



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
CATEDRA COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN  
“Dr. José Rafael Luna”



**Actividad antibacteriana del extracto de acetona  
obtenido de la especie *Lepechinia conferta***

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de  
Licenciados en Bioanálisis

**Autoras:**

Contreras Gil Laurent J.  
Contreras Quintero Johandra M.

**Tutor:**

Prof. Dr. Luis B. Rojas Fermín

Mérida, Junio de 2019

## DEDICATORIA

En primer lugar quiero dedicarles este logro a mis padres Pedro Contreras Y Mayela Quintero por ser una base fundamental en mi vida y por haber inculcado en mis grandes valores, los cuales me han permitido ser y lograr lo que hoy soy, estaré eternamente agradecida, los AMO este triunfo es de ustedes.

A mi hermana Yoselin por ser siempre mi alma gemela y la persona que siempre a estado para mi en los momentos buenos y no tan buenos, sabes que te ADORO y que te dedico este logro.

A mis hermanos(as) Adicxon, Yohana, Johely y Francisco por ser parte importante de mi vida y apoyarmen con sus valiosos consejos, gracias por el calor familiar que me brindan ya que sin uds familia esto no hubiese sido posible, los AMO.

A mi novio Luis Emiro Salas por ser un apoyo fundamental en este camino, infinitas gracias por ser tan incondicional y por siempre motivarme a alcanzar este merecido logro, TE AMO.

A mis sobrinas Mafer, Sergio, Marie e Ignacio les dedico este triunfo como ejemplo de que todo lo que queremos lo podemos lograr, para que nunca se rindan y luchen siempre por lo que les apasiona, los AMO mis niños.

A mis amigas Johana V. y Carmen V. por haber estado gran parte de este camino conmigo, apoyándonos siempre y motivándonos para continuar, saben que se convirtieron en parte de mi Familia, las Adoro.

Johandra Contreras

A mi padre José, papi hoy gracias a ti soy quien soy siguiendo tu ejemplo y sabios consejos porque de ti he aprendido que el que persevera alcanza y mucho más, este logro también es tuyo, a mis dos madres Lorena y Yorkley, quienes siempre han estado orgullosas de cada meta que puedo cumplir. Mami tia como te decía cuando era pequeña gracias por ser ese angelito en la tierra dándome los mejores consejos y acompañándome en cada paso que doy, a mi mama Lorena aunque estamos lejos, desde la distancia nuestros corazones se hablan, a mi hermana Fanny gracias por la comodidad que me has brindado durante mi carrera, a mi hermana Noraima gracias por tus palabras cuando las he necesitado. A mi novio Hector gracias amor por siempre estar; has sido mi apoyo cuando más te he necesitado, A mi abuela Celina, quien ha sido testigo del esfuerzo y empeño que he puesto durante todos estos años y sé que se siente orgullosa de mi, A mi abuela Cristina quien se encuentra en el cielo y todos los días recuerdo sé que desde allá celebras conmigo.

Laurent Contreras

A nosotras Laurent y Johandra, que desde bachillerato estudiamos juntas y hoy en día con mucho esfuerzo luchamos y alcanzamos esta meta unidas. Lo logramos!!

## AGRADECIMIENTOS

Primero que nada damos infinitas gracias a Dios, fuerza inquebrantable que nos acompaña día a día guiándonos y motivándonos para que no nos rindamos y logremos nuestros propósitos. Gracias Dios porque sino fuera por tu presencia y la luz que nos das cada día, nada de nuestros sueños y metas serian posibles.

Este estudio es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que hicieron posible obtener el éxito, por tal motivo agradecemos a la ilustre Universidad de los Andes especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por permitir formarnos en ella, de la cual nos sentimos infinitamente orgullosas por brindarnos la mejor educación de todas.

Gracias al Profesor Luis Rojas por el apoyo incondicional siempre y por sus grandes conocimientos aportados para que esta investigación obtuviera el mejor de los éxitos, estaremos eternamente agradecidas por sus grandes enseñanzas.

A las profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregon, por guiarnos y brindarnos sus conocimientos con muy buena voluntad, gracias a ustedes también fue posible que lográramos este objetivo. Y quienes de alguna u otra forma estuvieron presentes durante este largo trayecto para cumplir esta meta.

*Muchas gracias...*

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>RESUMEN</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPITULO I. EL PROBLEMA</b> .....	4
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación del Problema.....	5
Objetivos de la Investigación.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	7
Alcances de la Investigación.....	7
Limitaciones de la Investigación.....	7
<b>CAPITULO II. MARCO TEÓRICO</b> .....	9
Trabajos Previos.....	9
Bases Teóricas.....	11
Familia Lamiaceae.....	11
Género <i>Lepechinia</i> .....	12
Composicion química:.....	13
Distribucion geográfica del Genero <i>Lepechinia</i> :.....	16
<i>Lepechinia conferta</i> :.....	17
Extractos vegetales.....	18
Usos de los extractos vegetales.....	20
Técnicas de obtención de los extractos.....	20
Remoción o evaporación del solvente.....	22

Técnicas de separación e identificación de los constituyentes químicos de los extractos vegetales.....	23
Cromatografía de en capa fina, por sus siglas em ingles (TLC):.....	23
Bacterias.....	26
Características Generales de las Bacterias.....	26
Mecanismos de resistencia a los antibacteriano.....	30
Antibióticos.....	34
Mecanismos de acción de los antibacterianos.....	34
Actividad antibacteriana.....	36
Métodos para evaluar la actividad antibacteriana.....	37
Prueba de sensibilidad por dilución.....	38
Dilución en caldos de cultivo.....	39
Dilución en medio sólido.....	40
Prueba de sensibilidad por Difusión en Agar (Kirby- Bauer).....	40
Antibiograma Atb Rapid.....	41
Método de la Cinta o Epsilómetro Etest®.....	41
Definición de términos.....	42
Resistencia Antibacteriana.....	42
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI ó CIM).....	42
Infeción.....	42
Operacionalización de las Variables.....	43
Hipótesis.....	45
<b>CAPITULO III MARCO METODOLOGICO.....</b>	<b>46</b>
Tipo de Investigación.....	46
Diseño de la Investigación.....	46
Población y Muestra.....	47
Unidad de Investigación.....	47
Selección del Tamaño Muestral.....	47

Sistema de Variables .....	47
Instrumento de recolección de datos .....	47
Procedimientos y/o metodologías .....	48
Recolección de la Muestra .....	48
Preparación de los extractos vegetales .....	48
Screening fitoquímico .....	50
- Identificación de esteroides y triterpenos .....	50
- Identificación de cumarinas: .....	50
- Identificación de flavonoides .....	50
Cromatografía de capa fina (TLC): .....	51
Determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial y extractos de la planta <i>Lepechinia conferta</i> .....	53
Bacterias estudiadas .....	53
Preparación de las placas .....	54
Preparación de los pre-inóculos bacterianos .....	54
Preparación de los inóculos bacterianos .....	54
Inoculación de las placas .....	55
Método de Kirby Bauer en pozos de agar .....	55
Preincubación e incubación de las placas .....	57
Lectura de las placas .....	57
Diseño de Análisis .....	58
 <b>CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	 59
Determinación de compuestos químicos mediante screening fitoquímico: .....	59
Cromatografía de Capa Fina (TLC) .....	61
Actividad antibacteriana del extracto de acetona de la especie <i>L.</i> <i>conferta</i> : .....	62
Discusiones .....	64

<b>CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	67
Conclusiones .....	67
Recomendaciones .....	67
REFERENCIAS .....	69

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## INDICE DE TABLAS

### Tabla

1	Clasificación Botánica.....	18
2	Operacionalización de la variable independiente: Composición química del extracto de acetona de la especieL. Conferta.....	43
3	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana presente en los extractos de la especieL. Conferta.....	44
4	Diluciones empleadas para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite y los extractos de la planta L. conferta.....	57
5	Metabolitos identificados mediante el Screening Fitoquímico.....	59
6	Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.....	63
7	Resumen de la actividad antibacteriana de los extractos de la especieL. conferta frente a bacterias de referencia internacional.....	64

## INDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Estructura química de diterpenos.....	14
2	Triterpeno de ácido ursólico.....	15
3	Monoterpenos aislados en aceites esenciales de L. Chamaedryoides, L. floribunda, L. calycina L. chalepensis, L. graveolens, L. salviae, L. speciosa y L. urbaniana.....	16
4	Sesquiterpenos.....	17
5	Planta Lepechinia conferta.....	17
6	Diseño experimental para la obtención del extracto de acetona de la especie L. conferta.....	49
7	Cromatografía de capa fina.....	52
8	Método de Kirby Bauer en pozos de agar.....	56
9	Identificación de esteroides y triterpenos: Prueba de Lieberman Bourchard.....	60
10	Prueba de Cumarinas.....	60
11	Identificación de flavonoides.....	60
12	Identificación de compuestos fenólicos: Reacción de Cloruro Férrico.....	61
13	Cámara de Cromatografía.....	62
14	Visualización lámpara de luz ultravioleta (UV).....	62



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**Actividad antibacteriana del extracto de acetona obtenido de la especie *Lepechinia conferta* (Benth.) Epling**

**Autoras:**

Contreras Gil Laurent J.  
Contreras Quintero Johandra M.

**Tutor:**

Prof. Dr. Luis B. Rojas Fermín

**RESUMEN**

En este estudio se determinó la composición química y la actividad antibacteriana del extracto acetónico obtenido de las partes aéreas (hojas) de la especie *Lepechinia conferta* (Benth.) Epling. El extracto fue obtenido mediante el método de maceración en frío con el solvente (acetona) por triplicado, las soluciones se concentraron hasta sequedad. La determinación parcial de metabolitos secundarios se realizó mediante screening fitoquímico identificando la presencia de esteroides y compuestos fenólicos. El extracto de acetona se analizó por medio de Cromatografía de Capa fina (TLC). La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método modificado de Kirby-Bauer (difusión en agar en pozo) frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, donde dicho extracto presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

**Palabras claves:** *Lepechinia conferta*, extracto, screening fitoquímico, esteroides, actividad antibacteriana.

## INTRODUCCIÓN

Desde la prehistoria se conoce y se estudia el poder curativo de las plantas, constituyendo un punto de partida importante para la química y la farmacología actual. Además curanderos tradicionales han usado por mucho tiempo las plantas para prevenir o curar enfermedades infecciosas (Cowan, 1999).

