación de sólidos solubles totales (SST). ....	20
4.1.1.3.-Determinación de fenoles totales. ....	23
4.1.2.-Escala de banco.....	26
4.1.2.1.-Determinación del rendimiento de extracción de sólidos y polifenoles del extracto acuoso de mangle rojo.....	26
4.1.3.-Secado por aspersión del extracto acuoso de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	27
4.1.4. Caracterización del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	27

4.1.4.1. Determinación de la humedad y concentración de fenoles totales. ....	27
4.1.4.2. Morfología de las partículas del extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.) .....	28
4.1.4.3. Análisis por espectroscopia infrarroja del extracto seco de mangle rojo. ....	30
4.1.5.-Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L. frente a <i>Helicobacter pylori</i> . ....	34
4.1.5.1.-Identificación de la cepa de <i>Helicobacter pylori</i> . ....	34
4.1.5.2.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM). ....	35
4.1.5.3.-Determinación cuantitativa de inhibición frente a la cepa <i>Helicobacter pylori</i> . 36	
4.2.-Verificación de hipótesis. ....	38
4.2.1. Efecto de la relación materia vegetal/agua (MV/A) y tiempo sobre el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles de <i>Rhizophora mangle</i> L. 38	
4.2.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los polifenoles del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L. frente a <i>Helicobacter pylori</i> .....	44

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1. Conclusiones .....	46
5.2. Recomendaciones.....	47

### **MATERIALES DE REFERENCIA**

Referencias Bibliográficas .....	48
Anexos.....	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Humedad, cenizas y materia orgánica de las cortezas de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	19
Tabla II. Concentración de sólidos solubles totales y rendimiento de extracción de sólidos a escala de laboratorio.....	20
Tabla III. Datos para obtener la curva de calibración de ácido gálico.....	23
Tabla IV. Absorbancia a 750 nm de los diferentes extractos de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	24
Tabla V. Concentración de fenoles totales y rendimiento de extracción de polifenoles a escala de laboratorio.....	24
Tabla VI. Rendimiento de extracción de sólidos y polifenoles del extracto acuoso de mangle rojo a nivel de banco .....	26
Tabla VII. Rendimiento de secado por spray dryer. ....	27
Tabla VIII. Cuantificación de fenoles totales y humedad del extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L.....	28
Tabla IX. Grupos funcionales presentes en el extracto seco de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	32
Tabla X. Resultados de las pruebas rápidas de identificación de la cepa <i>Helicobacter pylori</i> . ....	34
Tabla XI. Concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.) frente <i>Helicobacter pylori</i> .....	35
Tabla XII. Cuantificación del número de colonias de <i>Helicobacter pylori</i> inhibidas por el extracto de <i>Rhizophora mangle</i> L. ....	36
Tabla XIII. Resultados del rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles totales analizados.....	39
Tabla XIV. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST).....	39
Tabla XV. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de polifenoles. ....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. Evaluación del porcentaje de sólidos solubles totales (SST) según el tiempo..	21
Figura II. Evaluación del porcentaje de sólidos solubles totales (SST) según la relación MV/A. ....	22
Figura III. Curva de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu. ....	23
Figura IV. Partículas del extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.).....	29
Figura V. Distribución de tamaño de partícula del extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.).....	30
Figura VI. Espectro infrarrojo del extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.) entre 4000 cm <sup>-1</sup> y 580 cm <sup>-1</sup> . ....	31
Figura VII. Espectro infrarrojo del extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.) entre 2000cm <sup>-1</sup> y 500cm <sup>-1</sup> .....	32
Figura VIII. Cuantificación de UFC/ml de <i>Helicobacter pylori</i> en las diferentes concentraciones de extracto seco de mangle rojo ( <i>Rhizophora mangle</i> L.).....	38
Figura IX. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST). ....	40
Figura X. Efectos principales para el rendimiento de extracción de sólidos (SST).....	41
Figura XI. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción de sólidos (SST). ....	41
Figura XII. Diagrama de Pareto estandarizado para rendimiento de polifenoles. ....	42
Figura XIII. Efectos principales para el rendimiento de extracción de polifenoles.....	43
Figura XIV. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción de polifenoles.....	44

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori* de los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. obtenidos mediante secado por aspersión. El extracto acuoso a nivel de banco se obtuvo con la relación materia vegetal/agua (MV/A) 1:20 y 1 hora que presentaron a nivel de laboratorio los mejores rendimientos de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles con un  $15,78 \pm 0,14\%$  y  $5,67 \pm 0,06 \%$  respectivamente. El secado por aspersión del extracto líquido registró un rendimiento favorable de  $91,45 \pm 0,03\%$ , el mismo que conservó las propiedades químicas del extracto en su forma de polvo con una concentración polifenólica de  $340,53 \pm 1,50$  mg GAE/g análogo al contenido del extracto acuoso de  $346,46 \pm 4,36$  mg GAE/g. El contenido de humedad del extracto seco se mantuvo bajo el límite permitido para productos secos con  $1,26 \pm 0,16 \%$ , se evidenció por espectroscopia infrarroja la presencia de los grupos funcionales característicos de los polifenoles como alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos y por microscopia electrónica de barrido las partículas del polvo presentaron forma esférica con un tamaño promedio de  $2,94 \pm 1,30$   $\mu\text{m}$ . La actividad antibacteriana se evaluó in vitro mediante el método cuantitativo de dilución en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) comparando con un control positivo como claritromicina. La concentración mínima del extracto seco de mangle rojo que inhibió el crecimiento de una cepa no resistente de *Helicobacter pylori* fue de 100  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que para una cepa resistente, el extracto seco a una concentración de 800  $\mu\text{g/mL}$  inhibió su crecimiento en un  $57,64 \pm 1,16 \%$ , resultado similar al efecto causado por el control.

**Palabras claves:** antibacteriano, polifenoles, secado por aspersión, *Rhizophora mangle* L., *H.pylori*.

## ABSTRACT

In the present study evaluated the antibacterial activity against *Helicobacter pylori* of dry extract polyphenols *Rhizophora mangle* L. obtained by spray drying. The aqueous extract at the bank level was obtained with vegetal material /water (MV /A) 1:20 relation and 1 hour than in the laboratory showed the best extraction yields of total soluble solids (SST) and polyphenols with  $15.78 \pm 0.14\%$  and  $5.67 \pm 0.06\%$  respectively. Spray drying of liquid extract showed a favorable yield of  $91.45 \pm 0.03\%$ , the same as retained chemical properties of the extract in its powder form with a polyphenol concentration of  $340.53 \pm 1.50$  mg GAE / g analogue content of aqueous extract of  $346.46 \pm 4.36$  mg GAE / g. The moisture content of dried extract was maintained under the limit for dry products with  $1.26 \pm 0.16\%$ , was evidenced by spectroscopy infrared presence of the characteristic functional groups of polyphenols such as alcohols, phenols and carboxylic acids and through infrared scanning microscopy showed the powder particles spherical shape with an average size of  $2.94 \pm 1.30$   $\mu\text{m}$ . La antibacterial activity was evaluated in vitro by agar dilution quantitative method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) compared to a positive control as clarithromycin. The minimum concentration dry extract of red mangrove that inhibited the growth of a non-resistant strain of *Helicobacter pylori* was 100  $\mu\text{g/mL}$ , while for a resistant strain, the dry extract at a concentration of 800  $\mu\text{g/mL}$  inhibited growth in  $57,64 \pm 1.16\%$ , similar to the effect caused by control.

**Keywords:** antibacterial, polyphenols, spray drying, *Rhizophora mangle* L., *H. pylori*.

## INTRODUCCIÓN

La especie vegetal mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) es un árbol de tamaño mediano de 10 a 25 m de altura y 10 a 30 cm de diámetro, sin embargo, puede exceder los 35 m de altura y 70 cm de diámetro en los sitios con gran riqueza acuífera, su crecimiento fluctúa entre 1 a 1,5 m por año y su rasgo más característico es la masa de raíces ramificadas en forma de zancos propagándose profundamente y transformándolo en un bosque difícil de penetrar. Esta especie vegetal crece en una mezcla de agua dulce y salada condiciones propias de los esteros. **(Rodríguez & Vásquez, 2007).**

La presencia de esta especie vegetal medianamente desarrollada se despliega desde Panamá hasta el norte de Colombia, pero el manglar completamente prosperado solo se observa desde el norte de Ecuador hasta la parte central de Colombia con un extenso ecosistema lleno de moluscos y crustáceos **(Cuyabeno Lodge, 2014).**

*Rhizophora mangle* L. es un árbol que brinda una variedad de materia prima tanto como madera para la construcción de balsas y casas, como también compuestos químicos de uso medicinal. Su gran contenido de taninos presentes en la corteza y frutos se usan para curtir pieles y como colorante entre una gama desde rojo, marrón hasta negro. Las cortezas y hojas han sido utilizadas tradicionalmente para curar afecciones fúngicas, heridas en la piel por su carácter antiséptico y para combatir la fiebre y diarrea. **(Duque & Allen, 2006).**

El mangle rojo posee en su corteza un alto contenido de polifenoles que se verifica en su extracto acuoso con un 54,78% y otras sustancias químicas en un 45,22% **(Varcalcel et al., 2009).**

Los polifenoles, metabolitos de origen vegetal presentes en frutas, hojas y cortezas de un sin número de árboles son compuestos químicos que se caracterizan por poseer en su estructura molecular más de un grupo fenólico, entre sus propiedades se destacan ser antioxidante, astringente y antimicrobiano **(Barberán, 2003).**

El secado por spray dryer o secado por aspersión es ampliamente utilizado para microencapsular principios activos útiles en la industria farmacéutica o simplemente obtenerlos en forma de polvo para ser incorporados en formulaciones como tabletas o emulsiones. Esta técnica permite que el metabolito presentado en polvo pueda ser almacenado y conservado por más tiempo en anaquel. Las partículas obtenidas son esféricas en su mayoría y su tamaño oscila en la escala de micras lo que mejora significativo la estabilidad y eficiencia referente a la dosis particulada **(Vehring, 2007)**.

Las tabletas obtenidas con principios activos secos por spray dryer son altamente consistentes y fuertes por el máximo aprovechamiento del aglutinate. El ingrediente activo al estar granulado optimiza su distribución en la droga, en el color y el flujo. La biodisponibilidad del metabolito mejora al producirse una dispersión sólida estable, característica fundamental para una excelente disolución del fármaco **(Swati & Wagh, 2014)**.

El bacilo *Helicobacter pylori* descubierto por Barry Marshall y Robin Warren en el año de 1982 es causante de afecciones gastroduodenales en el ser humano como la gastritis al producir inflamación de la mucosa gástrica, la formación de úlceras y el agravante final de adquirir un cáncer gástrico. Los síntomas de la enfermedad en su mayoría se presentan en la etapa avanzada entre ellos un dolor abdominal fuerte y náuseas. El tratamiento tradicional conlleva antibióticos como claritromicina, amoxicilina e inhibidores de la bomba de protones que a la larga causan resistencia de dicho microorganismo. **(Toledo & Cabral, 2006)**.

*Helicobacter pylori* es una bacteria patógena Gram negativa que tiene forma espiral cuando se observa directamente de muestras de biopsias, sin embargo su forma varía a cocoide al ser cultivada en medios sólidos que se han mantenido por mucho tiempo. Su cultivo in vitro es complejo debido a que la bacteria es poco estable y requiere un sinnúmero de condiciones para su crecimiento como medio enriquecido con sangre y un ambiente microaerófilo (5% de O<sub>2</sub> y 5-10% CO<sub>2</sub>) **(Cava & Cobas, 2003)**.

A medida que los medicamentos tradicionales para combatir el bacilo *Helicobacter pylori* cada vez se vuelven ineficaces y producen la resistencia de la misma, los polifenoles, principio activo del extracto de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) se convierte en una alternativa natural y adecuada contra dicha cepa, por lo que el presente estudio intenta evaluar los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. como antibiótico natural frente a *Helicobacter pylori*, para lo cual se analiza la producción del extracto acuoso a nivel de laboratorio y de banco, su secado por aspersión y la caracterización del polvo usado para la evaluación contra dicha cepa mediante dilución en agar.

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### 1.1. Tema de investigación

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A *Helicobacter pylori* DE LOS POLIFENOLES DE *Rhizophora mangle* L. OBTENIDOS MEDIANTE SECADO POR ASPERSIÓN.**

### 1.2. Justificación

La importancia en el tratamiento de enfermedades que afectan la mucosa gastrointestinal ya sea por bacterias como la *Helicobacter pylori* en un tipo de gastritis o por el consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que provocan irritación y úlceras son el motivo de la búsqueda de nuevas alternativas para combatirlas de forma efectiva y natural, una de esas alternativas es la utilización del extracto de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) o manglar rojo el cual posee una gran cantidad de polifenoles que en su mayoría son taninos, principio activo que le confiere a su extracto un sinnúmero de propiedades entre las que se destacan como astringente, antiséptico y antibacteriano.

Además en los últimos años se ha verificado en modelos in vitro su capacidad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante como también la acción moderada sobre úlceras gastroduodenales. Por tal motivo para un mejor aprovechamiento del extracto líquido de dicha materia vegetal se incorpora al proceso la tecnología de secado por aspersion o spray dryer que permite obtener un extracto concentrado seco con mayor estabilidad y biodisponibilidad, propiedades imprescindibles de los principios activos para su uso en la producción de compuestos farmacéuticos.

La disposición en cuanto a la materia vegetal es alta, debido a que a lo largo de las costas ecuatorianas el manglar está completamente desarrollado formando ríos y esteros,

permaneciendo accesible al público y su utilización de forma moderada y sostenible no provoca un daño ambiental (**Cuyabeno Lodge, 2014**).

Es fundamental conocer también que el desarrollo técnico de medicamentos de origen vegetal es una prioridad de los organismos de salud (OMS) que impulsa su investigación junto con sus respectivos ensayos clínicos por su ventaja en disminuir reacciones adversas y toxicidades asociadas (**OMS, 2003**).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

- Evaluar la actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori* de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. obtenidos mediante secado por aspersión.

#### **1.3.2.-Objetivos específicos**

- Secar el extracto de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) a través del método de secado por aspersión.
- Caracterizar el extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.).
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) frente a la cepa de *Helicobacter pylori*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes investigativos

Los polifenoles son metabolitos secundarios de origen vegetal que han demostrado a través de muchas investigaciones realizadas en los últimos años sus magníficos beneficiosos en la salud del ser humano. Las propiedades antioxidantes de los polifenoles confirman ser la principal fuente de sus efectos positivos entre los que se destacan la optimización del comportamiento lipídico, la disminución de la degradación de lipoproteínas de baja densidad y efectos vasodilatadores enfocados en el sistema cardiovascular. Al ser las enfermedades cardiovasculares la mayor causa de muerte en el mundo es de gran importancia el estudio de dicho compuesto. Estos metabolitos además regulan los procesos de muerte celular en el endotelio vascular y poseen visibles efectos antiinflamatorios y antibacterianos. **(Quiñones et al, 2012).**

El extracto de *Rhizophora mangle* L. en estado acuoso y principalmente de su corteza presenta propiedades anti-ulcero génicos, antimicrobianas y cicatrizante, efectos producidos a causa de su particular composición química. Los compuestos polifenólicos en un 54,78% y otros componentes estructurales en un 45,22% están presentes en dicho extracto. El estigmasterol, p-sitosterol y campe-esterol que son fitoesteroles se encuentran en un 0,0285%. La mayor parte de compuestos polifenólicos son taninos poliméricos (80%) y taninos hidrolizables como ácido elágico, epicatequina, ácido clorogénico, ácido gálico y catequina (20%) **(Varcancel et al., 2009).**

Se ha demostrado que el extracto seco de *Rhizophora mangle* L. obtenido por liofilización regula moderadamente la colitis ulcerativa ya sea administrado de manera oral en fase aguda o crónica, contribuyendo con un pequeña disminución en los aspectos clínicos, patológicos e inflamatorios probados en un modelo experimental de inducción con ácido acético en ratas **(Sánchez et al., 2009).** El extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. y su contenido polifenólico representa el principal precursor de efectos

positivos en un modelo in vivo de curación de heridas abiertas asépticas en ratas debido a sus propiedades antioxidantes (**Faure et al., 2009**).