El valor medicinal de las plantas curativas procede de sustancias químicas o principios activos que se localizan en el tejido de la planta, los cuales producen diferentes efectos fisiológicos. La mayoría de estos principios activos son sumamente complejos y desconocidos en su totalidad, sin embargo han podido ser aislados, sintetizados o limitados por la química actual en la elaboración de medicamentos. Dentro de dichos principios activos encontramos: aceites esenciales o esencias, alcaloides, glucósidos, gomas o resinas, aceites grasos y sustancias antibióticas (Primo, Rovera, Zanón, Oliva, Demo y Daghero, 2001).

Es importante destacar que los agentes antibióticos de origen sintético, es decir los que se producen en un laboratorio a través de procesos de síntesis química, han tenido un crecimiento significativo, por lo tanto resulta de interés el ensayo de actividad antibacteriana de productos naturales, cuya diversidad genética propicia alternativas novedosas con eficacia terapéutica. En la actualidad el tratamiento terapéutico con aceites esenciales resulta una buena opción en la medicina natural, porque son utilizados en una forma farmacéutica definida y con una dosis precisa, lo que los convierte en medicamentos (Marcano y Hasegawa, 2002).

La medicina tradicional no sólo es empleada para el diagnóstico clínico sino también para la prevención y supresión de trastornos físicos, mentales o sociales (Albornoz, 1980).

El abuso y el uso inapropiado de las sustancias antibióticas en el tratamiento de cualquier proceso infeccioso, ha traído como consecuencia un

incremento de la prevalencia de patógenos resistentes, permitiendo alguna especulación de que estamos cerca del fin de la era antibiótica (Katzung, 1996).

A pesar de los avances científicos logrados en el presente siglo en lo referente a sustancias medicinales de origen sintético, la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana en fuentes no tradicionales como las plantas superiores es importante. En tal sentido, se están haciendo esfuerzos para encontrar principios activos que tengan actividad sobre la población bacteriana resistente a los antibióticos, así como, otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos, desinfectantes, preservativos antimicrobianos en productos farmacéuticos o en alimentos (Mantilla y Sanabria, 1985)

Lamiaceae es la designación atribuida a una familia de Angiospermas, que se encuentra en el orden Lamiales, perteneciente a la clase Magnoliopsida. Anteriormente esta familia era conocida por Labiatae o Labiadas, sufriendo alteración debido a las recientes reglas de nomenclatura. Los miembros de la familia Lamiaceae se caracterizan por la presencia de aceites, que les proporcionan un olor característico. Esos mismos aceites hacen que los miembros de esta familia sean muy importantes, pues son frecuentemente utilizados en la producción de infusiones o incluso para usos medicinales, como por ejemplo para aliviar dolores de estómago o tos. Algunas especies poseen también características antibacterianas y antivíricas, lo que las hace importantes para la medicina alternativa (Primo y cols, 2001).

Este Proyecto ha sido ordenado en 3 capítulos: El primero, titulado: El Problemas, subtítulo de la siguiente manera: Planteamiento del Problema, Justificación del Problema, Objetivos, Alcances y limitaciones. El Segundo capítulo, titulado: Marco Teórico, con varios subtítulos: Trabajos Previos, Bases Teóricas, Definición de Términos y Operacionalización de las Variables. El tercero, descrito como: Marco Metodológico, presentado de la

siguiente manera: Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis.

En el presente trabajo se determinó la presencia y tipo de metabolitos del extracto de acetona, obtenido a partir de las hojas secas de *Lepechinia conferta* (Lamiaceae) y su actividad antibacteriana contra bacterias de tipo ATCC.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPITULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

La actividad antibacteriana es el ataque a los microorganismos por parte de los antibacterianos presentes en la planta, un antibacteriano es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de bacterias. Una planta medicinal es considerada como un complejo laboratorio de síntesis y degradaciones en el que generalmente existen componentes con diversas estructuras químicas, y su efecto en muchas ocasiones se debe a varios de estos componentes, como lo son los metabolitos existentes en ellas con buena actividad antibacteriana frente a bacterias resistentes a antibióticos y otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos, desinfectantes o como preservativos antimicrobianos en productos farmacéuticos o en alimentos (Tortora, Funke y Case, 2007).

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso un nuevo agente antibacteriano se detectan cepas resistentes. Una cepa resistente es aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones de antibiótico mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas. Los mecanismos de resistencia se modifican en la naturaleza sea por transferencia de genes de resistencia o por mutaciones. Por tal razón se mantiene la investigación de nuevos agentes antibacterianos con el fin de superar las dificultades de resistencia bacteriana (Ruíz y Guillén, 2005).

En los extractos hay presencia de terpenos, específicamente mono y sesquiterpenos, que pueden estar asociados o no a otros componentes, por la complejidad de su composición casi siempre se reportan los compuestos mayoritarios que tiene actividad antibacteriana, antifúngica, antiséptica y como relajante del sistema nervioso central. La relación hombre-germen se ha visto alterada por dos hechos trascendentales: El descubrimiento y desarrollo de los antibacterianos, lo que ha permitido reducir extraordinariamente la principal causa de mortalidad. Y la creación de resistencias a los antibacterianos por las bacterias (Albornoz, 1980).

El modelo teórico que respalda esta investigación es el modelo molecular de la resistencia a los antibacterianos que expresa lo siguiente: las propiedades antibacterianas de un compuesto son consecuencia de su estructura molecular. Establecer las características estructurales permite comprender los mecanismos de su acción y constituye la premisa en el diseño de nuevos fármacos (Tortora y cols., 2007).

La medicina tradicional ha venido empleando los extractos de diversos géneros para tratar algunas afecciones es por ello que, mediante la presente investigación delimitamos el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación de la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de acetona de la planta *Lepechinia conferta*?

### **Justificación del Problema**

Debido a los grandes cambios socioeconómicos, las diferentes poblaciones humanas se van haciendo cada vez más urbanas hasta convertirse en metrópolis modernas, adquiriendo un modo de vida rutinario, alejado del equilibrio con el entorno natural. En la actualidad, el gran desafío

para los países ricos en biodiversidad es poder vincular y convertir los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles como parte del aprovechamiento y la explotación de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad (Tortora y cols., 2007).

El estado Mérida posee plantas medicinales cuyas propiedades no han sido estudiadas por completo, y con el objetivo de obtener conocimiento en cuanto a las posibles propiedades farmacológicas se ha seleccionado la planta medicinal *Lepechinia conferta* perteneciente a la familia Lamiaceae que posiblemente pueda tener propiedades antibacterianas ya que especies de su misma familia y género han sido estudiadas preliminarmente por tener principios activos bactericidas (García y Rangel, 2000).

Esta investigación se basa en confirmar la actividad antibacteriana del extracto de acetona de la planta medicinal *Lepechinia conferta* para demostrar la capacidad inhibitoria que ejercen las sustancias obtenidas de esta planta contra los microorganismos patógenos. Así formar parte del desarrollo científico de la sociedad. Estudiar microbiológicamente las propiedades terapéuticas de plantas resulta imprescindible para el descubrimiento de nuevas sustancias con capacidad antibiótica frente a microorganismos resistentes y con alta actividad infectiva, aumentando la calidad de vida del hombre.

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo general**

Confirmar la actividad antibacteriana y la composición química de los metabolitos secundarios del extracto de acetona de la planta *Lepechinia conferta*. En el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### **Objetivos específicos**

1. Recolectar las hojas de la planta *Lepechinia conferta* en el Páramo de La Negra, vía pregonero a orillas de la carretera, en las cercanías de la población de Bailadores.
2. Obtener el extracto de las hojas de la planta *Lepechinia conferta* mediante maceración en frío con acetona.
3. Determinar la composición química del extracto acetónico de las hojas de la planta de *Lepechinia conferta* utilizando el tamizaje fitoquímico.
4. Confirmar la actividad antibacteriana del extracto de acetona de las hojas de la planta *Lepechinia conferta* mediante el método de difusión en agar en pozo(Kirby Bauer).

### **Alcances de la Investigación**

Analizar la composición química del extracto de acetona de la planta *Lepechinia conferta*, profundizando los conocimientos sobre el tema de investigación, para así de esta manera poder motivar al uso de la medicina tradicional en la sociedad y aportar el estudio de un extracto con propiedades antibacterianas a las ciencias de la salud.

### **Limitaciones de la Investigación**

Las limitaciones iniciales fueron durante la recolección de la planta *Lepechinia conferta*, debido a que esta ubicada en el Páramo de La Negra, vía Pregonero; lo cual queda retirado de la Ciudad de Mérida y hoy en día debido a la falta de transporte, gasolina, entre otros medios; se nos dificultó un poco la recolección de la misma.

Las fallas eléctricas ocasionadas en nuestro País, se convirtió en una limitación para nuestro trabajo de grado, causándonos daños totales en los medios de cultivo con las respectivas bacterias a estudiar; que trajeron consigo tanto pérdidas económicas, así como también dificultándonos en el avance de nuestra investigación.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Pérez, Vivas, Rojas, Usubillaga, y Chataing, (2014) publicaron en la Revista de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes un artículo relacionado con el Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling. Los terpenoides carnosol y ácido ursólico (aislado como 3-acetil-ursolato de metilo) fueron obtenidos de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling, a partir de los extractos de hexano y acetona respectivamente. Adicionalmente, por reacciones de hemisíntesis, a partir de estos productos se obtuvo 11,12-diacetil-carnosol y ursolato de metilo. Las estructuras fueron determinadas mediante análisis espectroscópicos, incluyendo técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) uni y bidimensionales. El carnosol y 3-acetil-ursolato de metilo presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 10 µg/mL, mientras que el 11,12-diacetil-carnosol no fue activo frente a ninguna de las bacterias evaluadas. El ursolato de metilo mostró actividad contra *Bacillus subtilis* (ATCC 19433), *S. aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), con una CIM de 10 µg/mL, y 100 µg/mL, respectivamente. Es este el primer reporte sobre estos compuestos en *L. bullata*.