Resultados señalan que dosis bajas de acetato de etilo (EtOAc), fracciones butanólicas (BuOH) y particularmente de extracto de corteza cruda de *Rhizophora mangle* L. proveen gastroprotección significativa. Una variedad de mecanismos como la participación del NO, SH y la mucosidad contribuyen en la actividad antiulcerosa de *Rhizophora mangle*. Entre los factores que se relacionan de manera directa con los efectos antisecretores, citoprotectores y curativos de las fracciones butanólicas como del extracto de *Rhizophora mangle* se señala la mejora de los niveles de prostaglandinas (PGE) y la regulación positiva del factor de crecimiento epidermal (EJ.) (**Faria et al., 2012**).

En referencia a la actividad antibacteriana la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto de hoja de *Rhizophora mangle* L. posee el mejor rendimiento para inhibir el crecimiento de cepas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*), mientras que el extracto de corteza tiene una mejor eficacia frente a cepas Gram-negativas (*Echerichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiela pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) (**Ferreira et al., 2011**). Respecto a la actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* el extracto de *Rhizophora mangle* L. presenta una actividad significativa ( $p \leq 0.05$ ) por método de dilución en agar (**Quintana & Yax, 2012**).

La tecnología de spray dryer o secado por aspersión en el transcurso de los años ha ganado mayor protagonismo en la industria farmacéutica para obtener extractos secos que poseen ingredientes activos de gran interés. Los extractos secos son apreciados por la industria farmacéutica porque no poseen alcoholes como el etílico permitiendo una sencilla manipulación en el almacenamiento y transporte, además de una alta estabilidad. Dos de las ventajas más importantes es su fácil escalado y costos de implementación de los equipos que son bajos en comparación con otro método de secado. (**López et al., 2010**).

La microencapsulación por spray dryer en la industria alimentaria es de uso fundamental por su fácil realización y porque permite alargar la vida útil de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante presentes en alimentos como frutas de rápida perecibilidad. Los metabolitos bioactivos al estar secos pueden resistir la oxidación por condiciones negativas de temperatura y evitar reacciones adversas. (González *et al.*, 2015).

Las investigaciones avalan las propiedades beneficiosas de los polifenoles del extracto de *Rhizophora mangle* L., debido a esto la actual investigación busca brindar nuevos datos que comprueban la actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* del extracto seco de mangle rojo de alta estabilidad obtenido por spray dryer.

## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Efecto de la relación materia vegetal/agua (MV/A) y tiempo sobre el rendimiento de extracción acuosa de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles de *Rhizophora mangle* L.**

#### **Hipótesis Nula**

La relación (MV/A) y tiempo no afectan el rendimiento de extracción de SST y polifenoles de *Rhizophora mangle* L.

#### **Hipótesis Alternativa**

La relación (MV/A) y tiempo afectan el rendimiento de extracción de SST y polifenoles de *Rhizophora mangle* L.

### **2.2.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. frente a *Helicobacter pylori*.**

#### **Hipótesis Nula**

Los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. no presentan actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori*.

## **Hipótesis Alternativa**

Los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. presentan actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori*.

### **2.3.-Señalamiento de variables de la hipótesis**

#### **2.3.1. Evaluación del rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles de las cortezas de *Rhizophora mangle* L.**

- Evaluación de la relación materia vegetal/Agua (MV/A).
- Evaluación del tiempo de extracción.
- Producción de un extracto acuoso de color rojo con contenido polifenólico.

#### **2.3.2. Análisis del efecto de los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. sobre el crecimiento de la cepa *Helicobacter pylori*.**

- Concentración mínima inhibitoria del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. contra la cepa *Helicobacter pylori* a través de la metodología de dilución en agar.
- Cuantificación del número de colonias y UFC/mL inhibidas a diferentes concentraciones del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. mediante la técnica de difusión en placa.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

Cortezas de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) (Cojimies, Ecuador), agua destilada, agua potable, agua osmotizada (Osmoqua, Ambato), Folin-Ciocalteu (FCR), carbonato de sodio (Spectrum<sup>®</sup>, USA), biopsias de úlcera gástrica (aislamiento de la cepa *Helicobacter pylori*) (SOLCA, Ambato), agar Mueller Hinton (MHA) (HiMedia<sup>®</sup>, USA), caldo infusión cerebro corazón (IBH) (HiMedia<sup>®</sup>, USA), esferas de vidrio (φ 4 mm) (Sigma-Aldrich, USA), sangre humana desfibrinada, claritromicina (MK<sup>®</sup> - TQFarma, Ecuador).

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Material vegetal.

Las cortezas del árbol de mangle rojo o manglar rojo (*Rhizophora mangle* L.), especialmente de árboles maduros se recolectaron en los esteros de playa Cojimies, provincia de Manabí, Ecuador.

##### 3.2.2.-Escala de laboratorio.

###### 3.2.2.1.-Obtención del extracto líquido.

El material vegetal se limpió, las sustancias extrañas se retiraron y el material fresco se secó bajo la acción de la luz solar por 11 días. Las cortezas fueron molidas en un molino de tornillo sin fin y el tamaño del material se registró en relación a su largo y ancho antes de iniciar la decocción acuosa. El material vegetal triturado se colocó en vasos de precipitación pyrex de 600 mL de capacidad que contenían 500 mL de agua osmotizada hirviendo (92°C, Ambato) sobre una plancha de calentamiento con agitación media (IKA<sup>®</sup>C-MAG, China) a su máxima capacidad de calentamiento. Se evaluó el tiempo de extracción a 0,5 h ,1 h y 1,5 h y la relación material vegetal/agua (MV/A) a 1:10 (50

gr/500 mL) ,1:15 (33,33 gr/500 mL) y 1:20 (25 gr/500 mL) con el fin de obtener una cantidad de polifenoles elevada.

#### **3.2.2.2.-Determinación de la humedad.**

La humedad se evaluó en el material vegetal antes y después del proceso de secado mediante la balanza infrarroja (Citizen, USA.) por duplicado. En el porta muestras de la balanza se colocó 3 g de cada materia vegetal y se esperó el tiempo necesario hasta que el equipo indique el valor final.

#### **3.2.2.3.-Determinación de sólidos solubles totales (SST).**

El porcentaje de sólidos solubles totales se obtuvo en la balanza de humedad (Citizen, USA.) por el principio gravimétrico. En la misma se colocó 3 g del extracto líquido de cada una de las muestras de los 10 ensayos. El valor del porcentaje de SST resultó de la diferencia del cien por ciento menos el porcentaje de humedad, el proceso se realizó por duplicado.

#### **3.2.2.4.-Determinación de fenoles totales.**

Se utilizó el método modificado (Folin-Ciocalteu ,1927) que obtiene un producto de color azul por la acción de compuestos fenólicos al reducir un complejo fosfowolframato-fosfomolibdato. En tubos de ensayo se colocó 0,1 mL del extracto líquido de mangle rojo previamente diluido y centrifugado (10 min a 12000 rpm) y 0,1 mL de Folin –Ciocalteu, se dejó reaccionar por 3 minutos y luego se agregó 2 mL de solución de carbonato de sodio (75 g/L).Finalmente se completó el volumen de cada tubo de ensayo hasta 5 mL con agua destilada, se agitó bien cada tubo en un vórtex ( Mixer, Reino Unido) y enseguida se llevó a una estufa a 60 °C por 15 min, dicho proceso se desarrolló por duplicado. Se contó con un espectrofotómetro UV (HACH, USA.) para la medición de las absorbancias de cada una de las muestras a 750 nm de longitud. La curva de calibración se obtuvo a partir de un stock de ácido gálico de 200 mg/L, del cual se obtuvieron distintas soluciones diluidas de 50,61 mg/L, 99,53 mg/L,

151,05 mg/L y 195,99 mg/L. Se les aplicó el mismo tratamiento de reacción que a las muestras de mangle rojo para la medición de sus absorbancias a 750 nm.

### **3.2.3.-Escala de banco.**

#### **3.2.3.1.-Obtención del extracto líquido.**

El ensayo a escala de laboratorio con los factores material vegetal/agua (MV/A) y tiempo que produjeron el mayor rendimiento de extracción de polifenoles se escaló a nivel de banco. En la extracción se usó un reactor cilíndrico de acero inoxidable de 20 L de capacidad con agitación mecánica de 2500 rpm y un sistema de calentamiento hasta 100°C. Se colocó en el reactor 14 litros de agua osmotizada, a continuación se esperó que el agua hierva y se agregó 0,7 kg del material vegetal triturado (MV/A 1:20). La mezcla se sometió a una hora de decocción desde el comienzo de la ebullición y el volumen final se filtró y midió. En el extracto resultante se determinó el contenido de sólidos solubles totales y polifenoles totales con el mismo procedimiento a escala de laboratorio (Ítem 3.2.2.3 y 3.2.2.4).

#### **3.2.3.2.-Concentración del extracto líquido.**

Un volumen de 1000 ml del extracto líquido filtrado obtenido del reactor se colocó en el balón de vidrio del rotaevaporador (EYELA, Tokyo) y se sometió a calentamiento a una temperatura de 92°C con una rotación media hasta alcanzar un volumen final de 100 mL, eliminando el 90% de agua. El proceso se realizó con todo el volumen producido a escala de banco y se analizó el contenido de sólidos solubles totales y polifenoles totales de este extracto concentrado según los Ítem 3.2.2.3 y 3.2.2.4.

#### **3.2.4.-Secado por aspersión (Spray dryer).**

El extracto líquido concentrado diez veces más del producido en el reactor se llevó al secador por aspersión (Büchi B 191, Suiza) a una temperatura de entrada de 140 °C y de salida de 80 °C. El producto seco se pesó con el fin de calcular el rendimiento de secado.

En el extracto seco se determinó también el contenido humedad y de polifenoles totales (Ítem 3.2.2.2 y 3.2.2.4).

#### **3.2.4.1.-Determinación del rendimiento de secado.**

El rendimiento de secado se determinó a través de la siguiente expresión (López *et al.*, 2008):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{R \cdot X_r}{T \cdot X_t} * 100 \quad [\text{Ec 1}]$$

Donde:

R: masa de polvo obtenido (g),  $X_r: [(100 - \text{humedad del polvo}) / 100]$ , T: volumen de extracto alimentado (mL), concentración de sólidos en el extracto alimentado (g/ mL).

#### **3.2.5.-Espectroscopía Infrarroja (IR).**

La identificación de los grupos funcionales presentes en el extracto seco del mangle rojo se realizó mediante el espectrofotómetro infrarrojo (JASCO FT/IR- 4100, España) perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, para lo cual una mínima cantidad de muestra se colocó sobre la placa porta muestras de seleniuro de zinc previa calibración del equipo. El espectro con sus respectivos picos que representan a cada grupo funcional se obtuvo por el análisis del software Spectra Analysis.

#### **3.2.6.-Microscopia electrónica de barrido (SEM).**

Para determinar el tamaño junto con la forma de las partículas del polvo de mangle rojo se usó un microscopio electrónico de barrido (TESCAN, Alemania) de propiedad de la Escuela Superior Politécnica del Ejército de Quito. Una mínima cantidad del polvo de mangle con 0% de humedad se colocó en el porta muestras circular de 0,5 cm de radio y se fijó con cinta de carbono, luego la muestra se recubrió con oro a través de un metalizador con función de vacío (Q150R, United Kingdom). El espesor de oro de 20 nm permitió visualizar y analizar las características de las partículas al momento que se colocó la muestra en el equipo.

### **3.2.7.-Evaluación antibacteriana.**

#### **3.2.7.1.-Aislamiento de *Helicobacter pylori*.**

Para el aislamiento se obtuvo biopsias de una úlcera gástrica provenientes de una paciente de 57 años que se sometió a endoscopia, estas muestras se conservaron y transportaron bajo refrigeración a 4 °C en tubos de ensayo de tapa rosca que contenían 10 mL de medio de cultivo líquido infusión cerebro corazón (IBH), posteriormente las muestras se incubaron por 24 horas a 37 °C. El tubo con la muestra de biopsia que presentó mayor turbidez, signo del potencial crecimiento de la bacteria fue utilizada para ser inoculada en medio de cultivo sólido, para lo cual se agregó 100 uL de la muestra sobre medio agar Mueller Hinton(MHA) enriquecido con 7% de sangre humana desfibrinada (sangre fresca obtenida por agitación junto con perlas de vidrio estériles) y se difundió sobre toda la superficie de la caja Petri plástica de 25 mL de capacidad para obtener colonias aisladas de la bacteria. El proceso se efectuó por triplicado usando la cámara de flujo laminar (MAGNEHELIC, USA). Las cajas Petri inoculadas se colocaron dentro de una jarra anaeróbica (JON WHITLEY SCIENTIFIC, Inglaterra) donde se encendió una vela que consumió el oxígeno en el interior de la misma, mientras permanecía cerrada herméticamente proporcionando un ambiente microaerófilo (5% O<sub>2</sub> y 5-10% CO<sub>2</sub>) adecuado para el crecimiento de la cepa de *Helicobacter pylori*, enseguida se incubó durante 7 días a 37 °C en la incubadora (MEMMERT, USA).

#### **3.2.7.2.-Identificación de la cepa *Helicobacter pylori*.**

Las colonias que crecieron después de los 7 días de incubación sobre el medio agar Mueller Hinton (MHA) enriquecido con 7% de sangre humana desfibrinada y que presentaron similitud a gotas de rocío de tonalidad grisácea, característica macroscópica particular de las colonias de dicha cepa se sometieron a pruebas de ureasa, catalasa, oxidasa y tinción de Gram para confirmar su presencia debido a que *Helicobacter pylori* es positiva a todas estas reacciones.

#### **3.2.7.2.1. Prueba de la catalasa.**

Sobre un portaobjetos de vidrio se colocó 2 a 3 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, luego 3 a 4 colonias fueron agregadas en la solución. La producción de burbujas indicó la presencia de catalasa y por tal motivo la reacción fue positiva.

#### **3.2.7.2.2. Prueba de la oxidasa.**

Se agregó sobre discos de oxidasa (Microbiology Oxidase) 3 a 4 colonias, el cambio en un tiempo de 30 segundos de color blanco del disco a un color azul oscuro determinó la reacción como positiva.

#### **3.2.7.2.3. Prueba de la ureasa.**

En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de solución de urea al 6% y 0,2 mL de una solución indicador rojo de fenol al 0,05 %, enseguida se incorporó 3 a 4 colonias dentro de dicha solución a temperatura ambiente. La reacción fue positiva de manera inmediata por un cambio de color de amarillo-naranja a fucsia-rosa

#### **3.2.7.2.4. Tinción de Gram.**

Se realizó un frotis sobre un portaobjetos de vidrio con una mínima cantidad del material microbiológico y se fijó con calor. A continuación se agregó cristal violeta por 30 a 60 segundos, con agua destilada se lavó la mezcla, después se añadió como mordiente lugol por el lapso de 30 a 60 segundos y por 5 segundos se colocó alcohol-cetona para decolorar. El producto se lavó nuevamente con agua destilada, por 5 minutos se adicionó carbol fucsina como colorante secundario y finalmente se desarrolló un tercer lavado con agua y se secó. La muestra tratada se observó bajo el lente 100 X con aceite de inmersión y se identificó su forma y color de tinción.

### **3.2.7.3. Mantenimiento de la cepa *Helicobacter pylori*.**

Las colonias que se identificaron como *Helicobacter pylori* se inocularon sobre nuevo medio agar Mueller Hinton (MHA) enriquecido con 7% de sangre humana desfibrinada siguiendo el mismo procedimiento del ítem 3.2.7.1 a través de estrías compuestas. El procedimiento se realizó por triplicado y parte del crecimiento obtenido luego de los 7 días de incubación se conservaron dentro de viales que contenían 1 mL de caldo infusión cerebro corazón (IBH) y 1 mL de glicerol al 15 % que se llevaron a congelación. La otra parte del crecimiento se utilizó para la formación del inóculo en 5 mL de medio de cultivo líquido IBH que se incubó durante 3 a 4 horas a 37 °C dentro de la jarra de anaerobios para estandarizarse al patrón McFarland 3. Este inóculo estandarizado se ocupó en el ensayo de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).

### **3.2.7.4.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).**

Para la evaluación mediante la metodología de dilución en agar (CLSI/NCCLS, USA) se efectuó la inoculación de la bacteria sobre la superficie de 5 cajas Petri que contenían 25 mL de medio de cultivo agar Mueller Hinton (MHA) enriquecido con 7% de sangre humana desfibrinada con o sin antibiótico. La técnica de sembrado utilizada fue estriado compuesto mediante un asa bacteriológica metálica a partir de un inóculo estandarizado al patrón McFarland 3 (equivalente a  $9 \times 10^8$  UFC/ mL).

Entre las cajas se contó con el control negativo, sin antibiótico, que contenía 1 mL de agua destilada estéril, 1,75 mL de sangre desfibrinada y 22,25 mL de medio agar Mueller Hinton. El control positivo, con antibiótico, 1 mL de claritromicina 0,125 µg/mL (antibiótico de uso comercial contra *Helicobacter pylori*), 1,75 mL de sangre humana desfibrinada y 22,25 mL de medio agar Mueller Hinton. Las tres cajas Petri restantes fueron de agar planta (medio de cultivo + extracto de mangle rojo con función antibacteriana) de 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL de concentración en un volumen final de 25 mL. El agar planta de 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL contenía el mismo volumen de medio agar Mueller Hinton y sangre desfibrinada que el control positivo y

negativo, pero el volumen restante de cada caja de agar planta se completó con 1 mL de solución de extracto seco de mangle rojo de 625 µg/mL, 1 mL de 1250 µg/mL y 1 mL de 2500 µg/mL de concentración respectivamente. Los resultados se observaron luego de 7 días de incubación a 37 °C dentro de la jarra de anaerobios y se evaluó la presencia o ausencia de crecimiento para establecer si el extracto es activo o no contra la cepa *Helicobacter pylori*, el proceso se ejecutó por duplicado.

#### **3.2.7.5. Determinación cuantitativa de inhibición frente a la cepa *Helicobacter pylori*.**

La bacteria se inoculó en 5 cajas Petri que contenían 25 ml de medio de cultivo agar Mueller Hinton (MHA) enriquecido con 7% de sangre humana desfibrinada con o sin antibiótico. Se partió de un inóculo estandarizado al patrón McFarland 0,5 (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) y se procedió a diluir entre  $1/(2 \times 10^5)$  para conseguir un número de colonias contables de 30 a 150. La técnica de sembrado utilizada en este ensayo fue difusión en placa agregando 100 µL del inóculo diluido. Una mayor precisión al momento de diluir el inóculo se consiguió midiendo su absorbancia y a través de la ecuación de la recta de la escala de McFarland se determinó su concentración más aproximada en UFC/mL (Anexo XII).

Entre las cajas se dispuso el control negativo (sin antibiótico), control positivo (claritromicina 0,125 µg/mL) y 5 cajas con agar planta de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL y 800 µg/mL de concentración de mangle rojo en un volumen final de 25 mL. Las cantidades del medio MHA, sangre humana desfibrinada y antibiótico para el control positivo como también para las cajas de agar planta son iguales a las descritas en el Ítem 3.2.7.4., pero con diferente concentración del antibiótico natural evaluado. El proceso se desarrolló por duplicado y los resultados se observaron luego de 7 días de incubación a 37 °C dentro de la jarra de anaerobios y se contó el número de colonias para establecer el porcentaje de crecimiento inhibido por el extracto de mangle rojo.

### **3.3.-Estadística**

Mediante un diseño  $3^2$  con un punto central y una réplica, junto con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.I se evaluó el efecto del tiempo a tres niveles (0,5 h ,1 h y 1,5 h) y la relación materia vegetal/agua (MV/A) (1:10,1:15 y 1:20) sobre el proceso de extracción dinámica de los polifenoles de las cortezas de mangle rojo, utilizando los valores de rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y de polifenoles.

La evaluación antibacteriana del extracto seco se comparó con un control positivo (claritromicina 0,125  $\mu\text{g/mL}$ ) y un control negativo (sin antibiótico), el crecimiento en las diferentes concentraciones del extracto igual al control negativo indicó su inactividad, mientras su visible inhibición como el control positivo su actividad.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Análisis y discusión de resultados

##### 4.1.1. Escala de laboratorio.

##### 4.1.1.1. Determinación de la humedad y cenizas de las cortezas de *Rhizophora mangle* L.

Los resultados de la Tabla I evidencian la reducción de la humedad a través del proceso de secado al sol, contenido de materia orgánica y cenizas de las cortezas antes y después de tratarlas por 11 días.

**Tabla I. Humedad, cenizas y materia orgánica de las cortezas de *Rhizophora mangle* L.**

Materia vegetal	Humedad (%)	Cenizas (%)	Materia orgánica (%)
Cortezas de mangle rojo antes del secado al sol.	$43,05 \pm 0,72$	$12,29 \pm 0,93$	$87,71 \pm 0,93$
Cortezas de mangle rojo después de secado al sol (11 días).	$14,52 \pm 0,37$	$12,33 \pm 0,01$	$87,67 \pm 0,01$

El  $14,52 \pm 0,37$  % de humedad de las cortezas de mangle rojo que se utilizó para el proceso de extracción de polifenoles es óptima, así como el método y tiempo de secado. Esta conclusión se corrobora según una investigación realizada por **Pérez et al., 2009** que manifiesta que la humedad de las cortezas de *Rhizophora mangle* L. dispuestas para la mejor extracción de sus componentes debe ser menor al 15%, tratadas al sol durante 7 días, registrando la disminución de la humedad de 34,12% a 14,2%, valores semejantes al presente estudio.

#### 4.1.1.2.-Determinación de sólidos solubles totales (SST).

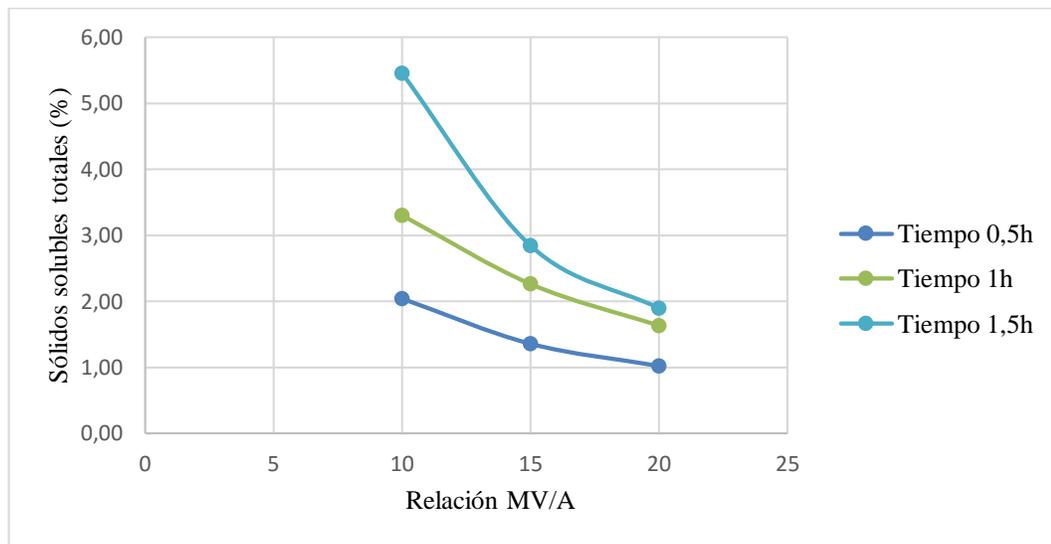
Las cortezas molidas de *Rhizophora mangle* L. con un tamaño promedio de 0,6\*1,2 cm se sometieron a diferentes factores de decocción en cuanto al tiempo y relación materia vegetal/agua (MV/A), manteniendo durante todo el proceso una temperatura de ebullición. En la Tabla II se muestran las concentraciones de los sólidos solubles totales y el respectivo rendimiento de extracción de cada ensayo.

**Tabla II. Concentración de sólidos solubles totales y rendimiento de extracción de sólidos a escala de laboratorio.**

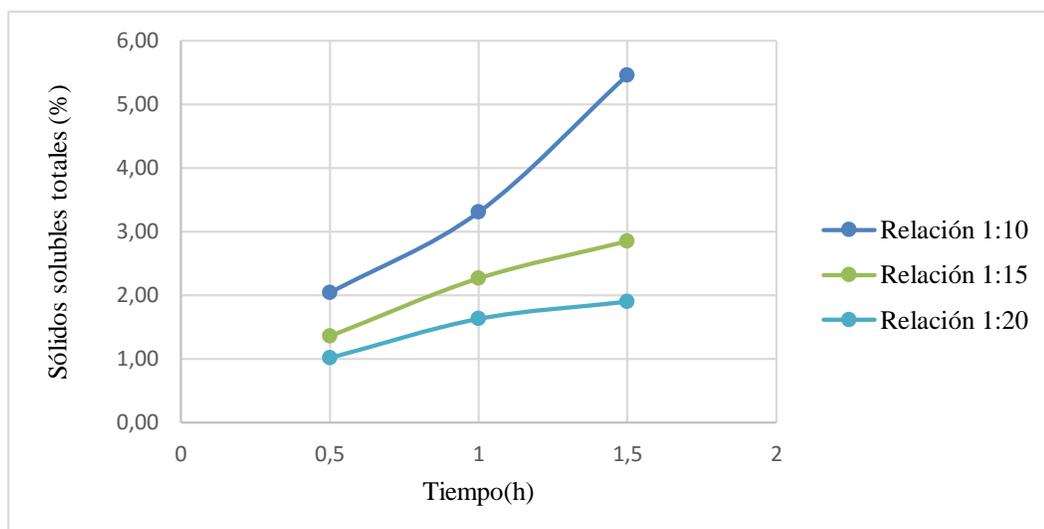
Tratamientos	Relación (M/A)	Tiempo (h)	Volumen de extracto obtenido (ml)	Concentración de sólidos(SST) (% p/v)	Rendimiento de extracción de sólidos (%)
M1	1:15	0,5	310	1,36 ± 0,01	12,59 ± 0,13
M2	1:15	1,5	115	2,85±0,02	9,83 ± 0,07
M3	1:20	1,5	151	1,90±0,02	11,43 ± 0,11
M4	1:10	1	170	3,31±0,02	11,20 ± 0,06
M5	1:15	1	215	2,26±0,01	14,57 ± 0,09
M6	1:10	1,5	90	5,46±0,01	9,80 ± 0,03
M7	1:20	1	245	1,63±0,01	15,78 ± 0,14
M8	1:10	0,5	295	2,04±0,02	12,04 ± 0,13
M9	1:20	0,5	320	1,02±0,01	12,94 ± 0,10
M10	1:15	1	212	2,30±0,01	14,53 ± 0,09

El porcentaje de SST de los ensayos varía en un rango  $1,36 \pm 0,01$  a  $5,46 \pm 0,01$  % p/v, entre ellos el tratamiento M4 de  $3,31 \pm 0,02$  % p/v es similar a un valor de  $3,73 \pm 0,23$  % de SST registrado en un estudio de extracción sólido/líquido de cortezas de *Rhizophora mangle* L. secadas al sol, relación MV/A de 1:10 y 1 hora de decocción a 90°C (Pérez *et al.*, 2009), parámetros iguales a los analizados en este tratamiento, lo cual indica que la extracción acuosa a nivel de laboratorio en la presente investigación es favorable.

La concentración de sólidos solubles totales (SST) de los extractos alcanzados en cada tratamiento son directamente proporcional con la temperatura, el tiempo de extracción y materia vegetal utilizada en la relación MV/A (Figura I y II). La tendencia de estos valores se comprueban en un estudio sobre la cinética de lixiviación de cortezas de *Rhizophora mangle* L., que señala que a 90°C luego de un periodo de 30 min de extracción se alcanza la mayor concentración de SST que prosigue hasta 90 min, mientras que a valores inferiores de temperatura como 25 °C, 45 °C y 70 °C la concentración de sólidos es menor y el tiempo de mayor potencial de concentración es a 20 min (Rodríguez *et al.*, 2012).



**Figura I. Evaluación del porcentaje de sólidos solubles totales (SST) según el tiempo.** Porcentaje de sólidos solubles totales de los extractos obtenidos a escala de laboratorio en función a la relación MV/A (1:10 ,1:15 y 1:20) a tres tiempos diferentes (0,5 h ,1 h y 1,5).



**Figura II. Evaluación del porcentaje de sólidos solubles totales (SST) según la relación MV/A.** Porcentaje de sólidos solubles totales de los extractos obtenidos a escala de laboratorio en función del tiempo (0,5 h ,1 h y 1,5) a tres proporciones MV/A diferentes (1:10 ,1:15 y 1:20).

Aunque la relación MV/A 1:10 y el tiempo de 1,5 h registran el valor más alto de concentración de sólidos solubles totales (SST) no quiere decir que produzca la mayor cantidad de SST por gramo de materia vegetal. El mayor rendimiento se consiguió con una relación MV/A de 1:20 con 1 h de decocción, el resultado se debe a que en este tratamiento existe mayor cantidad de disolvente y consecuentemente no hay saturación de material vegetal como en los demás ensayos donde ocurre tal fenómeno con un desperdicio del recurso vegetal. Otras de las causas que provocan rendimientos bajos en los demás tratamientos son la evaporación de la mayor parte del disolvente, pérdida de sólidos por la adherencia en las paredes del recipiente de extracción y la reabsorción del líquido extraído por las cortezas trituradas luego de 1 hora de decocción. Por tal motivo con una relación MV/A de 1:20 y 1 h de decocción existe mayor eficiencia del disolvente que genera la mayor cantidad de sólidos por cada gramo de cortezas de mangle rojo.