Córdova-Guerrero y cols., (2016) publicaron en la Revista Argentina de Microbiología una investigación titulada: Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* (Lamiaceae) frente a microorganismos de importancia clínica; este estudio evaluó el efecto antibacteriano y antifúngico de un extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana* perteneciente a la familia Lamiaceae. Los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/mL causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Sin embargo, no presentaron efecto significativo sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis* al compararse con los valores del vehículo en las valoraciones de difusión en pozo. Se demostró que *S. apiana* tiene un efecto antimicrobiano significativo sobre patógenos de gran importancia clínica, lo que abre el campo para continuar evaluando a esta lamiácea en vistas a su posible empleo en el futuro como un agente terapéutico.

www.bdigital.ula.ve

Benítez Vivar, (2018) publicó en Ecuador en la Universidad Técnica Particular de Loja un Trabajo de grado de Bioquímico Farmacéutico titulado Aislamiento, identificación y actividad antibacteriana de metabolitos secundarios a partir de las especies *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling y *Piper lanceifolium* Kunth. La presente investigación se basó en el estudio fitoquímico de las especies *Lepechinia paniculata* y *Piper lanceifolium*, se obtuvieron extractos de acetato de etilo y metanol a partir de las hojas. Los compuestos fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas RMN y cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y comparados con reportes en literatura. Se aislaron 3 compuestos de *L. paniculata* conocidos como Ledol, Guaiol y Carnosol, y dos compuestos de *P. lanceifolium*, éster metílico del ácido lanceaefólico y éster metílico del ácido ciclolancaefólico. Se determinó la actividad antibacteriana mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). De *L. paniculata* el extracto de acetato

de etilo presento actividad frente a *Proteus vulgaris* (62,5ug/mL), el extracto de metanol actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (500ug/mL) y el compuesto Ledol actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (125ug/mL) y *Staphylococcus aureus* (500ug/mL).El extracto metanólico de *P. lanceifolium* fue inactivo frente a las cepas utilizadas en el ensayo.

## **Bases Teóricas**

### **Familia Lamiaceae**

Las Lamiáceas (Lamiaceae), son una familia de plantas con flores del orden Lamiales que comprende unos 245 géneros y alrededor de 7.900 especies taxonómicamente admitidos, lo que la convierte en uno de los mayores grupos del actual Reino vegetal (Stevens, 2001).

Típicamente encontrada en regiones sujetas a climas cálidos estacionales, especialmente en áreas rocosas abiertas, en matorrales, riveras y lechos del río y en regiones tropicales y subtropicales en hábitat montañosos. En regiones templadas del norte puede ser encontrada en bosques. Mientras muchas especies herbáceas ocurren en hábitats húmedos, otras son típicas de áreas semiáridas. Varias herbáceas o especies anuales son muy comunes a lo largo de caminos y bordes de las carreteras y en pastizales y en áreas cultivadas o perturbadas. Sólo algunos géneros se presentan en selvas tropicales. Sus características botánicas son: Hierbas, arbustos, ocasionalmente árboles o enredaderas; tallos usualmente cuadrangulares; hojas usualmente decusadas o verticiladas, usualmente simples, aromáticas; flores usualmente zigomorfas; corola frecuentemente bilabiada; frutos usualmente consistiendo de 4 mericarpos (Judd, Campbell, Kellogg, Stevens y Donoghue, 2007).

Muchas especies de Lamiaceae son económicamente importantes como ornamentales, especias, perfumes, objetos religiosos o medicinales. En los Neotrópicos, las especies de Lamiaceae son particularmente importantes localmente por proveer medicinas baratas. Algunas son cultivadas comercialmente a grandes escalas como *Mentha arvensis* subespecie *haplocalix* que produce el aceite de menta para saborizar, y especies de *Lavandula* como *Lavandula angustifolia*, de donde se destila el aceite de lavanda, muy usado en el comercio de perfumería. Muchas especies de Lamiaceae de importancia económica son originalmente importadas del Hemisferio Este, por ejemplo albahaca (*Ocimum basilicum*), y especialmente de la región Mediterránea, como menta (*Mentha*), orégano (*Origanum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus*) y salvia (*Salvia officinalis*). Los tubérculos de algunas especies de *Stachys* son comestibles. *Tectona* (teca) es un importante árbol maderable (Judd y cols., 2007).

www.bdigital.ula.ve

### **Género Lepechinia**

El género *Lepechinia* pertenece a la familia Lamiaceae la cual presenta por lo menos 38 especies. Se las encuentra en las montañas a una altura de 1600 – 3800 msnm. Siendo este un arbusto aromático, de color verde, los tallos presentan una altura de 20 a 40 cm de largo, las hojas son elongadas, deltoides, agudas teniendo cada una de estas un largo de 4 a 6 cm de largo por 2 cm de ancho. La superficie superior es rugosa, se puede encontrar peciolos en las partes basales de las hojas y tienen una dimensión de 6 cm de largo (Ciccio, Soto, y Poveda, 1999).

El uso tradicional de esta especie acapara varios ámbitos entre esos encontramos contra las afecciones gástricas e intestinales concretamente contra sus procesos inflamatorios, también es útil en la inflamación de las vías respiratorias, tos y tuberculosis, de igual manera se le atribuyen

propiedades tónicas, estimulantes, diuréticas, antiespasmódicas y reguladoras de las funciones menstruales. Se le ha utilizado de igual manera contra la excesiva transpiración especialmente la nocturna producida por fiebres altas debido a la presencia de tujona (compuesto con estructura similar al alcanfor formado por una cetona y un monoterpeno presente en el aceite esencial) que bloquea las terminaciones nerviosas de las glándulas (Ciccío y cols., 1999).

Externamente se le ha utilizado para inflamaciones de la cavidad bucal y garganta, en gargarismos para anginas, dolor de muelas y periodontitis. Se usa como desinfectante de la piel en afecciones de origen micótico, úlceras y llagas. Las formas de consumo reportadas son infusión, decocción, tintura, vino entre otros (Saavedra y Gómez, 2011).

### **Composición química del género**

Estudios fitoquímicos realizados sobre algunas especies han reportado el aislamiento de diterpenos de la serie del abietano, por ejemplo: de la *L. bullata* se aislaron quinonas diterpénicas como la 7-*o*-metilhorminona (**1**) (Jonathan, 1989), de la *L. meyeri* y *L. hastata* (Bruno y cols., 1991) se han aislado el carnosol (**2**), isosalvicanol (**3**) y salvicanol (**4**), de la *L. caulescens* se aislaron ácidos abietanoicos como el ácido 7-hidroxi-abieta-8(5)-en-18-oib-9, 13-endoperoxido (**5**) (Delgado y cols., 1992) (Ver Figura 1).

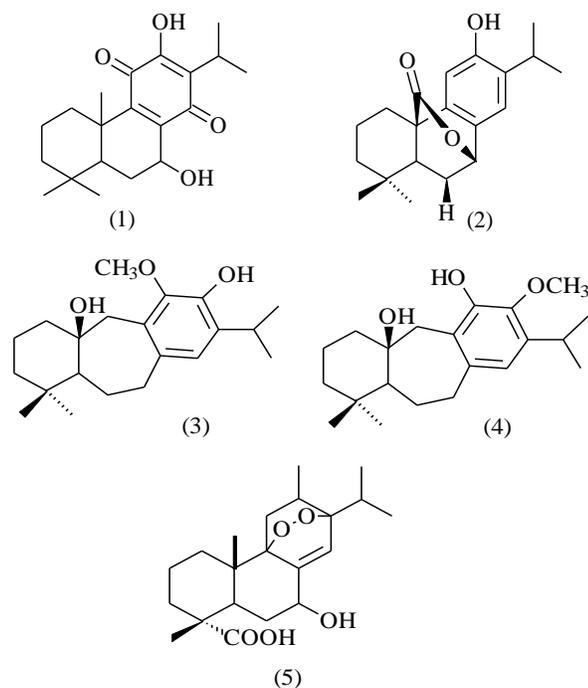


Figura 1. Estructura química de diterpenos

También se han separado e identificado triterpenos el ácido ursólico (6) de la *L. calcyna*, como se puede observar en la Figura 2 (Lawrence y Morton, 1979).

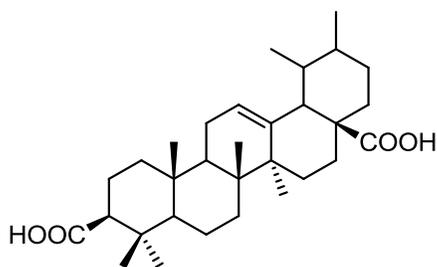


Figura 2: Triterpeno de ácido ursólico (6).

Algunos representantes de este género presentan actividad farmacológica, ejemplo: *L. bullata* presenta actividad antitumoral (Jonathan, Chun-Tao, Pezzuto, Fong, y Fansworth, 1989), la *L. caulescens*, de la cual se aislaron ácidos abietanoicos, presenta actividad hipoglicemiante. Por otra parte en México comprobaron que el carnosol (2) aislado de la *L. hastata* tienen

actividad antibiotica (Dimayuga, Keer García, Per Halfdan, y Christophersen, 1991)

De algunas especies de este género se han aislado aceites esenciales, entre las que podemos mencionar tenemos: *L. chamaedryoides*, *L. floribunda*, *L. calycina*, *L. chalepensis*, *L. graveolens*, *L. salviae*, *L. speciosa* y *L. urbaniana*. Algunos de los componentes reportados son: monoterpenos como  $\alpha$ -pineno (7), limoneno (8), 1,8-cineol (9), timol (10), alcanfor (11), acetato de bornilo (12), borneol (13), linalol (14), como se observa en la Figura 3 (Ríos y cols., 2015).

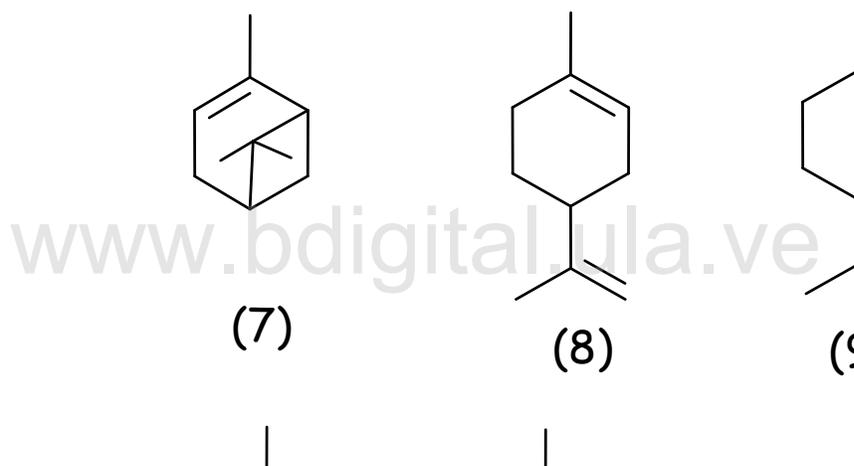


Figura 3: Monoterpenos aislados en aceites esenciales de *L. chamaedryoides*, *L. floribunda*, *L. calycina*, *L. chalepensis*, *L. graveolens*, *L. salviae*, *L. speciosa* y *L. urbaniana* y sesquiterpenos como cedrol (15), ledol (16), globulol (17),  $\alpha$ -guaieno (18), espatulenol (19), viridiflorol (20), el teucladiol (21) aislado de la *L. urbaniana* (Ríos y cols., 2015),  $\alpha$ -cadineno (22), cadinol (23), etc. (Figura 4)