#### 4.1.1.3.-Determinación de fenoles totales.

A través del método Folin-Ciocalteu se determinó el contenido de fenoles totales de los extractos de mangle rojo obtenidos a nivel de laboratorio, para ello se realizó la curva de calibración de ácido gálico que se registra posteriormente (Tabla III y Figura III).

Tabla III. Datos para obtener la curva de calibración de ácido gálico.

Concentración ácido gálico (mg/L)	Abs. (750 nm)
0,00	0,000±0,000
50,61	0,096±0,001
99,53	0,187±0,002
151,05	0,263±0,004
195,99	0,357±0,002

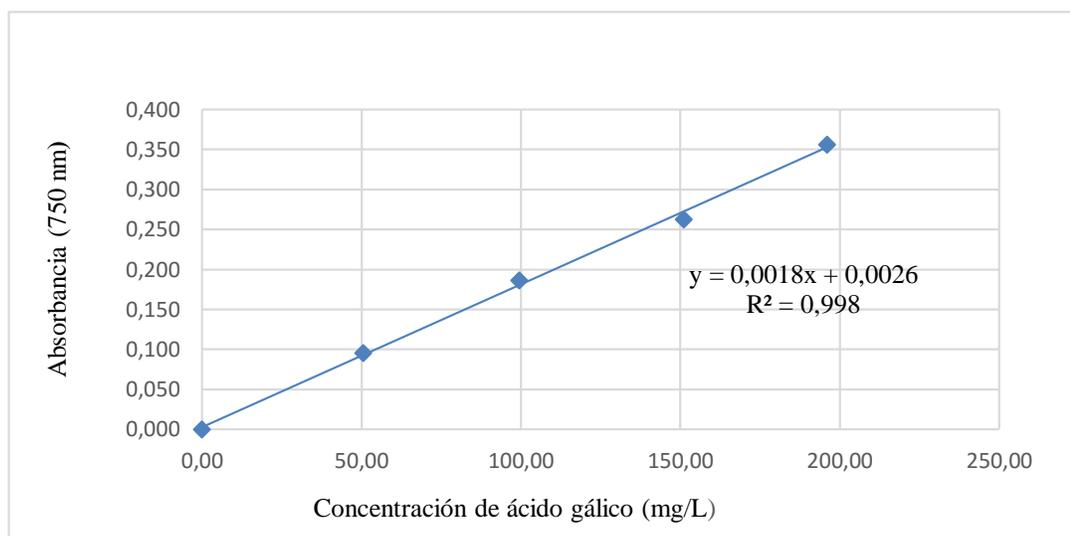


Figura III. Curva de calibración de ácido gálico por el método Folin-Ciocalteu. Obtención de la ecuación para determinar el contenido de polifenoles totales (mg/L) del extracto líquido y seco de *Rhizophora mangle* L.

Los valores de absorbancia a 750 nm de los 10 extractos de corteza de mangle rojo con diferente proporción MV/A y distintos tiempos de decocción se indican en la Tabla IV.

**Tabla IV. Absorbancia a 750 nm de los diferentes extractos de *Rhizophora mangle* L.**

Tratamientos	Abs.(750 nm)
M1	0,242±0,001
M2	0,277±0,002
M3	0,212±0,001
M4	0,267±0,001
M5	0,350±0,003
M6	0,356±0,002
M7	0,266±0,003
M8	0,284±0,002
M9	0,135±0,002
M10	0,349±0,003

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración de ácido gálico se calculó el contenido de fenoles totales en mg/L:

$$[\text{Concentración}] = \frac{\text{Absorbancia}-0,0026}{0,0018} \quad [\text{Ec. 2}]$$

El contenido de fenoles totales en base seca que se expresa como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco de mangle rojo (mg GAE/g) de los 10 tratamientos se obtuvieron entre el contenido de fenoles totales en mg/L y el porcentaje de sólidos solubles de cada extracto. Los resultados se detallan en la Tabla V.

**Tabla V. Concentración de fenoles totales y rendimiento de extracción de polifenoles a escala de laboratorio.**

Tratamientos	Fenoles totales (mg/L)	Fenoles totales (mg GAE/g)	Rendimiento de extracción de polifenoles (%)
M1	5320,00±31,43	392,15±1,77	4,94 ± 0,03
M2	12173,33±94,8	427,63±0,48	4,20 ± 0,03
M3	9284,44±31,43	488,69±6,50	5,59 ± 0,02
M4	11751,11±62,5	355,39±3,93	3,98 ± 0,02
M5	7720,00±62,85	341,09±0,65	4,97 ± 0,04
M6	15684,44±94,8	287,44±0,98	2,82 ± 0,02
M7	5853,33±62,85	359,13±6,97	5,67 ± 0,06
M8	6242,22±47,14	305,37±5,52	3,68 ± 0,03
M9	2931,11±47,14	287,76±6,76	3,72 ± 0,06
M10	7697,78±62,85	335,19±4,80	4,87 ± 0,04

La concentración de fenoles totales en base seca en los distintos ensayos se encuentran entre  $287,44 \pm 0,98$  a  $488,69 \pm 6,50$  mg GAE/g que son valores altos en comparación con otras fuentes naturales de polifenoles como frutas entre ellas fresa ( $238 \pm 86$  mg GAE/g), ciruela roja ( $249 \pm 67$  mg GAE/g) y zapote ( $258 \pm 124$  mg GAE/g) (**Vasco et al., 2008**), malezas como *D. molliculum* ( $125,82 \pm 0,40$  mg GAE/g) y *S. halepense* ( $69,83 \pm 1,80$  mg GAE/g) (**Gutiérrez et al., 2008**). Estos valores demuestran que las cortezas de *Rhizophora mangle* L. son una excelente fuente de compuestos fenólicos de gran interés farmacéutico siempre que se utilice los parámetros de extracción más adecuados.

Un estudio desarrollado por **Cruz et al., 2015** sobre el contenido polifenólico de cortezas de mangle rojo nativo de San Carlos, Guatemala extraído con etanol señala un valor de  $538,9 \pm 40,3$  mg GAE/g que es semejante a  $488,69 \pm 6,50$  mg GAE/g obtenido en el actual estudio, sin embargo la mínima diferencia indica que el solvente de extracción como la procedencia del material vegetal influyen en la concentración final de fenoles totales en los extractos (**Sobhy et al., 2009**). Aunque la utilización de etanol presenta mayor concentración de fenoles en sus extracciones, a escala industrial representa costos adicionales en comparación con el uso del agua como solvente, convirtiendo al agua como la mejor opción para procesos de extracción de metabolitos de origen vegetal que se van a escalar.

El mejor rendimiento de extracción de polifenoles se observó en el tratamiento M7 (MV/A 1:20 y 1 hora) con  $5,67 \pm 0,06$  %, la mayor cantidad de disolvente fue la clave de su valor. Este tratamiento también obtuvo el rendimiento más alto de extracción de sólidos, lo que confirma su escalado a nivel de banco al asegurar la optimización en el uso de las cortezas de mangle rojo y el mayor contenido de polifenoles.

Otras investigaciones sobre extracción acuosa de principios activos como los edulcorantes de *Stevia rebaudiana* (**Soto & Del Val, 2002**) y del biopolímero de la chia

(*Salvaia hispánica*) (San Juan *et al.*, 2013) evidencian rendimientos aproximados al de los polifenoles del mangle rojo con 5% y 8,9% respectivamente.

#### 4.1.2.-Escala de banco.

##### 4.1.2.1.-Determinación del rendimiento de extracción de sólidos y polifenoles del extracto acuoso de mangle rojo.

A nivel de banco se reprodujo el proceso de extracción acuosa de polifenoles de *Rizophora mangle* L. mediante un reactor de acero inoxidable de 20 L de capacidad, utilizando las mismas condiciones de laboratorio que permitieron obtener el mayor rendimiento de extracción de polifenoles y sólidos, como fueron la relación MV/A 1:20 a 1 h de decocción, el proceso produjo un volumen final de 5020 mL de extracto. Los resultados a escala de banco se registran en la Tabla VI del extracto acuoso sin concentrar y el concentrado al 10% del volumen total que se obtuvo inicialmente del reactor, el volumen final fue de 495 mL. Los valores a nivel de banco son similares al tratamiento M7 seleccionado como mejor a escala de laboratorio, que presentó un rendimiento de extracción de sólidos mayores a 15% y en el rendimiento de polifenoles mayor a 5%, lo que determina como adecuado y reproducible el escalado a nivel de banco de esta investigación.

**Tabla VI. Rendimiento de extracción de sólidos y polifenoles del extracto acuoso de mangle rojo a nivel de banco**

Extracto acuoso	Sólidos solubles totales (SST) (% p/v)	Fenoles totales (mg GAE/g)	Rendimiento de extracción de sólidos (%)	Rendimiento de extracción de polifenoles (%)
Sin concentrar	2,170 ± 0,002	344,98 ± 5,46	15,56 ± 0,02	5,37 ± 0,09
Concentrado	21,410 ± 0,003	346,46 ± 4,36	15,14 ± 0,01	5,25 ± 0,07

#### 4.1.3.-Secado por aspersión del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L.

El volumen de extracto obtenido a nivel de banco luego de ser concentrado se secó a través del spray dryer a una temperatura de entrada de 140 °C y de salida de 80 °C, el producto fue un polvo de color rojo intenso (Anexo V) y el rendimiento del proceso se evidencia en la Tabla VII.

Tabla VII. Rendimiento de secado por spray dryer.

Extracto acuoso	Volumen alimentado (mL)	Peso teórico extracto seco (g)	Peso real extracto seco sin humedad (g)	Rendimiento (%)
Concentrado	495	105,98 ± 0,01	96,92 ± 0,02	91,45 ± 0,03

El rendimiento de secado por aspersión del extracto acuoso concentrado a partir de las cortezas de *Rhizophora mangle* L. se encuentra en un valor aceptable para extractos vegetales que se constata en un estudio de secado por aspersión del extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L. a una temperatura de entrada de 120 °C y de salida de 80 °C (López *et al*, 2008) y en la producción del polvo de *Calendula officinalis* L. que obtienen rendimientos de secado superiores a 90% (López *et al*, 2006). El rendimiento de secado nunca alcanza el 100% ya que parte del material secado se pierde al impregnarse en los conductos del equipo y otra mínima se dispersa en el ambiente.

#### 4.1.4. Caracterización del extracto seco de *Rhizophora mangle* L.

##### 4.1.4.1. Determinación de la humedad y concentración de fenoles totales.

La concentración de polifenoles se mantuvo luego del proceso de secado por aspersión, el extracto seco mostró un valor de 340,53 ± 1,50 mg GAE/g (Tabla VIII) a partir de un extracto acuoso concentrado procedente de la extracción a nivel de banco de un valor semejante de 346,46 ± 4,36 mg GAE/g (Tabla VI). Se establece entonces al proceso de secado por aspersión como el método que permite mantener la estabilidad y las mismas

propiedades químicas del extracto acuoso de mangle rojo en la forma de polvo, el cual puede ser almacenado por largo tiempo sin que cambie sus características químicas (Huntington, 2007).

**Tabla VIII. Cuantificación de fenoles totales y humedad del extracto seco de *Rhizophora mangle* L.**

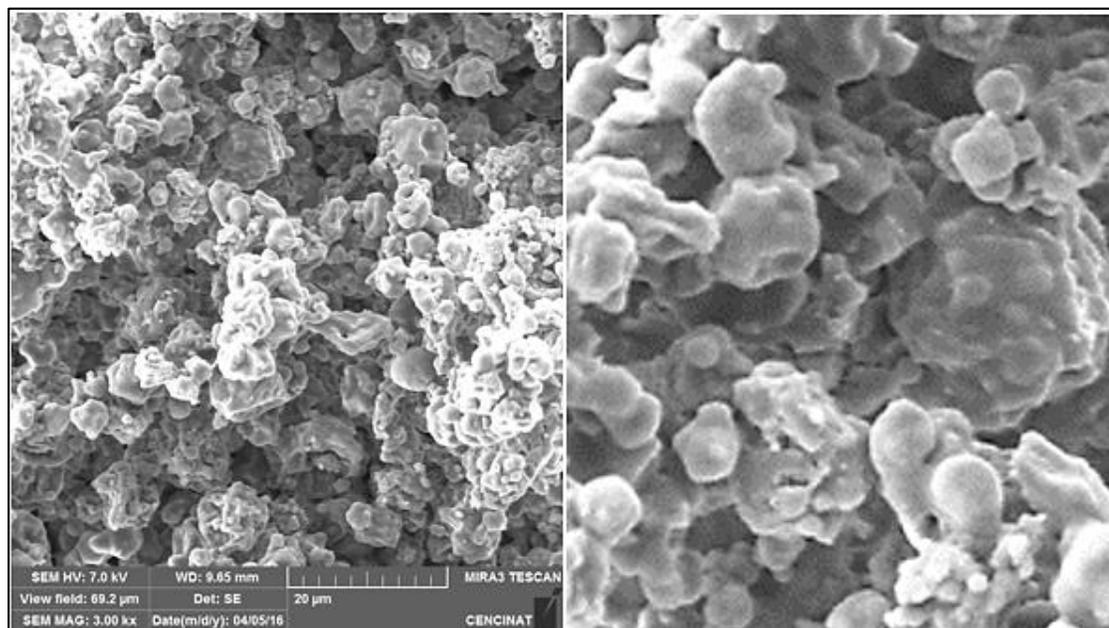
Extracto seco	Humedad (%)	Fenoles totales (mg GAE/g)
<i>Rhizophora mangle</i> L.	1,26 ± 0,16	340,53 ± 1,50

La humedad de  $1,26 \pm 0,16\%$  que presenta el polvo de mangle rojo luego del proceso de secado es favorable porque se mantiene bajo el límite permitido del 10% para extractos secos (Swati & Wagh, 2014). La evaluación de la humedad del extracto seco de *Boerhaavia erecta* L. con un valor de 7,7 % de un proceso de secado a escala de banco (López *et al*, 2008), demuestra que el polvo de mangle rojo es menos susceptible de contaminación por microorganismos por la baja actividad de agua que posee gracias a su menor porcentaje de humedad. A partir de lo expuesto anteriormente la calidad del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. producido en la actual investigación es alta.

#### **4.1.4.2. Morfología de las partículas del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.)**

Las imágenes de alta resolución logradas mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas del extracto seco de mangle rojo que contienen polifenoles facilitó el análisis de su morfología como forma, condiciones de la superficie y distribución de tamaño (Figura IV). La forma de las partículas en su mayoría es esférica y otras casi esféricas con protuberancias, superficie sin poros y lisa, esta forma particular permite aumentar la consistencia de tabletas que las contienen y mejorar la biodisponibilidad del ingrediente farmacéutico activo al optimizar el flujo y producir una

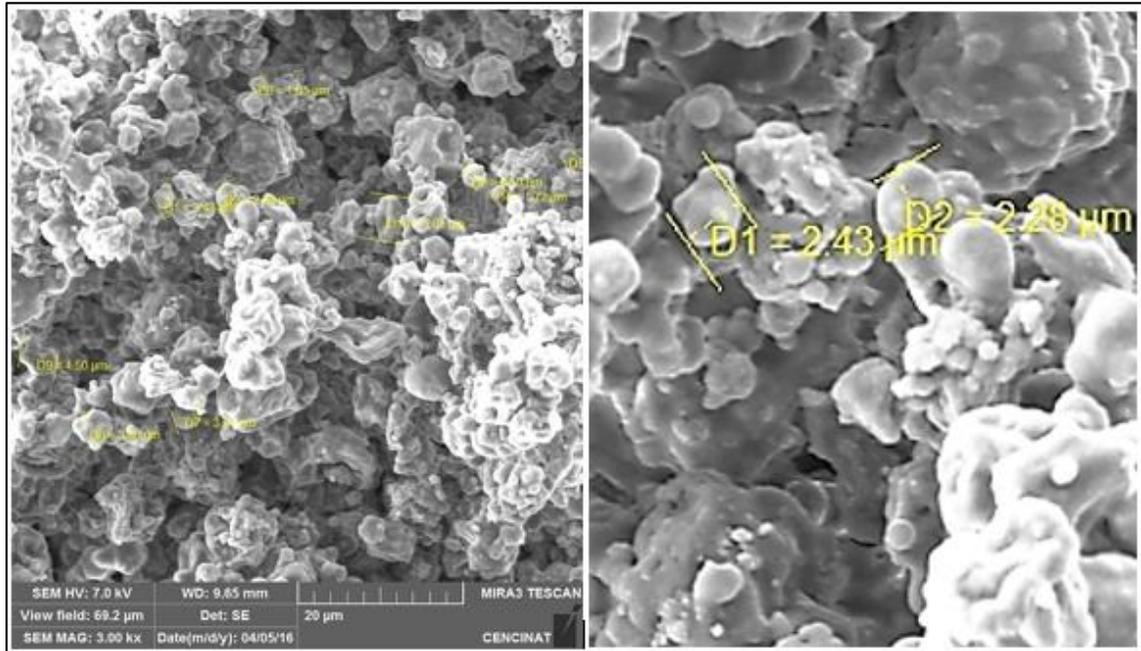
dispersión estable que incrementa la velocidad de disolución de un fármaco (Swati y Wagh, 2014).



**Figura IV. Partículas del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle L.*).** Determinación de la forma y distribución de tamaño mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de las partículas de extracto seco de mangle rojo obtenido por secado por aspersión

El tamaño de las partículas contenidas en el extracto seco comprende valores entre 1,62 µm a 5,61 µm (Figura V) con una distribución de tamaño de las partículas promedio de  $2,94 \pm 1,30$  µm, el mismo que recae en el rango adecuado del proceso de secado por spray dryer que es inferior a 100 µm. La determinación de la distribución de tamaño de las partículas de muestras secas que poseen metabolitos de interés farmacéutico es importante porque permiten mejorar la eficiencia en la dosificación particulada de fármacos y consecuentemente conseguir una alta estabilidad de la droga, más aun con diámetros muy bajos que aumentan su dispersabilidad en fármacos de administración pulmonar (Vehring, 2007). Un estudio sobre secado por aspersión de compuestos activos del ajo (*Allium sativum L.*) presenta partículas de tamaño entre 10 y 35 µm de forma esférica y superficie lisa (Garzón *et al.*, 2011), características similares a las

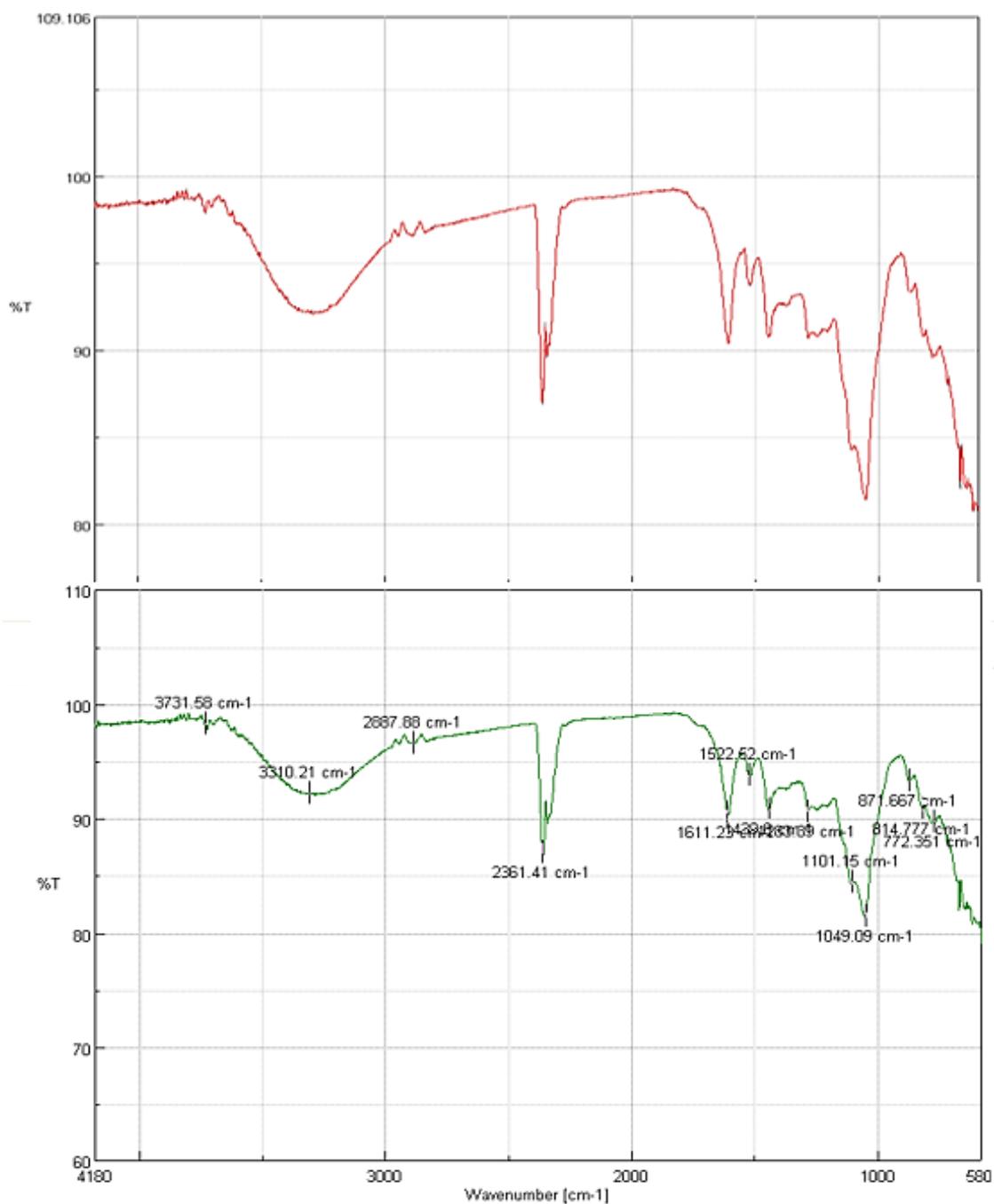
partículas del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.), lo que establece su obtención apropiada en la presente investigación.



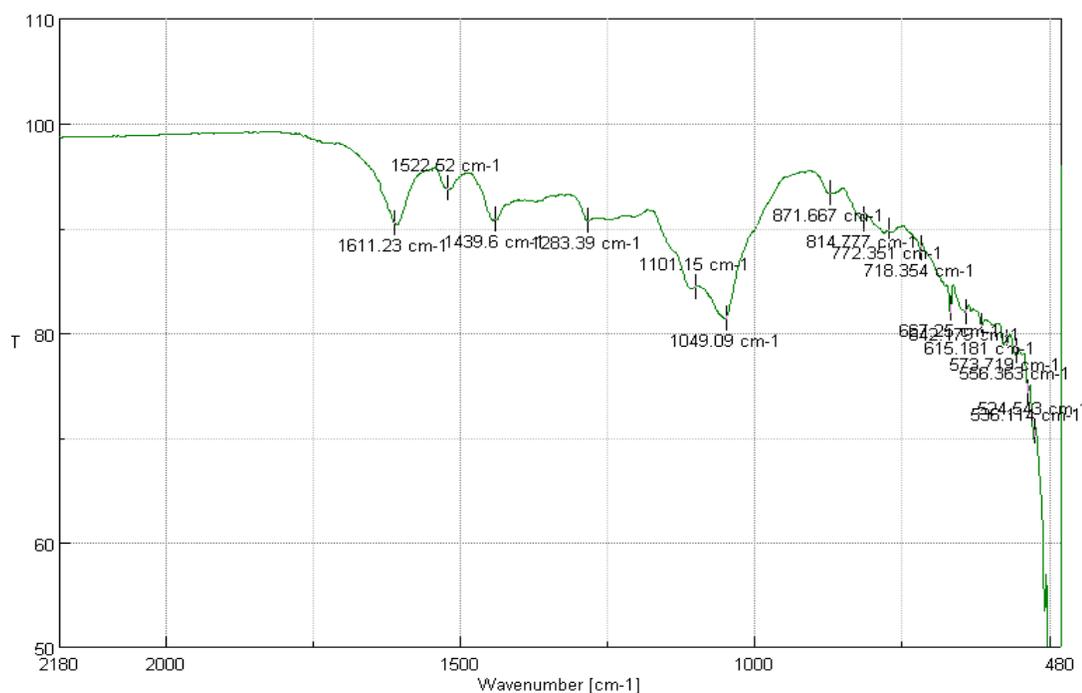
**Figura V.** Distribución de tamaño de partícula del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). Diámetro en  $\mu\text{m}$  de 10 partículas obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM).

#### **4.1.4.3. Análisis por espectroscopia infrarroja del extracto seco de mangle rojo.**

La espectroscopia infrarroja permitió identificar los grupos funcionales contenidos en el extracto seco de mangle rojo. Los picos que presenta el espectro infrarrojo producido por dicha muestra en un rango de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$  señalan un número de onda que corresponde a un grupo funcional que es particular de un conjunto de compuestos químicos y se detalla a continuación (Figura VI y VII) (Tabla IX).



**Figura VI.** Espectro infrarrojo del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) entre 4000  $\text{cm}^{-1}$  y 580  $\text{cm}^{-1}$ . Presencia de grupos funcionales como alcoholes y fenoles (3310,21  $\text{cm}^{-1}$ ) y ácidos carboxílicos (2361,41  $\text{cm}^{-1}$  y 1439,6  $\text{cm}^{-1}$ ).



**Figura VII. Espectro infrarrojo del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) entre 2000  $\text{cm}^{-1}$  y 500  $\text{cm}^{-1}$ . Presencia de grupos funcionales como cloruros, bromuros y yoduros (800  $\text{cm}^{-1}$  a 500  $\text{cm}^{-1}$ ).**

**Tabla IX. Grupos funcionales presentes en el extracto seco de *Rhizophora mangle* L.**

Número de onda /frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo funcional
3310,21	NH Aminas y amidas primarias y secundarias Alcoholes y fenoles unidos por puente H(estado polimérico)
2361,41	Ácidos carboxílicos(estiramiento del OH)
1611,23	Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y cetonas (estiramiento carbonilo)
1522,52	$\text{NO}_2^-$ nitritos.
1439,6	Alcanos y ácidos carboxílicos.
1283,39	Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), fluoruros (C-F) y ésteres.
1101,15	Sulfonas, aminas, ésteres y cetonas.
1049,09	Fluoruros y anhídridos.
871,667	Alquenos(C=H) e hidrocarburos aromáticos.
814,777	Alquenos(C=H) e hidrocarburos aromáticos.
772,351	Bromuros (C-Br) y cloruros(C-Cl).
718,354	Bromuros (C-Br) y cloruros(C-Cl).

667,25	Bromuros (C-Br) y cloruros(C-Cl).
642,179	Bromuros (C-Br) y cloruros(C-Cl).
615,181	Bromuros (C-Br) y cloruros(C-Cl).
573,719	Yoduros (C-I).
556,363	Yoduros (C-I).
536,114	Yoduros (C-I).
524,543	Yoduros (C-I).

Los resultados muestran la presencia de grupos alcohólicos y fenólicos en la frecuencia de  $3310,21 \text{ cm}^{-1}$  confirmando la existencia de polifenoles (Ingrediente farmacéutico activo) en el extracto seco de *Rhizophora mangle* L. debido a que dichos grupos funcionales representan la característica estructural principal de estos metabolitos (**Barberán, 2003**), sin embargo el nombre específico de cada uno de los compuestos polifenólicos no es determinable por dicha técnica. Un estudio manifiesta que el extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. posee mayoritariamente polifenoles como ácido gálico, catequina y taninos condensados (**Regalado et al, 2016**). Al contener el extracto seco de mangle rojo este ingrediente activo, el mismo adquiere acción farmacéutica con propiedades astringentes y antibacterianas (**Quiñones et al, 2012**). Otros valores de número de onda del espectro señalan el origen de la materia vegetal utilizada, la procedencia de las cortezas de mangle rojo al observarse contenido de cloruros (C-Cl), yoduros (C-I) y bromuros (C-Br) en un rango entre  $800 \text{ cm}^{-1}$  y  $500 \text{ cm}^{-1}$  propios de la composición química del agua de mar (**Buen, 2005**) que utiliza el árbol de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) para crecer. El contenido de ácidos carboxílicos se verifica también en el extracto seco con valores de  $2361,41 \text{ cm}^{-1}$  y  $1439,6 \text{ cm}^{-1}$  los cuales brindan la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos por actuar como agentes quelantes y en el transporte de electrones como cationes, factor fundamental de sus beneficios en la salud humana (**Porrás y López, 2009**).

#### 4.1.5.-Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. frente a *Helicobacter pylori*.

##### 4.1.5.1.-Identificación de la cepa de *Helicobacter pylori*.

Las pruebas rápidas de identificación son de gran utilidad en los análisis clínicos de esta cepa, optimizando el tiempo y los recursos materiales. Los resultados de las cuatro pruebas más importantes se describen posteriormente (Tabla X y Anexo IX).

**Tabla X. Resultados de las pruebas rápidas de identificación de la cepa *Helicobacter pylori*.**

Prueba	Resultado
Ureasa	Coloración rosado- fucsia (positivo)
Catalasa	Presencia de burbuja (positivo)
Oxidasa	Coloración azul intenso (positivo)
Tinción de Gram	Bacilos curvos de color rosa (positivo)

La bacteria aislada a partir de las biopsias de úlcera gástrica y cultivada en medio sólido MHA enriquecido con sangre desfibrinada al 7% fue positiva para las cuatro pruebas, por lo que se corrobora la presencia de *Helicobacter pylori* en las placas y la apropiada evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco obtenido en esta investigación. La forma cocoide de la bacteria *Helicobacter pylori* que se determinó en la presente prueba es correcta, forma que adopta el microorganismo al ser cultivada en medio sólido y a medida que se mantiene en medios nuevos de cultivo la cepa adquiere paulatinamente resistencia por las condiciones artificiales a que se somete, su forma completamente espiral se observa directamente solo desde biopsias (Toledo & Cabral, 2006). El color blanquecino de las colonias aisladas por difusión en placa y griseases como gotas de rocío con gran brillo por el método de estriado en el actual estudio son las características morfológicas atribuidas a esta bacteria, un estudio desarrollado por Bermúdez *et al*, 2008, revela los mismos rasgos externos de dicha cepa en medio sólido.

#### 4.1.5.2.-Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).

A través de la metodología cuantitativa de sensibilidad antibiótica (CIM) se evaluó la actividad antibacteriana del extracto seco de mangle rojo frente a *Helicobacter pylori*. Se utilizó 3 concentraciones diferentes del antibacteriano vegetal, control positivo (claritromicina 0,125 µg/mL) y control negativo (sin antibiótico). Los resultados se registran a continuación (Tabla XI y Anexo X).