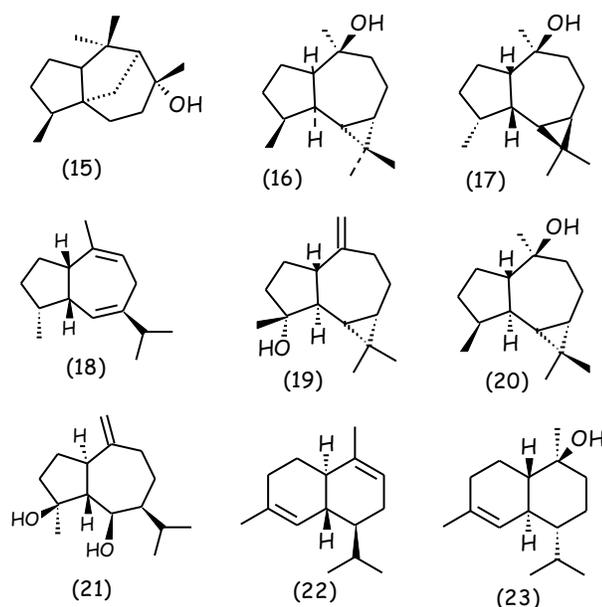


Figura 4: Sesquiterpenos

Como se puede apreciar los componentes de los aceites esenciales (monoterpenos y sesquiterpenos) presentes en este género son núcleos comunes para ellas como mentanos (8), pinanos (7), canfanos (13, 11, 12), cadinanos (22, 23) guaianos (18, 21) y aromadendranos (16, 17, 19, 20). Esto puede ayudar en la determinación quimiotaxonómica de las especies (Alarcón-Aguilera, Román-Ramos, Perez-Gutierrez, Aguilar-Contreras, Contreras-weber y Flores-Saénz, 1998).

### Distribucion geográfica del Genero *Lepechinia*

En Venezuela el género *Lepechinia* se asocia a pisos altitudinales entre los 1.500 a 3.500 msnm (Cegarra, Soriano, y Costa, 2006). Representados por las especies: *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling, *Lepechinia conferta* (Benth) Epling *Lepechinia salviaefolia* (Kunth); las cuales se distribuyen en los estados Anzoátegui, Lara, Mérida, Miranda, Sucre, Tachira, Trujillo, y el Distrito Federal. (Velásquez, 1997)

### **Lepechinia conferta**

Pertenece a la familia Lamiaceae, corresponde a hierbas que normalmente pueden ser cultivadas o se producen como malas hierbas, se encuentran a una altitud mayor a 1600 metros (Manrique y Mosquera, 1997).

Arbusto, medio arbusto o pequeños árboles con hojas ampliadas, elípticas lanceoladas hasta codiforme y truncadas en la base, flores pequeñas, verticiladas, los verticilos multitudinarios y en panícula; cáliz dentado mayormente deltoides, obtuso, estambres mayormente incluidos. Inflorescencia espigada, aglomerada, paniculadas, ramas verticiladas y sésiles, estambres incluidos o levemente excertos. Flores usualmente 3 o más en las axilas de las brácteas, más frecuentemente en multitudes y aglomeradas, los glomérulos frecuentemente espigados (Cegarra y cols., 2006)



*Figura 5: Planta Lepechinia conferta*

La preferencia por su uso puede estar relacionada tanto a su fácil disponibilidad ya que son comunes en diferentes partes del mundo y son las

más utilizadas en medicina tradicional debido a las glándulas con aceites de terpenos que se encuentran en sus células epidérmicas con propiedades organolépticas y actividades tanto antioxidantes como antibacteriana. La planta ha tenido gran popularidad y se ha extendido por casi toda América Latina (Manrique y Mosquera, 1997).

Tabla 1: Clasificación Botánica.

Nombre Científico:	<i>Lepechinia conferta</i>
Reino:	<i>Plantae</i>
Phylum:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Lamiales</i>
Familia:	Lamiaceae
Género:	<i>Lepechinia</i>
Especie:	<i>Conferta</i>
Autor Epíteto Específico:	(Benth.) Epling.

(Manrique y col 1997).

### Extractos vegetales

Los extractos vegetales permiten presentar, bajo una forma fácilmente utilizable, los componentes activos de las plantas, flores, corteza y raíz. Se define como extracto vegetal el producto líquido, semisólido o sólido, obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. Gracias al proceso de maceración, los principios activos (que son la parte activa de la planta, la que tiene acción “terapéutica”) del

vegetal pasan al disolvente. De esta forma, pueden ser utilizados con mucha más facilidad y precisión tanto en la industria farmacéutica, como en la alimenticia (Dewick, 1991).

Tipos de extractos vegetales:

Por su consistencia:

- Líquidos (extractos fluidos o tinturas). Se encuentran en diferentes diluciones
- Semisólidos (extractos blandos o densos). Suelen ser extractos concentrados, lo que se consigue evaporando parte del disolvente. No es común encontrarlos en las herboristerías.
- Sólidos (extractos secos). El disolvente ha sido completamente evaporado. Se suelen vender como capsulas que contienen dentro el extracto en polvo. Son los más utilizados en la medicina natural, ya que contienen muchos principios activos en poco volumen.

Por el disolvente utilizado:

- Hidroalcohólicos: El alcohol parece ser el disolvente más eficaz y, por eso, este es el tipo de extracto más comúnmente utilizado en perfumería y en la industria farmacéutica, ya que permiten obtener extractos ricos en sustancias mucilaginosas, taninos, sales, flavonoides, entre otros.
- Oleados: Son obtenidos de plantas con principios liposolubles, tales como esencias, carotenos y pigmentos. Necesitan de la adición de estabilizadores y antioxidantes ya que son sensibles a la oxidación.
- Secos: se obtienen por la concentración de los licores extractivos, mediante evaporización al vacío o por atomización (López, 2010).

## **Usos de los extractos vegetales**

El uso de extractos de origen vegetal se remonta a la época prehistórica, y es una de las formas más desarrolladas de medicinas, presente en todas las culturas conocidas. La industria farmacéutica actual se ha basado en los conocimientos tradicionales para la síntesis y elaboración de fármacos (un ejemplo clásico es la aspirina, originalmente un extracto del sauce, y luego sintetizada) y el proceso de verificación científica de estas tradiciones continúa hoy en día, descubriéndose constantemente nuevas aplicaciones (Dewick, 1991).

Los extractos de plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios y satisfacer las necesidades crecientes del uso de productos naturales (Dewick, 1991).

### **Técnicas de obtención de los extractos.**

Para la elaboración de medicamentos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo. A continuación se citarán los métodos de extracción más importantes:

- **Percolación:** Es el método oficial de extracción, descrito en la Farmacopea Americana, USP. Es un método que consiste en que el

menstruo (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de menstruo acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva. (Carrión Jara y García Gómez, 2010) Éste tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga permanece en contacto con el menstruo y la relación existente entre la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. “La percolación es el método extractivo menos adecuado en el caso de gran gelificación o si las drogas son muy voluminosas” (Voigt y Bornschein, 1982).

- Maceración Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el menstruo constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el menstruo actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular (Carrión Jara y García Gómez, 2010). Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. A partir de este método no se consigue el agotamiento de las sustancias

extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento” (Voigt y Bornschein, 1982).

- Decocción: Llamada también cocimiento, este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de droga más menstuo a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos (Carrión Jara y García Gómez, 2010).
- Infusión: Es el proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5% (Carrión Jara y García Gómez, 2010)
- Digestión: “Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60° C”. Al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión Jara y García Gómez, 2010).

### **Remoción o evaporación del solvente.**

El extracto obtenido anteriormente, se filtra. El filtrado se concentra para reducir su volumen; al evaporar el solvente, queda un residuo no volátil. Para que se cumpla la evaporación se necesita proveer el calor necesario para aumentar la energía cinética de las moléculas para que abandonen la superficie del líquido. La concentración puede lograrse mediante dos modalidades: evaporación simple y evaporación al vacío (Albornoz, 1980).

Evaporación al vacío: la evaporación a presión reducida, ofrece las ventajas de que se puede recuperar gran parte del solvente y es más rápida, asimismo, cuando el volumen del solvente es considerable, la evaporación simple resulta inadecuada. Se utilizan los rotavaporadores, donde el balón contentivo de la mezcla, rota en ángulo sobre agua caliente, lo cual permite que el solvente se desparrame sobre las paredes del balón, ofreciendo mayor superficie de evaporación (Albornoz, 1980).

### **Técnicas de separación e identificación de los constituyentes químicos de los extractos vegetales.**

Entre las técnicas utilizadas para separar los constituyentes de una esencia, mencionaremos el empleado para este estudio:

#### **Cromatografía de en capa fina, por sus siglas en ingles (TLC):**

La TLC es una técnica analítica y tiene como objetivo el análisis de una mezcla de componentes. En la cromatografía en capa fina (TLC) la fase estacionaria consiste en una capa delgada de un adsorbente (como por ejemplo gel de sílice, alúmina o celulosa) depositada sobre un soporte plano como una placa de vidrio, o una lámina de aluminio o de plástico (Angurell y cols., 2014).

El proceso es similar a la cromatografía de papel con la ventaja de que se desarrolla más rápidamente, proporciona mejores separaciones y se puede elegir entre diferentes adsorbentes. La TLC es una técnica estándar en el laboratorio de química orgánica. Debido a su simplicidad y velocidad, la TLC se utiliza a menudo para monitorizar las reacciones químicas y también para el análisis cualitativo de los productos de una reacción, puesto que permite

conocer de manera rápida y sencilla cuántos componentes hay en una mezcla (Angurell y cols., 2014).

- Técnicas de identificación de los componentes químicos de los extractos vegetales mediante la método de Screening Fitoquímico o tamizaje fitoquímico:

El screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en someter a los extractos a ciertos ensayos de reacción de color y/o precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación de los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal (Lock, 1994).

Entre los ensayos más importantes se encuentran:

- Ensayo de Lieberman-Bourchard (triterpenos y/o esteroides): se basa en la formación de un compuesto coloreado por la acción del ácido sulfúrico concentrado sobre los esteroides y triterpenos en medio anhidro. El medio anhidro se consigue con ácido acético y el producto final obtenido es un compuesto de color verdoso en el caso de los esteroides, y color rojo o violeta para los triterpenos (Tamayo, Verdecia, y Mojera, 2011).
- Ensayo de espuma (saponinas): Debido a que las soluciones de saponinas presentan actividad óptica, es común medir el contenido de

sólidos solubles en solución utilizando un refractómetro (Tamayo y cols., 2011).

- Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides): se basan generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular. Como el reactivo yodado de Dragendorff (yodo bismutato potásico, precipitado rojo-naranja); el reactivo de Mayer (mercurio tetrayoduro potásico, precipitado blanco- amarillento) y el reactivo Wagner (yoduro de potasio, precipitado marrón) (Domínguez, 1973).
- Ensayo de Hidróxido de amonio (cumarinas): se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región ultravioleta (UV) del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoniaco (Tamayo y cols, 2011).
- Ensayo de Borntrager (quinonas): la naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Tamayo y cols, 2011).
- Ensayo de Shinoda (flavonoides): el zinc en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ion flavilio de color rojo escarlata (varía desde el rosa muy débil

hasta el rojo escarlata). Todos los flavonoides, excepto chalconas, auronas e isoflavonas dan positiva esta reacción (Domínguez, 1973).

## **Bacterias**

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares, con movilidad propia y que ostentan un muy pequeño tamaño y diversidad en su forma: esferas, barras, hélices, entre otras. Las características distintivas de las procariotas son su tamaño relativamente pequeño, casi siempre del orden de 1µm de diámetro, y la ausencia de una membrana nuclear. El Ácido desoxirribonucleico (ADN) de casi todas las bacterias es un círculo con una longitud aproximada de 1mm; este es el cromosoma procariótico (Brooks, Butel, Carroll, Morse, y Mietzner, 2014).

La mayor parte de las células procariotas posee un solo cromosoma. El ADN cromosómico se debe doblar más de 1000 veces para acomodarse dentro de la membrana celular procariótica. Existe evidencia considerable que sugiere que quizá estos dobleces se realizan en forma ordenada, acercando ciertas regiones del ADN. La región especializada de la célula que contiene al ADN se denomina nucleoide y se puede observar con un microscopio electrónico o un microscopio óptico después de someter a la célula a un tratamiento especial para poder realizar la observación, permitiendo así ver las características más importantes que lo constituyen (Brooks y cols., 2014).

### **Características Generales de las Bacterias.**

- Bacterias Gram positivas:

Posee una pared celular gruesa formada principalmente por una capa de peptidoglicano (mureina) y dos clases de ácidos teicoicos: ácido lipoteicoico está en la superficie empotrado en la capa de peptidoglicano y unido a la

membrana citoplasmática; y ácido teicoico de la pared que está en la superficie y se une solo a la capa de peptidoglicano (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Los miembros del género *Staphylococcus* son catalasa positivos y hasta hace poco formaban parte de la familia Micrococacaceae junto a los géneros *Planococcus* y *Stomacoccus*. Tentativamente el género *Staphylococcus* se colocó dentro de la familia Bacillaceae junto a otros géneros, *Bacillus*, *Gamella*, *Listeria*, *Planococcus*, entre otros. Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, catalasa positivo y el diaminoácido en el peptidoglicano es la L-lisina. El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies, de las cuales destacaremos *S. aureus* (Seija, 2006).

Existen gran variedad de bacterias Gram positivas pero se describirán a continuación las empleadas para este estudio o las más importantes desde el punto de vista clínico.

*Staphylococcus aureus* se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También *S. aureus* es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada (Seija, 2006).

El *Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva comensal, que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Sin embargo puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente hospitalario. La existencia de *Enterococcus* se potencia porque ha

tenido la habilidad de adquirir resistencia a prácticamente todos los antibióticos en uso. El hábitat normal de estos es el tubo digestivo de animales de sangre caliente. Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos. Son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, entre otros (Murray y cols., 2009).

*E. faecalis* es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. No presenta una reacción con la catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno, puede producir una reacción pseudocatalasa si se cultiva en agar sangre, sin embargo ésta es muy débil. *E. faecalis* puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal (Murray y cols., 2009).

Existe gran variedad de bacterias Gram negativas pero se describirán a continuación las empleadas para este estudio. La familia Enterobacteriaceae son bacilos cortos Gram negativos que miden entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$  de ancho por 2-4  $\mu\text{m}$  de largo. La mayoría aerobios facultativos y crecen en medios nutritivos sensibles, son flora habitual del tracto gastrointestinal. En medios de cultivos forman colonias mucoides o secas relativamente grandes cuyo hábitat es el tubo intestinal del hombre y los animales. La familia incluye muchos géneros entre ellos: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y otros (Urbina y Villamizar, 2012).

La familia Enterobacteriaceae son anaeróbicas o aeróbicas facultativas, antigénicas complejas y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Se caracterizan desde el punto de vista bioquímico por la

capacidad de sus miembros para reducir los nitratos a nitritos y para fermentar la glucosa para la producción de ácidos o ácido y gas (Urbina y Villamizar, 2012).

La familia Pseudomonadaceae, son bacilos especialmente capaces de degradar muchos compuestos distintos, sin embargo no pueden degradar polímeros a monómeros. Son bacterias mesófilas que poseen megaplásmidos de 600 Kb, son megaplásmidos degenerativos porque es en ellos donde se encuentran los genes que se utilizan para degradar los diferentes compuestos. Las bacterias del género *Pseudomonas* son muy ubícuas y se encuentran en suelos, aguas, y ambientes intrahospitalarios. Son muy resistentes a antibióticos lo que origina que los pocos patógenos que se dan en este género sean muy peligrosos (Murray y cols, 2009).

La *Klebsiella pneumoniae* es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, compuesto por bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, que desempeñan un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Dentro de este género bacteriano, está implicada principalmente infecciones nosocomiales. Es el agente causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, neonatos, diabetes mellitus o alcohólicos (Murray y cols, 2009).

La *Escherichia coli* forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, como por ejemplo el ser humano. Es un bacilo gramnegativo, no exigente, oxidasa negativo, catalasa positivo, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento preferentemente es 37 °C (mesotermo), fimbriado y comúnmente es móvil por flagelos peritricos. *E. coli*

es la bacteria anaerobia facultativa comensal más abundante de la microbiota del tracto gastrointestinal, donde ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de la producción de las vitaminas B y K (Murray y cols, 2009).

### **Mecanismos de resistencia a los antibacterianos.**

El uso de los antibacterianos para el tratamiento de las infecciones ha sido relacionado, prácticamente siempre, a la aparición de cepas resistentes a ellos. Los conocimientos disponibles sobre los diferentes mecanismos de resistencia, tanto fenotípicos (resistencias cruzadas y resistencias asociadas) como bioquímicos y genéticos, han permitido establecer unas buenas bases para la terapéutica, así como para la búsqueda de nuevos antibacterianos (Ruíz y Guillén, 2005).

La importancia de estos conocimientos en el ámbito terapéutico se hace evidente cuando en los estudios sistemáticos de sensibilidad *in vitro* que se utilizan habitualmente en los laboratorios de microbiología no se detecta la resistencia a un antibacteriano a pesar de que el microorganismo objeto de estudio posee la dotación genética necesaria para expresar dicha resistencia. En estas situaciones el conocimiento de los mecanismos de resistencia y la elección de los antibacterianos más idóneos para detectar dichas resistencia resulta vital para evitar fracasos terapéuticos (Ruíz y Guillén, 2005).

La interpretación conjunta de la resistencia a varios antimicrobianos de la misma familia o de diferentes familias, la deducción del posible mecanismo de resistencia y la posterior generación del informe con el antibiograma (patrón de sensibilidad a los antibacterianos) es lo que se ha denominado antibiograma interpretativo (Ruíz y Guillén, 2005).

Los microorganismos presentan dos tipos de resistencia que pueden ser naturales, adquiridas o terapéuticas. La resistencia natural está asociada a una vía de biosíntesis natural presente en el microorganismo, no todos estos son inicialmente sensibles a todos los antibacterianos, sino que un determinado microorganismo puede ser resistente a un antibacteriano sin necesidad de que medie ninguna adquisición (Ruíz y Guillén, 2005).

La resistencia adquirida se refiere, cuando en una especie que es naturalmente sensible a un antibacteriano aparecen cepas de la misma especie con resistencia a dicho antibacteriano. La resistencia terapéutica está influida por muchos factores, como los dependientes del hospedador, los relacionados con el antibacteriano, los relacionados con el paciente y los relacionados con los microorganismos por tal motivo, el fracaso terapéutico de un tratamiento puede deberse a la resistencia bacteriana ya sea natural o adquirida (Ruíz y Guillén, 2005).

Puede existir el origen no genético de la fármacorresistencia ya que en la mayor parte de las acciones antibacterianas es necesaria la replicación de las bacterias. Por lo tanto los microorganismos que carecen de actividad metabólica (no se multiplican) son fenotípicamente resistentes a los fármacos. Sin embargo, su progenie es sensible. Por otra parte, la mayor parte de los microorganismos resistentes a fármacos emerge como resultado de algún cambio genético y una serie de procesos de selección por los antibacterianos (Brooks y cols., 2014).

Resistencia cromosómica: surge como resultado de una mutación espontánea en un locus que regula la sensibilidad a determinado antibacteriano. La presencia del antibacteriano sirve como mecanismo de selección para suprimir a los microorganismos sensibles y fomentar la proliferación de los mutantes resistentes. Constituyen una causa rara de

resistencia clínica a los fármacos. Los mutantes cromosómicos por lo general son resistentes gracias a un cambio en un receptor estructural para un fármaco. Por lo tanto, la proteína P 12 en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano sirve como receptor para el enlace de la estreptomicina. La mutación en el gen que regula a esa proteína estructural provoca resistencia a la estreptomicina. La mutación también puede provocar la pérdida de PBP, lo que hace que estos mutantes sean resistentes a los  $\beta$ -láctamicos (Brooks y cols., 2014).

Resistencia extracromosómica: con frecuencia las bacterias contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados plásmidos. Algunos plásmidos transportan genes de resistencia a uno, y con frecuencia a varios, antibacterianos. Los genes de los plásmidos para resistencia antibacteriana suelen regular la formación de enzimas que pueden destruir a los antibacterianos. Así, los plásmidos establecen la resistencia a las penicilinas y cefalosporinas al transportar genes para la formación de  $\beta$ -lactamasas. Los plásmidos codifican las enzimas que acetilan, adenilan o fosforilan diversos aminoglucósidos, para enzimas que determinan el transporte activo de las tetraciclinas a través de la membrana celular, y para otras. El material genético y los plásmidos se pueden transferir a través de transducción, transformación y conjugación (Brooks y cols., 2014).