**Tabla XI. Concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) frente a *Helicobacter pylori*.**

Material vegetal (extracto seco)	CMI		
	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Inactivo	Inactivo	Activo

Los valores señalan que el extracto seco a una concentración de 100 µg/mL muestra actividad inhibitoria total contra la cepa *Helicobacter pylori* al compararse con el control positivo donde el crecimiento de la bacteria también es nulo. Las demás concentraciones muestran un crecimiento decreciente de la cepa, pero similar al control negativo que presenta un mayor desarrollo del microorganismo. El valor de 100 µg/mL se considera como la mínima concentración del extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.) que inhibe de manera visible el crecimiento de dicha bacteria, sin embargo el punto de corte o mejor conocido como la concentración mínima inhibitoria real (CIM real) se establece entre la concentración que inhibe el crecimiento bacteriano y la anterior donde existe crecimiento (Malbrán, 2012), presentándose el CIM real entre 50 µg/mL y 100 µg/mL. Un estudio realizado con extracto de mangle rojo procedente de Guatemala y secado por liofilización confirma la actividad antibacteriana de este extracto vegetal a la concentración que se obtuvo en el actual estudio, registrando valores de actividad de 100 µg/mL y 50 µg/mL (Quintana & Yax, 2012), verificando la propiedad antibacteriana de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. El contenido de polifenoles en el extracto, origen del material vegetal, el disolvente de extracción, el tipo de cepa, forma de aislamiento y cultivo de *Helicobacter pylori* son factores que determinaron que el

extracto de mangle rojo de Guatemala presente una actividad antibacteriana a 50 µg/mL a más del valor de 100 µg/mL. Varias especies y productos vegetales evaluados frente *H.pylori* como el extracto acuoso de *Lippia alba* con un CMI de 400 µg/mL (Henaó *et al.*, 2011) y el extracto acuoso de propóleos con un CMI de 600 µg/mL (Nostro *et al.*, 2006) reflejan la magnífica acción antibacteriana que produce el extracto seco de mangle rojo.

#### 4.1.5.3.-Determinación cuantitativa de inhibición del extracto seco de mangle rojo frente a la cepa *Helicobacter pylori*.

A medida que la cepa de *Helicobacter pylori* se mantuvo en nuevos medios de cultivo sólido, esta al ser de naturaleza lábil, susceptible fácilmente a ser alterada por condiciones artificiales de crecimiento (Cava & Cobas, 2003), la evaluación del número de colonias inhibidas a diferentes concentraciones del extracto natural fue afectada por la adquisición de resistencia de la cepa al observar su crecimiento en el control positivo que contenía claritromicina 0,125 µg/mL (antibiótico contra *H.pylori*). Los valores de la disminución en UFC/mL se detallan en la Tabla XII, Figura VIII y Anexo XI.

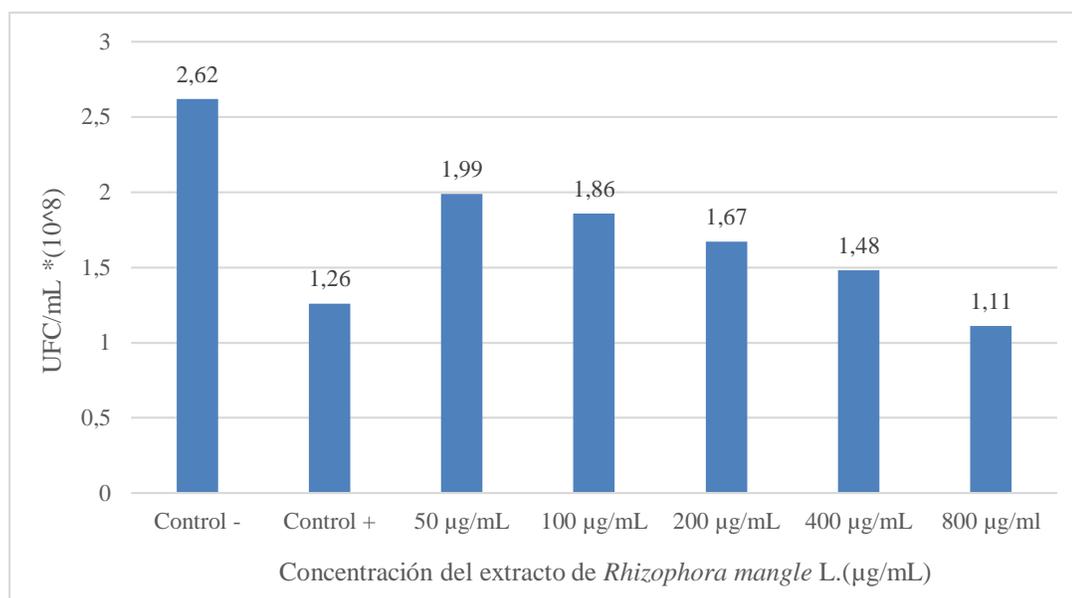
Tabla XII. Cuantificación del número de colonias de *Helicobacter pylori* inhibidas a diferentes concentraciones del extracto seco de *Rhizophora mangle* L.

Parámetro	N° colonias	UFC/mL	Población bacteriana (%)	Población bacteriana inhibida (%)
Control +	63 ± 3	1,26 * 10 <sup>8</sup> ± 5,65*10 <sup>6</sup>	48,08 ± 1,64	51,92 ± 1,64
Control -	131 ± 1	2,62* 10 <sup>8</sup> ± 2,82*10 <sup>6</sup>	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
50 µg/mL	100 ± 1	1,99* 10 <sup>8</sup> ± 2,14*10 <sup>6</sup>	75,96 ± 0,28	24,04 ± 0,28
100 µg/mL	93 ± 1	1,86* 10 <sup>8</sup> ± 2,00*10 <sup>6</sup>	70,99 ± 0,31	29,01 ± 0,31
200 µg/mL	84 ± 2	1,67* 10 <sup>8</sup> ± 4,24*10 <sup>6</sup>	63,74 ± 0,93	36,26 ± 0,93
400 µg/mL	74 ± 3	1,48* 10 <sup>8</sup> ± 5,65*10 <sup>6</sup>	56,38 ± 1,55	43,52 ± 1,52
800 µg/mL	56 ± 2	1,11 * 10 <sup>8</sup> ± 4,24*10 <sup>6</sup>	42,46 ± 1,16	57,64 ± 1,16

Inóculo *Helicobacter pylori* McFarland 0,5 ( $1,5 \cdot 10^8$  UFC/mL), volumen inoculado 0,1 mL, factor dilución  $2 \cdot 10^5$ .

Los datos muestran la inhibición de la bacteria en UFC/mL con un porcentaje de  $24,04 \pm 0,28\%$  a  $50 \mu\text{g/mL}$  con referencia al 100% de población bacteriana del control negativo (sin antibiótico), un aumento de la inhibición de casi 7% entre las concentraciones de  $50 \mu\text{g/mL}$  a  $400 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo la concentración de  $800 \mu\text{g/mL}$  es la que alcanza el porcentaje de disminución bacteriana de  $57,64 \pm 1,16 \%$  similar al control positivo de claritromicina ( $0,125 \mu\text{g/mL}$ ) de  $51,92 \pm 1,64 \%$ . Estos valores indican que a  $800 \mu\text{g/mL}$  de concentración de extracto de mangle rojo con  $368,04 \pm 1,49 \text{ mg GAE/g}$  de polifenoles totales causa el mismo efecto antibacteriano frente a una cepa resistente de *Helicobacter pylori* que la claritromicina, antibiótico de uso farmacológico comprobado para tratar su infección en el área gastroduodenal del ser humano.

La resistencia que adquiere esta cepa por el uso constante de antibacterianos específicos para tratarla y por la consecuente mutación de sus genes como el 23 S RNAr para claritromicina (**Moreno, 2009**), son el motivo del uso de nuevas alternativas para combatirla y cambiar este comportamiento. El extracto seco de mangle rojo se convierte entonces como una alternativa eficaz, natural y accesible, fundamentado a su acción antibacteriana observada in vitro.



**Figura VIII. Cuantificación de UFC/mL de una cepa resistente de *Helicobacter pylori* en las diferentes concentraciones de extracto seco de mangle rojo (*Rhizophora mangle* L.). Control positivo (claritromicina 0,125 µg/mL) y control negativo (sin antibiótico).**

#### **4.2.-Verificación de hipótesis.**

##### **4.2.1. Efecto de la relación materia vegetal/agua (MV/A) y tiempo sobre el rendimiento de extracción acuosa de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles de *Rhizophora mangle* L.**

###### **Hipótesis Nula**

La relación (MV/A) y tiempo no afectan el rendimiento de extracción de SST y polifenoles de *Rhizophora mangle* L.

###### **Hipótesis Alternativa**

La relación (MV/A) y tiempo afectan el rendimiento de extracción de SST y polifenoles de *Rhizophora mangle* L.

**Tabla XIII. Resultados del rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) y polifenoles totales analizados.**

Tratamientos	Relación (M/A)	Tiempo (h)	Rendimiento de extracción de sólidos(SST)		Rendimiento de extracción de polifenoles totales	
			% R 1	% R 2	% R 1	% R 2
M1	1:15	0,5	12,50	12,68	4,92	4,96
M2	1:15	1,5	9,78	9,88	4,18	4,23
M3	1:20	1,5	11,35	11,51	5,60	5,57
M4	1:10	1	11,24	11,15	3,96	3,99
M5	1:15	1	14,63	14,50	5,00	4,94
M6	1:10	1,5	9,78	9,82	2,81	2,83
M7	1:20	1	15,88	15,69	5,63	5,71
M8	1:10	0,5	11,95	12,13	3,70	3,66
M9	1:20	0,5	13,00	12,87	3,68	3,76
M10	1:15	1	14,47	14,60	4,90	4,84

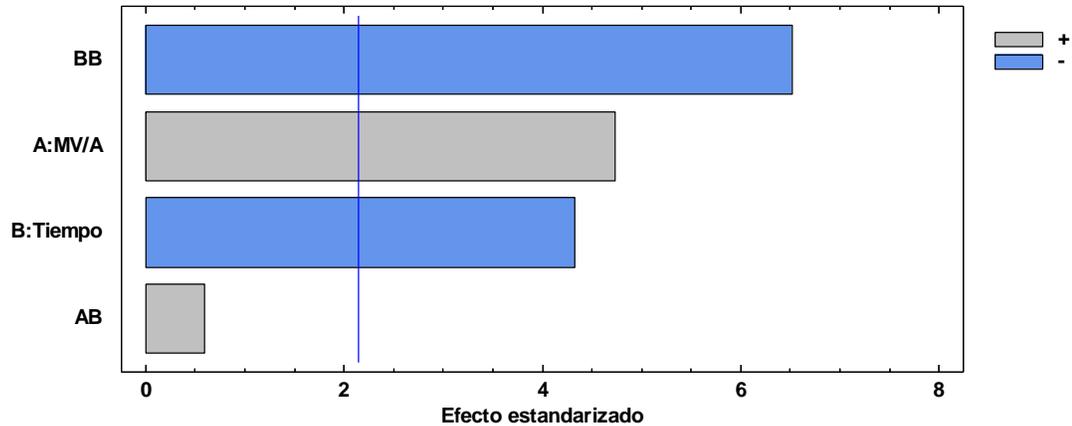
A través de un diseño  $3^3$  con un punto central, se analizaron los valores obtenidos después del proceso de extracción (Tabla XIII) para determinar el efecto que provoca la relación materia vegetal/agua (MV/A) y tiempo de decocción (h) en el proceso de obtención del metabolito vegetal.

**Tabla XIV. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST).**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>A: MV/A</b>	16.8744	1	16.8744	22.37	0.0003
<b>B: Tiempo</b>	14.105	1	14.105	18.70	0.0007
<b>AB</b>	0.270112	1	0.270112	0.36	0.5591
<b>BB</b>	32.0127	1	32.0127	42.44	0.0000
<b>Bloques</b>	0.003125	1	0.003125	0.00	0.9496
<b>Error total</b>	10.5606	14	0.754326		
<b>Total</b>	73.8259	19			

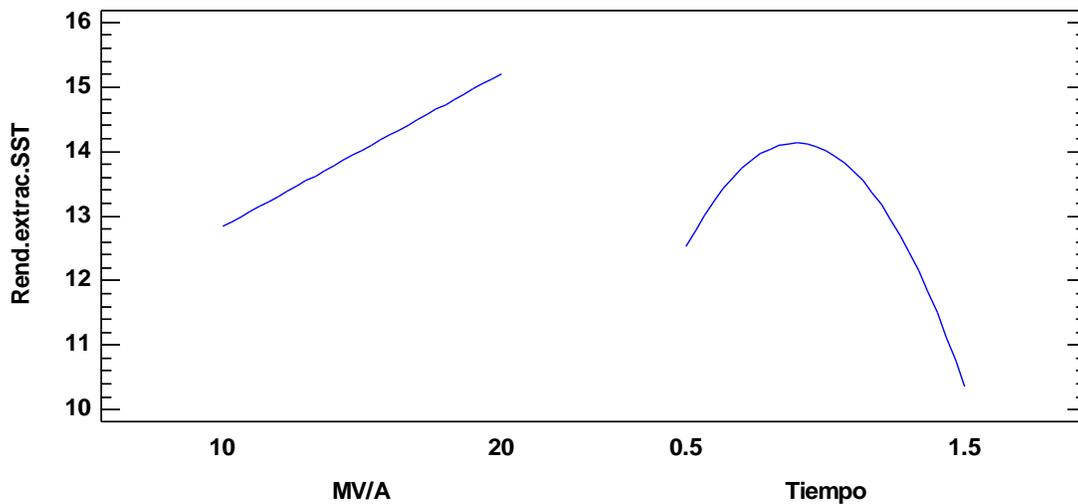
En la Tabla XIV para el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) a partir de las cortezas de *Rhizophora mangle* L. se analiza la variabilidad de cada uno de los factores (MV/A y tiempo). Los dos factores evaluados tienen un valor-P  $< 0,05$ , señalando que son diferentes de cero de manera significativa al 95 % de confianza, por lo que se define que la relación MV/A y tiempo de decocción (h) sí afectan al

rendimiento de extracción de SST significativamente, rechazando consecuentemente la hipótesis nula.

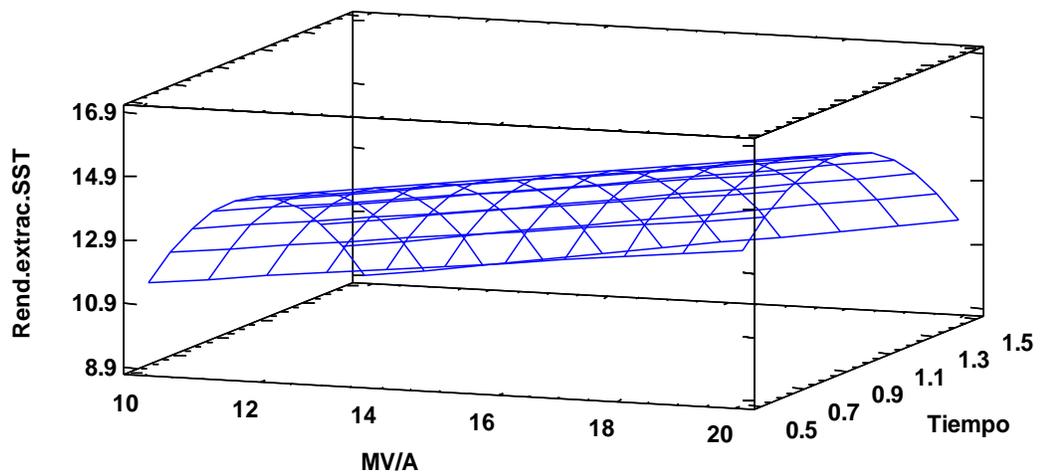


**Figura IX. Diagrama de Pareto estandarizado para el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST).** Efecto ejercido por la relación MV/A y el tiempo (h) sobre el rendimiento de SST.

El tiempo de decocción (h) y la relación MV/A muestran un valor- $P < 0,05$  al sobrepasar la línea vertical en el gráfico de Pareto, representando efectos significativos e individuales hacia el rendimiento de extracción de SST y al interaccionar los dos factores no producen ningún efecto (Figura IX). El rendimiento de extracción es directamente proporcional al aumento de la relación MV/A, mientras que el incremento del tiempo a su nivel medio (1 h) produce el mayor potencial de rendimiento, no así su nivel máximo donde el valor decrece (Figura X). La relación MV/A 1:20 y 1 h de decocción optimiza el proceso al generar los valores más altos de rendimiento (Figura XI).



**Figura X. Efectos principales para el rendimiento de extracción de sólidos (SST).** Evaluación del efecto de la relación MV/A y el tiempo (h) sobre el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales de las cortezas de mangle rojo.



**Figura XI. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción de sólidos (SST).** Resultados del efecto de la relación MV/A y el tiempo (h) sobre el rendimiento de extracción de sólidos solubles totales.

Tabla XV. Análisis de varianza del rendimiento de extracción de polifenoles.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: MV/A	6.75	1	6.75	43.96	0.0000
B: Tiempo	0.0243	1	0.0243	0.16	0.6968
AB	3.71281	1	3.71281	24.18	0.0002
BB	2.4396	1	2.4396	15.89	0.0014
Bloques	0.000605	1	0.000605	0.00	0.9508
Error total	2.14954	14	0.153538		
Total	15.0769	19			

En la Tabla XV para el rendimiento de extracción de polifenoles a partir de las cortezas de *Rhizophora mangle* L. se analiza la variabilidad de cada uno de los factores (MV/A y tiempo). La relación MV/A, la interacción entre tiempos y la interacción de los dos factores presentan un valor-P < 0,05, estableciendo que son diferentes de cero de manera significativa al 95 % de confianza, mientras que el tiempo de decocción presenta un valor valor-P >0, 05, por lo cual se determina que la relación MV/A y la interacción entre los dos factores si afectan al rendimiento de extracción de polifenoles del mangle rojo significativamente, rechazando consecuentemente la hipótesis nula.

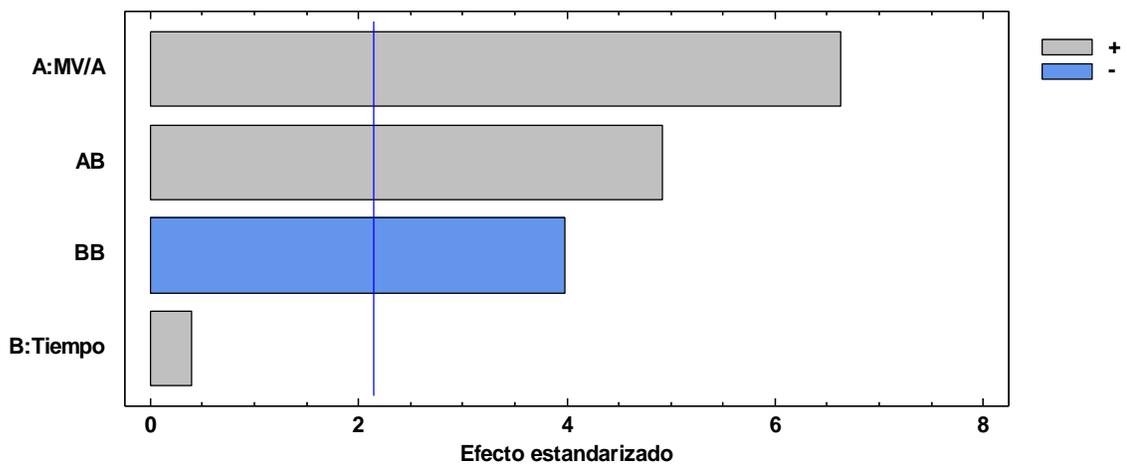
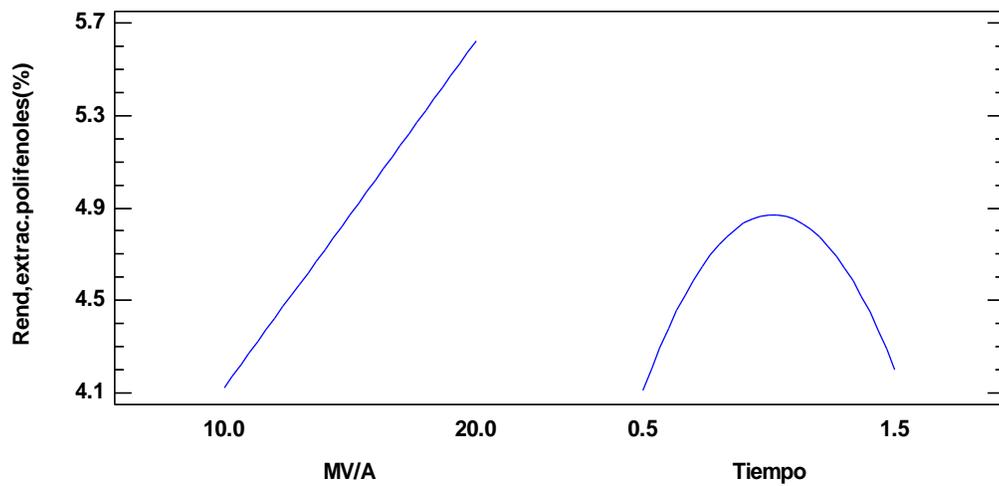
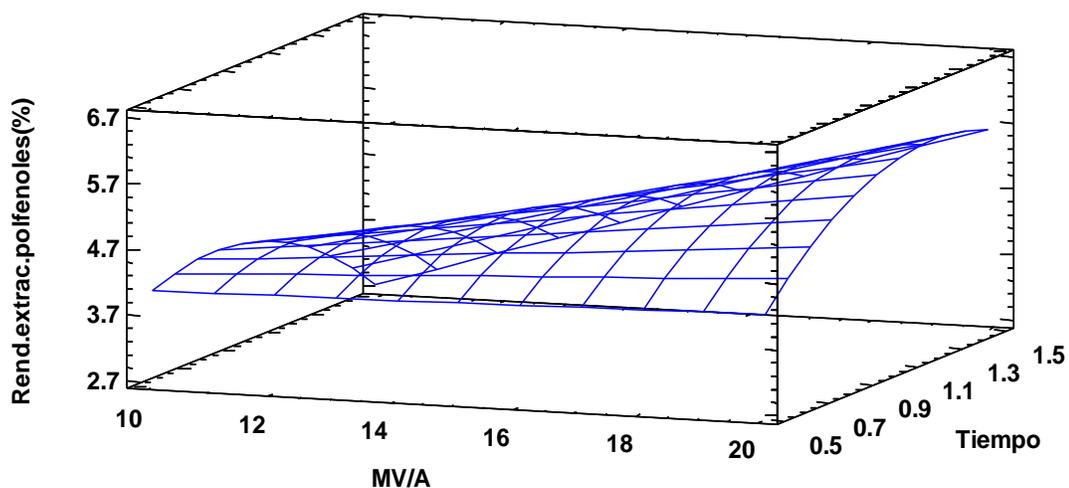


Figura XII. Diagrama de Pareto estandarizado para rendimiento de polifenoles. Efecto ejercido por la relación MV/A y el tiempo (h) sobre el rendimiento.

La relación MV/A y la interacción entre los dos factores muestran un valor-P < 0,05 al sobrepasar la línea vertical en el gráfico de Pareto, representando un efecto significativo hacia el rendimiento de extracción de polifenoles, sin embargo de manera independiente el tiempo no ocasiona efecto (Figura XII). El rendimiento de extracción de polifenoles es directamente proporcional al aumento de la relación MV/A, mientras que el incremento del tiempo a su nivel medio (1 h) produce el mayor potencial de rendimiento, no así su nivel máximo donde el valor decrece (Figura XIII). La relación MV/A 1:20 y 1,25 h de decocción optimiza el proceso al generar los valores más altos de rendimiento de extracción de polifenoles (Figura XIV).



**Figura XIII. Efectos principales para el rendimiento de extracción de polifenoles.** Evaluación del efecto de la relación MV/A y el tiempo de decocción (h) sobre el rendimiento de extracción de polifenoles de las cortezas de mangle rojo.



**Figura XIV. Superficie de respuesta estimada para el rendimiento de extracción de polifenoles.** Resultados del efecto de la relación MV/A y el tiempo de decocción (h) sobre el rendimiento de extracción de polifenoles.

#### **4.2.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. frente a *Helicobacter pylori*.**

##### **Hipótesis Nula**

Los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. no presentan actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori*.

##### **Hipótesis Alternativa**

Los polifenoles del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. presentan actividad antibacteriana frente a *Helicobacter pylori*.

Luego de determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto seco de mangle rojo frente a una cepa no resistente de *Helicobacter pylori* (Tabla XI) y el porcentaje de inhibición de las colonias de una cepa resistente de dicha bacteria comparado con claritromicina (antibiótico de uso farmacéutico contra *H.pylori*) (Tabla XII), se observó la inhibición del crecimiento de esta bacteria patógena no resistente a

100 µg/mL del extracto y un similar porcentaje de inhibición en comparación con claritromicina para una cepa resistente ( $57,64 \pm 1,16\%$  y  $51,92 \pm 1,64 \%$  respectivamente). Por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la actividad antibacteriana de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. frente a *Helicobacter pylori*

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se evaluó la actividad antibacteriana de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. frente a *Helicobacter pylori* mediante dilución en agar, registrando una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 100 µg/mL y un CIM real entre 50 µg/mL y 100 µg/mL.
- El secado por aspersión presentó un rendimiento favorable del  $91,45 \pm 0,03$  %, el proceso se realizó a partir del extracto acuoso obtenido a escala de banco con las condiciones de MV/A 1:20 y 1 hora de decocción debido a que estos parámetros mostraron a nivel de laboratorio el mejor rendimiento de extracción de sólidos solubles totales (SST) ( $15,78 \pm 0,14\%$ ) y polifenoles ( $5,67 \pm 0,06$  %).
- La caracterización del extracto seco de *Rhizophora mangle* L. reveló un contenido polifenólico de  $340,53 \pm 1,50$  mg GAE/g semejante a su concentración en el extracto acuoso de  $346,46 \pm 4,36$  mg GAE/g, indicando la conservación de sus propiedades químicas con el uso del spray dryer, la presencia de los grupos funcionales que caracterizan la estructura química de este tipo de metabolito como alcoholes y fenoles, además de los ácidos carboxílicos que brindan su capacidad antioxidante se evidenciaron mediante espectroscopia infrarroja, la humedad del polvo de  $1,26 \pm 0,16$  % se encuentra bajo el límite permitido, señalando la menor probabilidad de contaminación microbiana y las partículas contenidas en el extracto seco se observaron con un tamaño promedio de  $2,945 \pm 1,30$  µm con forma esférica y lisa en su superficie, características que permite la mejor distribución particulada en la formulación de fármacos.

- Se demostró la actividad antibacteriana de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. mediante dilución en agar que registró una concentración mínima del extracto seco de 100 µg/mL que inhibe visiblemente el crecimiento de una cepa no resistente de *Helicobacter pylori* y un porcentaje de inhibición del crecimiento del 57,64 ± 1,16 % a una concentración del polvo de mangle rojo de 800 µg/mL frente a una cepa resistente, resultado similar al efecto causado por claritromicina 0,125 µg/mL con un valor de 51,92 ± 1,64%.

## **5.2. Recomendaciones.**

- Evaluar la estabilidad del extracto seco de mangle rojo en el transcurso del tiempo en cuanto a su contenido de humedad y efectos químicos.
- Ampliar la evaluación de la actividad antibacteriana de los polifenoles de *Rhizophora mangle* L. frente a *Helicobacter pylori* a escala in vivo.
- Efectuar estudios farmacológicos para su uso clínico.

## Referencias Bibliográficas

- Barberán, T. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, nutrición y salud*, 10(2), pp 41-53.
- Bermúdez, L., Torres, L., & Rodríguez, B. (2008). Métodos para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Revista médica cubana*, 3(1), pp 50–67.
- Buen, E. (2005). Composición química del agua de mar. *Revista vascongada*, 4(1), pp 241–245.
- Cava, F., & Cobas, G. (2003). Formas cocoides de *Helicobacter pylori*: viables o degenerativas. *Revista VacciMonitor*, 2(12), pp 11-19.
- Cruz, M., Marroquín, N., Álvarez, L., Chang, E., & Cáceres, A. (2015). Evaluation of Mangrove (*Rhizophora mangle* L.) products as coloring, antimicrobial and antioxidant agents. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients* 2015, pp 2–12.
- Cuyabeno Lodge. (2014). Manglares del Ecuador. Recuperado de <http://www.cuyabenolodge.com/turismo-amazonas/manglares-de-ecuador.htm>.
- Duque, N., & Allen, J. (2006). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry (*Rhizophora mangle*, *R.samoensis*, *R.racemosa*, *R.harrisonii* (Atlantic East Pacific red mangrove). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*, 2(1), pp 2-18.

- Faria, F., Almeida, A., Ferreira, L., Dunder, R., Takayama, C., Silva, M., & Souza, B. (2012). Mechanisms of action underlying the gastric antiulcer activity of the *Rhizophora mangle* L. *Journal Ethnopharmacol*, 139(1), pp 234–243.
- Faure, R., Sánchez, J., Martínez, G., Vega, E., & Fernández, O. (2009). Propiedades antioxidantes de *Rhizophora mangle* (L.) y su relación con el proceso de curación de heridas en ratas. *Revista de Salud Animal*, 31(3), pp18-31.
- Ferreira, F., Santos, S., Barros, T., Rossi, J., & Fernández, L. (2011). Actividad antibacteriana in vitro de extractos de *Rhizophora mangle* L. *Revista brasileira de plantas medicinales*, 13(3), pp 137-142.
- Garzón, A., Alzate, M., Sánchez, A., & Millán, L. (2011). Secado por aspersión: una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (*Allium sativum* L.). *Revista. Lasallista investigativa*, 8(2), pp 19–42.
- González, E., Martínez, O., y Quiñones, R. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de tecnología postcosecha*, 16(2), pp 180-192.
- Gutiérrez, M., Ortiz, A., & Mendoza, A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal, *Simposio de Metrología 2008.2* (1), pp 52–63.

Henao, S., Martínez, J., Pacheco, N., & Marín, J. (2011). Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. Revista Colombiana de Gastroenterología, 26(2), pp 286-296.

Huntington, D. (2004). The influence of the Spray Drying Process on Product Properties. Drying Technology 22(6), pp 1261-1287.