- Transducción: es una recombinación genética en las bacterias mediada por bacteriófagos. En términos simples, una partícula de transducción puede considerarse como el ácido nucleico bacteriano en un fago cubierto. Incluso una población de fagos líticos puede contener algunas partículas en las cuales la cubierta del fago está rodeada por ADN derivado de la bacteria más que del propio fago. Tal población se ha utilizado para transferir genes de una bacteria a otra. Los fagos atemperados son los vehículos preferidos para la

transferencia genética porque la infección de las bacterias receptoras bajo condiciones que favorecen la lisogenia reduce la lisis celular y por tanto favorece la supervivencia de las cepas recombinantes (Brooks y cols., 2014).

- Transformación: la captación directa de ADN donador por bacterias receptoras depende de su competencia para la transformación. La competencia natural es poco común entre bacterias y algunas de estas cepas son transformables sólo en presencia de factores de competencia, que se producen en un punto específico en el ciclo de crecimiento. Otras cepas sufren transformación natural con rapidez y esos organismos ofrecen una promesa para la ingeniería genética por la facilidad con la cual incorporan ADN modificado a sus cromosomas. Se encuentran bacterias transformables competentes naturalmente en varios géneros, lo que incluye *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* (Brooks y cols., 2014).
- Conjugación: los plásmidos son los elementos genéticos que más a menudo se transfieren por conjugación. Las funciones genéticas necesarias para la transferencia están codificadas por los genes *tra*, que son transportados por plásmidos autotransmisibles. Estos últimos pueden movilizar otros plásmidos o porciones del cromosoma para su transferencia. En algunos casos se logra la movilización porque los genes *tra* proporcionan las funciones necesarias para la transferencia de un plásmido por lo demás no susceptible de transmisión. En otros casos, los plásmidos autotransmisibles se integran con el ADN de otro replicón y, como una extensión de sí mismo, aportan cadenas de ADN a la célula receptora (Brooks y cols., 2014).

- Resistencia cruzada: algunos microorganismos que son resistentes a cierto fármaco también son resistentes a otros fármacos que comparten un mecanismo de acción. Este tipo de relación existe principalmente entre fármacos con similitud química o que tienen un modo similar de enlace o acción. En determinadas clases de fármacos, el núcleo activo de la sustancia química es tan similar entre distintos congéneres que la resistencia cruzada es extensa (Brooks y cols., 2014).

### **Antibióticos.**

Los antibióticos son una sustancia producida por microorganismos que en pequeñas cantidades inhiben a otro microorganismo. Por consiguiente, las sulfamidas completamente sintéticas no son antibióticos desde el punto de vista técnico aunque en la práctica a menudo se ignora esta distinción. Son relativamente sencillos, producidos por bacterias u hongos que atacan específicamente a las bacterias. Interferiendo en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco adecuado (Murray y cols., 2009).

### **Mecanismos de acción de los antibacterianos**

Los antibacterianos actúan de diversas formas: por toxicidad selectiva, inhibiendo la síntesis, y función de la membrana celular, inhibiendo la síntesis de proteínas o inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Brooks y cols., 2014).

- Toxicidad selectiva: el antibacteriano ideal exhibe toxicidad selectiva, lo que significa que el fármaco es nocivo para el microorganismo patógeno sin dañar al hospedador. La toxicidad selectiva a menudo es relativa y no absoluta. Esto implica que un fármaco a la concentración que tolera el hospedador es nocivo para el microorganismo infeccioso. La toxicidad selectiva es una función de un receptor específico

necesario para la fijación del fármaco o bien depende de la inhibición de algún acontecimiento bioquímico indispensable para la bacteria patógena pero no para el hospedador. Los mecanismos de acción de los antibacterianos se pueden describir bajo cuatro encabezados:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular: las bacterias poseen una capa externa rígida, llamada pared celular. La pared celular conserva la forma y el tamaño del microorganismo, cuya presión osmótica interna es elevada. Cuando la pared celular se lesiona, o su formación se inhibe, la célula se lisa. En un ambiente hipertónico, la formación dañada de la pared celular provoca la formación de “protoplastos” bacterianos esféricos en los microorganismos Gram positivos o “esferoplastos” en los microorganismos Gram negativos; estas variedades están limitadas por una membrana citoplasmática frágil. Si estos protoplastos o esferoplastos se colocan en un ambiente con tonicidad ordinaria, captan líquidos rápidamente, se edematizan y se explotan. Las muestras obtenidas de pacientes que reciben tratamiento con antibióticos que actúan sobre la pared celular a menudo exhiben bacterias edematosas o con formas raras (Brooks y cols., 2014).
2. Inhibición de la función de la membrana celular: el citoplasma de las células vivas está limitado por la membrana citoplasmática, que sirve como barrera selectiva de permeabilidad, lleva a cabo funciones de transporte activo y, por lo tanto, regula la composición interna de la célula. Cuando se altera la integridad funcional de la membrana citoplasmática, las macromoléculas e iones salen de la célula y la célula se daña o muere. La membrana citoplasmática de las bacterias tiene una estructura distinta a la de las células animales y es dañada

con más facilidad por ciertos fármacos. Por lo tanto, es posible la quimioterapia selectiva (Brooks y cols., 2014).

3. Inhibición de la síntesis de proteínas: las bacterias poseen ribosomas 70S, mientras que las células de mamíferos tienen ribosomas 80S. Las subunidades de cada tipo de ribosoma, su composición química y sus especificidades funcionales son lo suficientemente distintas como para explicar la razón por la que los antimicrobianos inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas bacterianos sin tener efectos importantes en los ribosomas de mamíferos. En la síntesis normal de proteínas microbianas, el mensaje del ARNm se “lee” simultáneamente en diversos ribosomas que se encuentran dispersos en la tira de ARNm. Estos se denominan polisomas (Brooks y cols., 2014).
4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: puede producirse mediante la inhibición de la proliferación bacteriana al unirse fuertemente con la polimerasa de ARN dependiente del ADN de las bacterias, también mediante la inhibición microbiana del ADN bloqueando a la ADN girasa, así como la inhibición competitiva por el centro activo de ciertas enzimas (Brooks y cols., 2014).

### **Actividad antibacteriana**

El crecimiento acelerado de la población trae con ella enfermedades como por ejemplo las infecciosas, producidas por bacterias, virus, hongos entre muchos otros microorganismos. A pesar de que existen muchos antibacterianos para su control o tratamiento, el uso irracional de estos viene generando resistencia microbiana y otros efectos, llamados secundarios que no son beneficiosos para la salud. La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas; algunas especies con excelentes resultados,

debido a sus constituyentes químicos, los cuales pueden tener más de 150 componentes. En tal sentido, la actividad antibacteriana es la capacidad de destruir, inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena (Urbina y Villamizar, 2012).

Esta diversidad de componentes brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una materia prima más económica y natural: las plantas medicinales. La actividad biológica puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida (Urbina y Villamizar, 2012).

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes antibacterianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas. Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables solo se pueden obtener con disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zonas correlacionadas con la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos (Urbina y Villamizar, 2012).

### **Métodos para evaluar la actividad antibacteriana**

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las

resistencias bacterianas que permite revisar los protocolos de la antibioticoterapia empírica (Picazo, 2000).

Según Koneman, Allen, Janda, Schereckenberger, y Winn, (2005) existen varios métodos para determinar la actividad antimicrobiana de un extracto que pueden mostrar cuales agentes son más eficaces contra un patógeno, y a la vez pueden dar una estimación de la dosis terapéutica adecuada. Entre estos métodos se destacan:

### **1. Prueba de sensibilidad por dilución**

En este método se incorporan cantidades escalonadas de antibacterianos a un medio bacteriológico líquido o sólido. La finalidad de este método es determinar la concentración más baja del antibacteriano ensayado que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria analizada (concentración mínima inhibitoria, que normalmente se expresa en mililitros o miligramos/litro). Sin embargo, la CIM no siempre representa un valor absoluto, ésta es un punto que se encuentra entre la concentración más baja del ensayo que inhibe el crecimiento de la bacteria y la siguiente concentración más baja del ensayo. Por tanto, se puede considerar que las determinaciones de la CIM utilizando una serie de diluciones tienen una variación inherente de una dilución (Koneman y cols., 2005).

El rango de los antibacterianos debería abarcar tanto los criterios de interpretación (sensibilidad, valor intermedio y resistencia) para una combinación específica entre bacteria y antibiótico como los microorganismos de referencia apropiados para el control de calidad (Koneman y cols, 2005).

Los métodos para determinar la sensibilidad a los antibacterianos que se basan en diluciones parecen ser más reproducibles y fáciles de cuantificar

que los basados en difusión. Las ventajas de las pruebas de microdilución en caldo es que permiten obtener un resultado cuantitativo, indicando la cantidad necesaria de determinado fármaco para inhibir o aniquilar al microorganismo investigado (Koneman y cols, 2005).

Cualquier laboratorio que pretenda usar un método de dilución y utilizar sus propios reactivos y diluciones de antibióticos debería tener la capacidad de obtener, preparar y mantener un stock de soluciones de antibacterianos con una pureza adecuada y generar diluciones de trabajo de modo regular para asegurar la precisión y estandarización en sus procedimientos (Koneman y cols, 2005).

## **2. Dilución en caldos de cultivo**

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias concentraciones de un agente antibacteriano (normalmente mediante diluciones seriadas dobles) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 mL (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución) (Picazo, 2000).

Debido a que en la actualidad la mayor parte de las pruebas para antibacterianos mediante microdilución en medio líquido se preparan comercialmente, este método es menos flexible que el basado en la dilución en medio sólido o en la difusión en disco en cuanto a su capacidad para admitir cambios necesarios derivados del programa de control y seguimiento (Picazo, 2000).

### **3. Dilución en medio sólido**

La dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antibacterianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor CMI para una determinada combinación bacteria/antibacteriano en una prueba concreta (Picazo, 2000). La dilución en medio sólido se recomienda a menudo como un ensayo estandarizado para medir la sensibilidad a los antibacterianos de microorganismos difíciles de cultivar como es el caso de los anaerobios y las especies *Helicobacter* y *Campylobacter* (Picazo, 2000).

### **4. Prueba de sensibilidad por Difusión en Agar (Kirby- Bauer)**

Este método incorpora el antibacteriano a discos de papel de filtro. Su introducción permitió agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a un número importante de antibacterianos de forma simultánea. El empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad está estandarizado y se correlaciona con la CMI. Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido uno de los más utilizados en los laboratorios (Malbrán, 2012).