López O., Menéndez, R. García, C. González, M., García, C., y Nogueira, A. (2010). Estudio de secado por aspersión de extractos de *Plectranthus amboinicus*, *Ocimum tenuiflorum*, *Passiflora incarnata*, *Matricaria recutita* y *Melissa officinalis*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 9(3), pp 216-220.

López O., Muñoz, A. Fernández, R. Torres, L., & González, M. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión de extracto acuoso de *Calendula officinalis* Revista Cubana de plantas medicinales 11(1), pp 416-422.

López, O., Torres. L., Lidia, M., & Rodríguez, C. (2008). Estudio de secado por aspersión hasta escala de banco del extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L. Revista Cubana de Farmacia, 2(1), pp 112–120.

Malbrán, C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. Revista Servicio antimicrobianos, 32(2), pp 19–42.

- Moreno, S. (2009). Mecanismos de resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos amoxicilina, claritromicina, levofloxacina y metronidazol. Recuperado de <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis309.pdf>.
- Nostro, A., Cellini, L., Cannatelli, M., Grande, R., Alonso, V., & Campli, E. (2006). Effects of combining extracts (from propolis or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*, 20(3), pp 187-190.
- OMS. (2003). Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Recuperado de <http://a.pps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf>.
- Pérez, T., Rodríguez, Y., Díaz, E., Domínguez, A., Riveron, Y., & Núñez, A. (2009). Effect of the *Rhizophora mangle* L. bark preparation on the process of solid-liquid extraction. *Rev Cubana Farm*, 16(1), pp 222–126.
- Porras, A., & López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería en alimentos*, 3(1), pp 121–134.
- Quintana, M., & Yax, R. (2012). Aislamiento de *Helicobacter pylori* e inhibición de la bacteria por diez extractos de plantas medicinales utilizadas popularmente en el tratamiento de infecciones gastrointestinales. Recuperado de [http://biblioteca.usac.edu.g/tesis/06/06\\_3312.pdf](http://biblioteca.usac.edu.g/tesis/06/06_3312.pdf).

Quiñones, M., Aleixandre, A., & Miguel, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Revista de nutrición hospitalaria*, 27(1), pp 212-220.

Regalado, A., Sánchez, L., & Mancebo. (2016). *Rhizophora mangle L.* (mangle rojo): Una especie con potencialidades de uso terapéutico. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy*, 4(1), pp 1–17.

Rodríguez, M., & Vázquez, A. (2007). Los manglares su conocimiento e importancia. Recuperado de [http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/manglares/pdf/manglares\\_general.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/manglares/pdf/manglares_general.pdf).

Rodríguez, Y., & Curbelo, C. (2012). Cinética de lixiviación de la corteza de mangle rojo en agua. *Revista Cubana de Farmacia*, 46(1), pp 123–129.

San Juan, G., Rendón, F., Solorza, J., & Flores, E. (2013). Extracción acuosa del biopolímero de la chia (*Salvia hispánica L.*). *Memorias del XXXIV Encuentro Nacional y III Congreso Internacional de la AMIDIQ*, 45(2), pp 125–129.

Sánchez, L., Batista, N., Gálvez, J., Duran, R., & Bulnes, C. (2009). Efecto de *Rhizophora mangle L.* sobre colitis ulcerativa experimental en ratas. *Revista cubana de plantas medicinales*, 14(1), pp 539-546.

- Sobhy, M., Mohsen, Abdalla, S., & Ammar. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 111(4), pp 595–598.
- Soto, A., & Del Val, S. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la *Estevia rebaudiana*. *Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos*, 5(9), pp 5-9.
- Swati, M., & Wagh, M. (2014). Review on spray drying technology. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 4(2), pp 219-225.
- Toledo A., & Cabral, V. (2006). *Helicobacter pylori*: Clínica, diagnóstico y tratamiento. *Revista de posgrado de la VI cátedra de medicina*, 158(1), pp 9-12.
- Varcalcel, L., Sánchez, L., Escobar, A., y Noa, M. (2009). Polyphenol and Phytosterol composition in an antibacterial extract from *Rhizophora mangle* L. bark. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7(4), pp107-128.
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), pp 816–823.
- Vehring, R. (2007). Pharmaceutical Particle Engineering *via* Spray Drying. *Journal Pharmacol*, 25(5), pp 999–1022.

## ANEXOS

**Anexo I: Fotografías de las cortezas de mangle rojo (*Rhizophora mangle L.*) (a) húmedas molidas (b) y secas (c).**



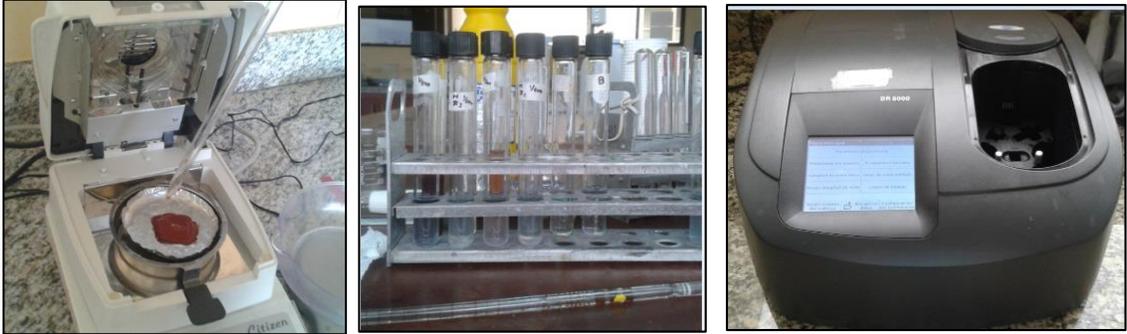
**Anexo II: Fotografías del proceso de extracción acuosa y extractos a nivel de laboratorio.**



**Anexo III: Fotografías de la extracción acuosa a escala de banco, el reactor y el producto fenólico acuoso.**



**Anexo IV: Fotografías de la determinación de sólidos solubles totales (SST) y fenoles totales del extracto acuoso y seco de mangle rojo.**



**Anexo V: Fotografías del proceso de concentración, secado por spray dryer del extracto acuoso de mangle rojo y el extracto seco de color rojo.**



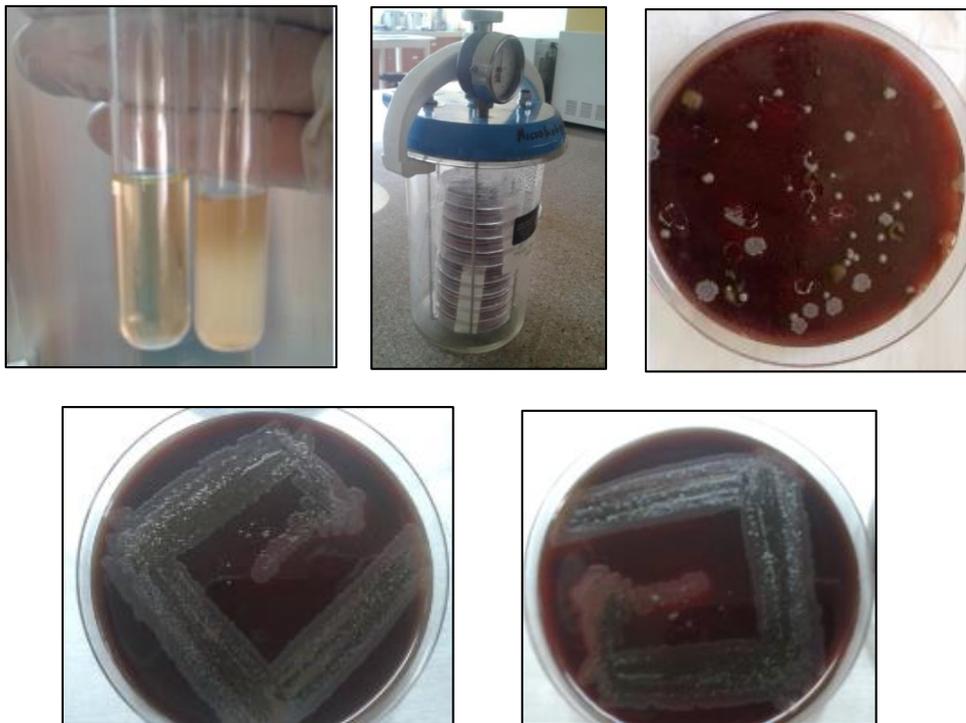
**Anexo VI: Fotografías de la identificación de grupos funcionales en el extracto seco de mangle rojo por espectroscopia infrarroja.**



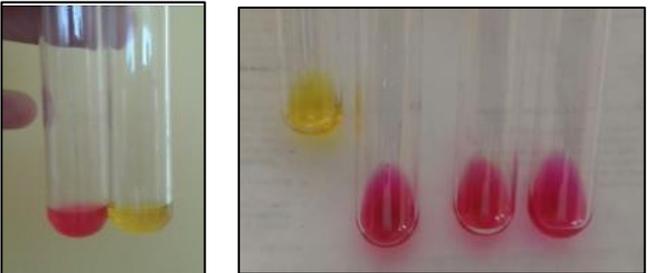
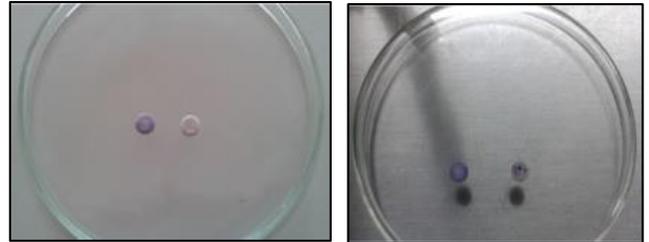
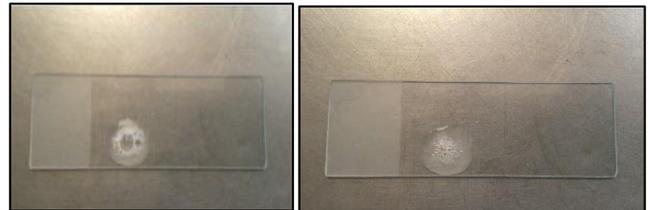
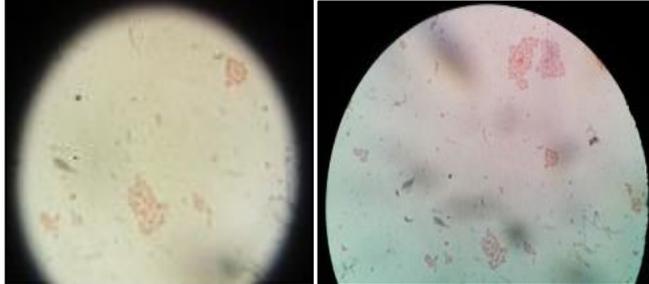
**Anexo VII: Morfología de las partículas del polvo de mangle rojo por microscopía electrónica de barrido (SEM).**



**Anexo VIII: Cultivo de *Helicobacter pylori* en medio sólido, inóculo estándar, jarra de anaerobios y cultivo en medio sólido de *Helicobacter pylori*.**

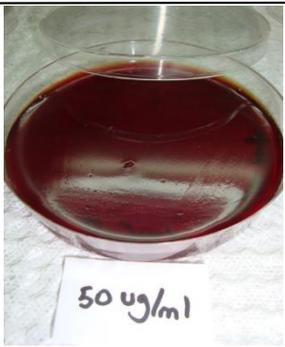


**Anexo IX: Identificación de *Helicobacter pylori*.**

Pruebas	Fotografías	Resultado
Ureasa		Positivo (paso de color amarillo a rosa-fucsia)
Oxidasa		Positivo(paso de color blanco a azul oscuro)
Catalasa		Positivo(formación de burbujas)
Tinción Gram		Positivo(Bacilos de color rosa, curvados Gram negativos)

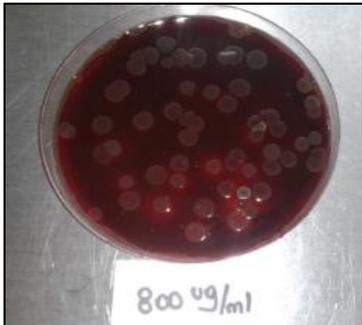
**Anexo X: Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto seco frente a *Helicobacter pylori*.**

Parámetro	Fotografías	Descripción
Control +		<p>Clarithromicina 0,125 µg/mL</p> <p>No existe crecimiento visible de las colonias semejantes a gotas de rocío que caracterizan a <i>Helicobacter pylori</i> por la técnica de estriado.</p>
Control -		<p>Si existe crecimiento visible.(Colonias grisáceas como gotas de rocío)</p>
25 µg/mL		<p>Si existe crecimiento visible</p>

50 µg/mL		Si existe crecimiento visible
100 µg/mL		No existe crecimiento visible. El extracto a esta concentración tiene actividad contra <i>Helicobacter pylori</i> .

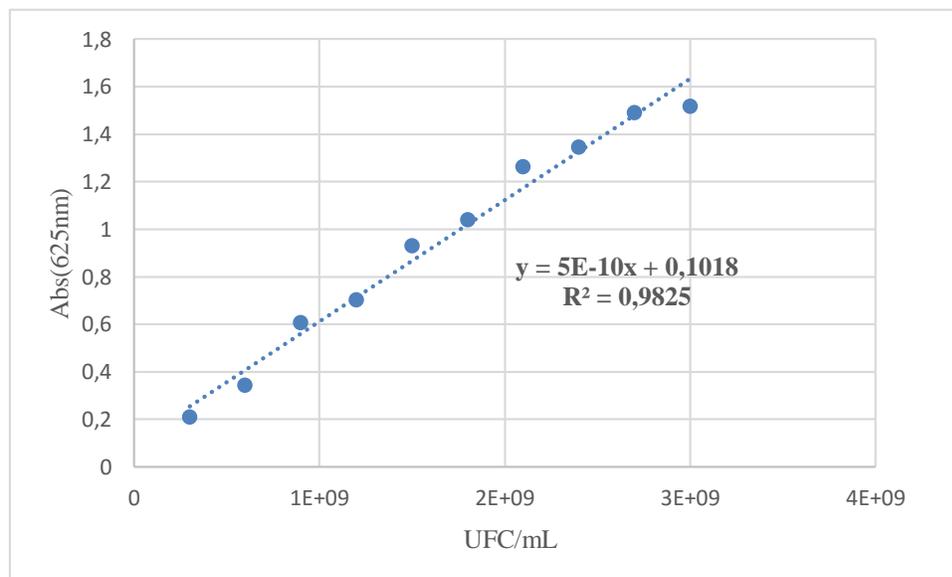
**Anexo XI: Cuantificación de las colonias de *Helicobacter pylori* inhibidas por diferentes concentraciones del extracto seco de mangle rojo.**

Parámetro	Fotografías		N° Colonias
Control +			61

Control -			130
200 µg/mL			82
400 µg/mL			71
800 µg/mL			54

## Anexo XII: Escala McFarland y ecuación de la recta.

N°Tubo	UFC/mL(*10 <sup>8</sup> )	Abs(625 nm)
1	3	0,21
2	6	0,343
3	9	0,606
4	12	0,702
5	15	0,931
6	18	1,04
7	21	1,263
8	24	1,346
9	27	1,49
10	30	1,518



$$\text{Abs} = 0,1018 + 5 \cdot 10^{-10} \text{ UFC/mL}$$