Se coloca un disco de papel filtro que contiene determinada cantidad de un fármaco, en la superficie de un medio sólido en el que se ha sembrado el microorganismo investigado, el microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona

de inhibición que se forma alrededor de cada disco como poder de inhibición que tiene el fármaco contra dicho microorganismo y se compara con las referencias oportunas publicadas por el Instituto de Estandares Clinicos y de Laboratorio (CLSI). De esta manera se sabe si el microorganismo es Sensible, Intermedio o Resistente a cada uno de los antibióticos (Malbrán, 2012).

### **5. Antibiograma Atb Rapid**

También conocidos como métodos automatizados, generalmente producidos por la empresa bioMerieux, la mayoría de estos novedosos métodos utilizan sistemas de microdilución en medio líquido sobre microplacas con pocillos en “U” e interpretan el crecimiento bacteriano en diferentes pocillos por medio de un autoanalizador (mediciones por turbidez o fluorescencia) o, en el caso de los sistemas más sencillos, por simple lectura óptica a través de un visor invertido de espejo (Urbina y Villamizar, 2012).

Su manipulación suele ser fácil y rápida, generalmente automatizada o semiautomatizada, lo que los convierte en métodos ideales para grandes volúmenes de trabajo. Una de sus grandes limitaciones es que solo ofrecen garantías para investigar microorganismos de crecimiento rápido y que no tengan requerimientos especiales (Urbina y Villamizar, 2012).

### **6. Método de la Cinta o Epsilómetro Etest®**

Es un método reciente, resulta de una combinación de características de los métodos de difusión en agar y de dilución. Se trata de una técnica cuantitativa en placa que permite obtener una lectura directa de CMI en µg/mL, ya que se emplean tiras plásticas impregnadas en concentraciones crecientes de antibiótico (Malbrán, 2012).

El microorganismo se inocula en una placa y sobre ella se deposita la tira del antibiótico (o antibióticos) a ensayar. Se incuba durante 16-24 horas a 35 °C y se valora la zona de inhibición alrededor de cada tira. La CMI se lee directamente observando el punto más bajo de la elipse que presente el crecimiento (Malbrán, 2012).

### **Definición de términos**

#### **Resistencia Antibacteriana**

Se denomina resistencia antibacteriana a la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antibacteriano al que originalmente era sensible (Ruíz y Guillen, 2005).

#### **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI ó CIM)**

Es la concentración más baja de un antibacteriano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración inhibitoria mínima es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antibacteriano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos (Ruíz y Guillén, 2005).

#### **Infección**

Es un término clínico que indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno, es decir, que existe invasión con lesión tisular por esos mismos gérmenes (hongos, bacterias, protozoos, virus, priones), sus productos (toxinas) o ambos a la vez (Tortora y cols., 2007).

## Operacionalización de las Variables

*Tabla 2.* Operacionalización de la variable independiente: Composición química del extracto de acetona de la especie *L. conferta*.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto de acetona de <i>L. conferta</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Metabolito secundario o Producto natural que se usa como sinónimo, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Tamayo y cols, 2011).
4. Definición operacional ¿cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
<p>-Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.</p> <p>-Cromatografía de Capa Fina (TLC) usando reveladores de tipo físico como la lámpara ultravioleta y químicos utilizando reactivos determinados dependiendo de las características químicas de los metabolitos secundarios.</p>	<p>Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Alcaloides.</li> <li>-Esteroles y/o triterpenos.</li> <li>-Saponinas.</li> <li>-Compuestos fenólicos simples.</li> <li>-Taninos.</li> <li>-Flavonoides.</li> <li>-Quinonas y Antraquinonas.</li> <li>-Glicosidos, cardiotónicos y cumarinas.</li> <li>-Sesquiterpenlactonas.</li> </ul> <p>Para la cromatografía de capa fina:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Revelador físico: Compuestos orgánicos insaturados que absorben radiaciones ultravioletas.</li> <li>-Reveladores químicos: Sustancias incoloras que forman complejos coloreados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Alcaloides: La aparición de turbidez o precipitados.</li> <li>-Esteroles y/o triterpenos: Coloración azul o verde para esteroides; coloración rosa, roja, magenta o violeta para triterpenos.</li> <li>-Formación de abundante espuma para saponinas.</li> <li>-Compuestos fenólicos: Coloración de azul a negro.</li> <li>-Un precipitado blanco indica presencia de taninos.</li> <li>-Flavonoides: Coloración naranja a roja, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas.</li> <li>-Para antraquinonas y quinonas una coloración roja.</li> <li>-Glicosidos cardiotónicos: Coloración púrpura o violácea.</li> <li>-Las coloraciones roja, violeta o rosa para sesquiterpenlactonas.</li> </ul>

Fuente: Obregón, Pérez y Cordero de Rojas, 2019.

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana presente en el extracto de acetona de la especie *L. conferta*.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto de acetona de la especie <i>L. conferta</i> .	Independiente Cuantitativa Discreta	Actividad antibacteriana, es la propiedad de ciertas sustancias que forman un compuesto, o que se hallan en una muestra capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos (Urbina y Villamizar, 2012).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Se puede medir por la actividad antibacteriana: -Método modificado de pozos de agar.	Cepas Grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> . - <i>Enterococcus faecalis</i> . Cepas Gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> . - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . - <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	- Sensible. -Sensibilidad intermedia -Resistente  Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas Grampositivas y Gramnegativas.

Fuente: Obregón, Pérez y Cordero de Rojas, 2019.

## **Hipótesis**

Dado que muchas especies de la familia Lamiaceae presentan actividad contra bacterias, hongos y algunos parásitos, es de esperar que el extracto proveniente de la planta *Lepechinia conferta*, presente actividad inhibitoria frente a bacterias ATCC como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella neumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo de Investigación**

Según (Hurtado, 2010) los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. Específicamente pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Por tal razón, esta investigación es de tipo confirmatoria ya que se confirmará el evento de estudio relacionado con: la Actividad Antibacteriana del extracto de acetona de la planta *Lepechinia conferta*, en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

#### **Diseño de la Investigación**

El diseño de la investigación se refiere a las diferentes estrategias que utilizará el investigador para responder a la pregunta de investigación. Adicionalmente, refirió que el diseño tiene relación con el dónde y cuándo se recopilara la información necesaria y la amplitud de la misma, con el fin de responder la interrogante planteada (Hurtado, 2010). Al respecto esta investigación tendrá un diseño: de campo y laboratorio, contemporáneo, longitudinal y bivariable.

## **Población y Muestra**

### **Unidad de Investigación**

La unidad de investigación de este estudio estuvo representada por la planta *Lepechinia conferta* perteneciente a la familia Lamiaceae, recolectada en el Paramo de La Negra, vía Pregonero a orillas de la carretera, en las cercanías de la población de Bailadores (aproximadamente a 25 Km).

### **Selección del Tamaño Muestral**

El tamaño de la muestra estuvo representada por las hojas frescas de la planta en estudio, se recolectaron 2.500 gramos de hojas, tomando en cuenta que el porcentaje de humedad forma parte del peso total, el cual se disminuira después del secado.

## **Sistema de Variables**

Variable independiente:

- Composición química del extracto acetónico obtenido de la especie *Lepechinia conferta*.

Variable dependiente:

- Actividad antibacteriana del extracto acetónico de la especie *Lepechinia conferta* frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

### **Instrumento de recolección de datos**

En la investigación los datos fueron recolectados a través de tablas de resultados considerando las bases teóricas y la operacionalización de las variables.

## Procedimientos y/o metodologías

### Recolección de la Muestra

Las muestras de la planta *Lepechinia conferta*, fue recolectada en el Paramo de La Negra, vía Pregonero a orillas de la carretera, en las cercanías de la población de Bailadores (aproximadamente a 25 Km). Tomándose aproximadamente 2.500 gramos de la misma, posteriormente fueron almacenadas a temperatura ambiente, para su posterior pretratamiento y obtención del extracto en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### Preparación de los extractos vegetales

Se separaron las hojas de la planta, aproximadamente 400 gramos de material botánico fresco, luego se secó en una estufa durante 3 días a 40 °C; una vez secas se muelen. El material seco se colocó en una columna y mediante la técnica de maceración en frío, la cual consistió en remojar el material vegetal seco y pulverizado, con el solvente correspondientes (acetona) por un periodo de una semana, con la finalidad de que éstos penetraran la estructura celular, y disolviera las sustancias y compuestos, al cabo del cual se decantó el líquido, se filtró y se exprimó el material foliar residual, obteniendo un extracto con un peso de 400 gramos, el cual se le realizó un tamizaje Fitoquímico y la Cromatografía de Capa Fina (TLC). como se describe en la Figura 5.

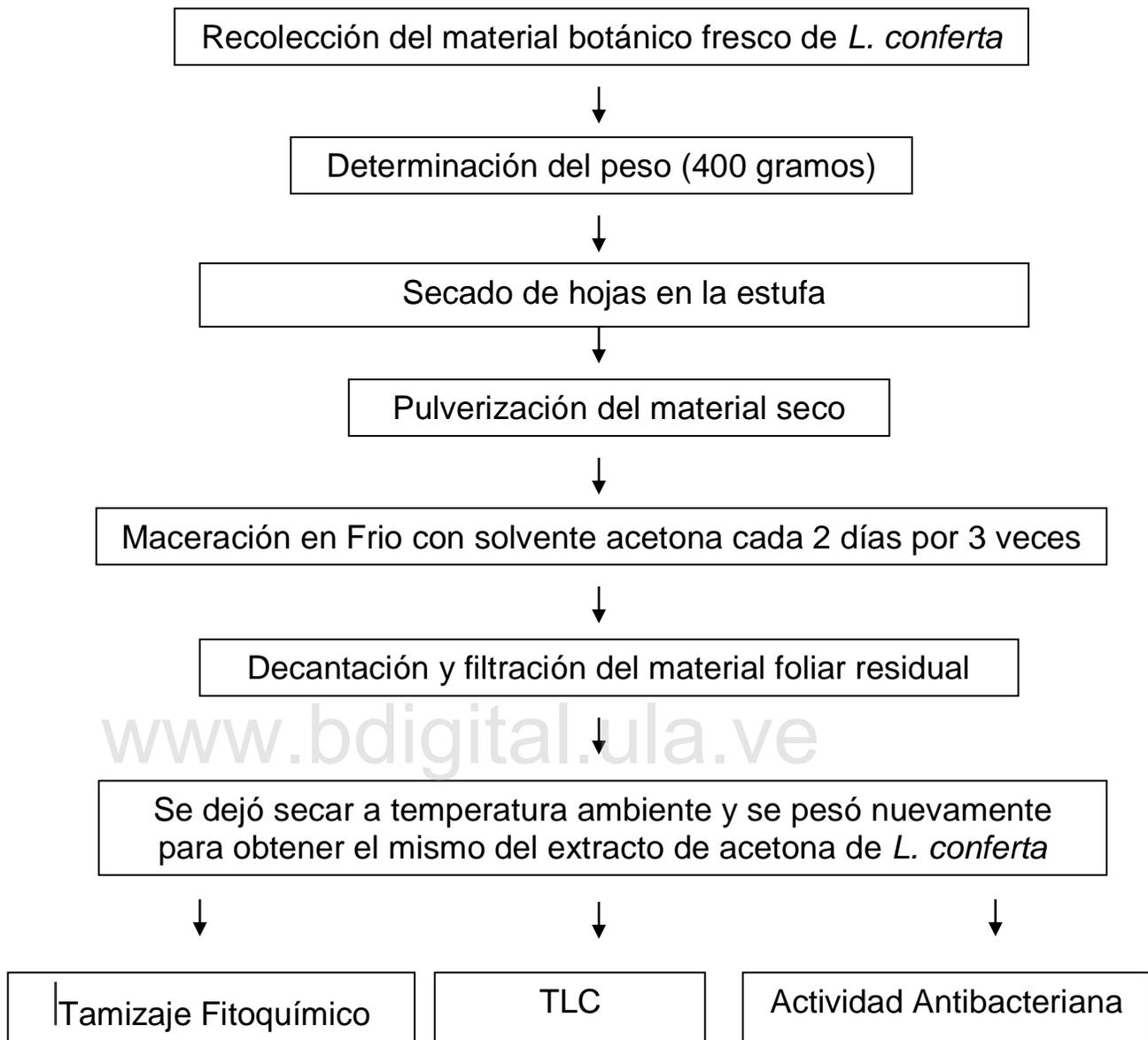


Figura 6. Diseño experimental para la obtención del extracto de acetona de la especie *L. conferta*.

## **Screening fitoquímico o Tamizaje**

Se realizó mediante reacciones químicas destinadas a determinar la presencia de metabolitos secundarios en el material vegetal, siguiendo el procedimiento según (Miranda y Cuellar, 2000). En tal sentido se realizarón los siguientes ensayos:

### **- Identificación de esteroides y triterpenos.**

- **Reacción Lieberman Bourchard:** en 1 tubo de ensayo limpio, seco y debidamente identificado, se tomo una pequeña cantidad del extracto seco de acetona y se adicionó diclorometano al tubo hasta que se disolviera la muestra, posteriormente se colocó en el baño ultrasonico, y se les añadió 0,5 mL de anhídrido acético, y luego se adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La reacción se interpreta positivo cuando aparecen coloraciones violeta, verde o azul. Al formarse una coloración azul o verde en la interfase hay presencia de esteroides; si la coloración es rosa, rojo, magenta o violeta habrá presencia de triterpenos.

### **- Identificación de cumarinas:**

- **Reacción con hidróxido de amonio:** Se concentró otra porción deL extracto y se le adicono 0,5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul- violeta bajo la luz ultravioleta.

### **- Identificación de flavonoides**

Para realizar la determinación de flavonoides fue necesario realizar el siguiente ensayo. Se disolvió una porción del extracto en 6 mL de etanol y se dividió en 2 tubos. El primer tubo se usó para la reacción de Shinoda y el segundo se utilizó como blanco.

- **Reacción de Shinoda:** se adicionaron 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chaiconas. Luego se colocó un trozo de magnesio metálico, si se forma una coloración naranja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoides y si es magenta flavononas.

#### **-Identificación de compuestos fenólicos.**

- **Reacción de cloruro férrico:** Una pequeña porción del extracto de acetona fue disuelto en etanol, posteriormente al mismo se le adicionó 1 gota de cloruro férrico al 10 %, la formación de coloraciones indica la presencia de compuestos fenólicos: de azul a negro derivados del ácido gálico y coloraciones verdes derivados del catecol.

#### **Cromatografía de capa fina (TLC):**

Se utilizó una lámina de aluminio recubierta con una capa delgada de un sólido adsorbente (gel de sílice). Luego se depositó una pequeña cantidad de la muestra problema en disolución en un punto en la parte inferior de la placa. Posteriormente la placa se introdujo en una cubeta cromatográfica, de forma que sólo la parte inferior de la placa quedara sumergida en el líquido. Este líquido o eluyente hexano:acetato (8:2) es la fase móvil y asciende por la placa de TLC por capilaridad.

Cuando el eluyente llegó a la parte superior de la placa, se retiró de la cubeta, luego se secó, y los componentes separados de la mezcla se visualizaron con la lámpara de luz ultravioleta; como se describe en la Figura 6.

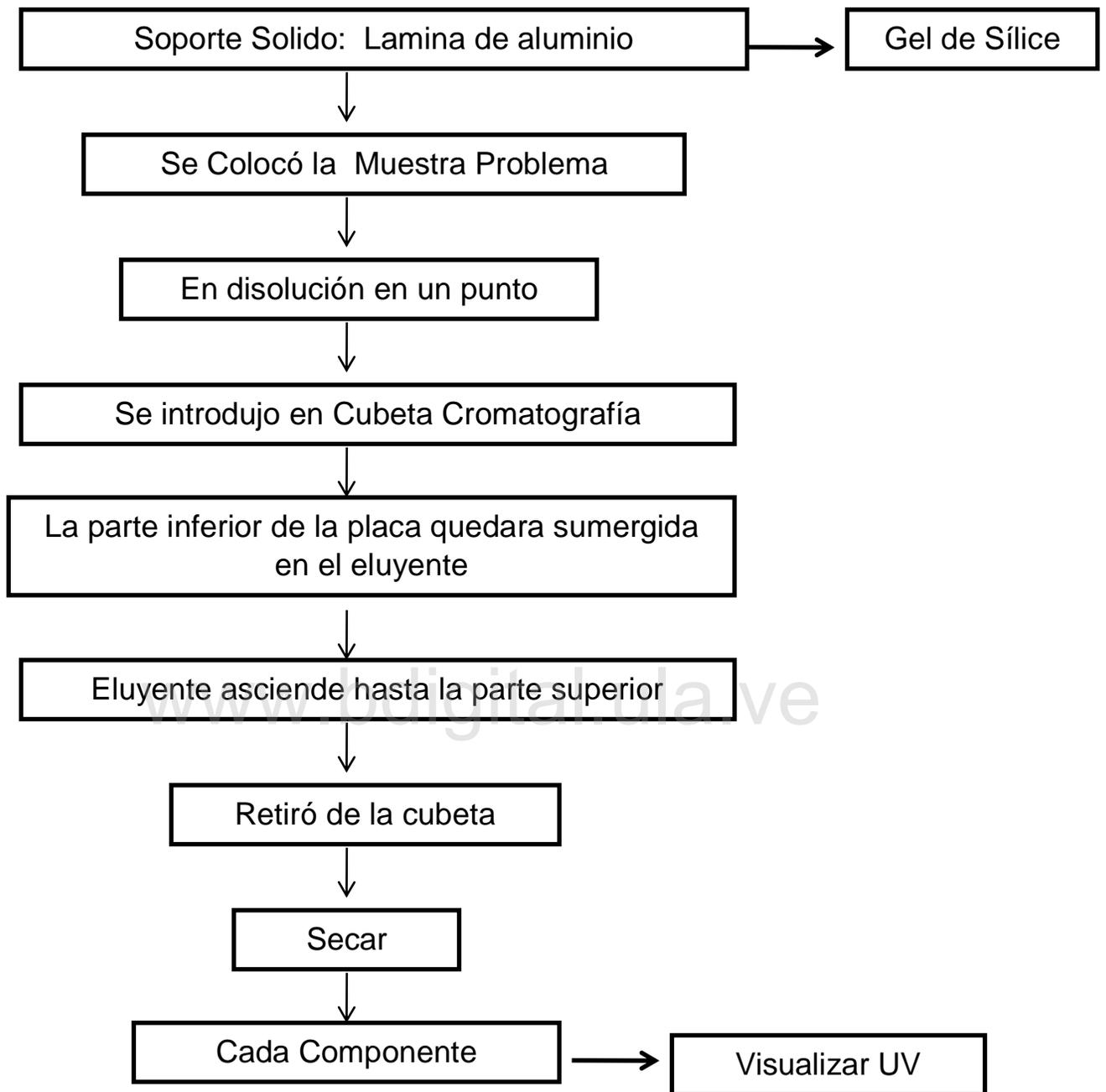


Figura 7. Cromatografía de capa fina.

## **Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de acetona de la planta *Lepechinia conferta*.**

La actividad antibacteriana se realizó por el método de Kirby Bauer en pozo con agar. Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Investigaciones de Bioquímica General y el Laboratorio de Actinomicetos Patógenos y del Suelo de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### **Bacterias estudiadas**

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies que pertenecen a las bacterias Gram positivas y tres pertenecientes a las bacterias Gram negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Las Bacterias empleadas para el estudio de la actividad antibacteriana de la planta *L. conferta* fueron:

#### **✓ Cepas Gram positivas:**

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212

#### **✓ Cepas Gram negativas:**

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

## **Preparación de las placas**

En placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose 20 mL de agar Müeller Hinton (HIMEDIA®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

## **Preparación de los pre-inóculos bacterianos**

Se empleó un medio de cultivo Müeller Hinton. Para la determinación de la actividad antibacteriana las cepas fueron repicadas 12 horas antes provenientes del Área de Medios de Cultivos y Esterilización del Laboratorio de preparación de prácticas bacteriológicas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis del Estado Mérida. Posteriormente fueron utilizadas para preparar el pre-inoculo los cuales se incubaron a 37 °C por 18 horas, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano.

## **Preparación de los inóculos bacterianos**

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inoculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de NaCl al 0.85% (5 mL en tubos 13x100 previamente estéril, hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón 0,5 de Mac Farland (Koneman y col., 2005).

## **Inoculación de las placas**

Una vez preparada las placas se inocularon en forma homogénea la superficie de cada una de ellas con los inóculos bacterianos, utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

### **Método de Kirby Bauer en pozos de agar.**

Se hizo el frotis del inóculo sobre cada una de las superficies de los agares selectivos estipulados para éste método. Posteriormente, se hicieron los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de la parte posterior de una pipeta pasteur de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vertieron 25  $\mu$ L de cada uno de los extractos, estándares y blancos por triplicado. Se dejó reposar por 30 minutos. Seguidamente, se incubaron y leyeron las placas de igual forma que el método Kirby Bauer. Ver Figura 7.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

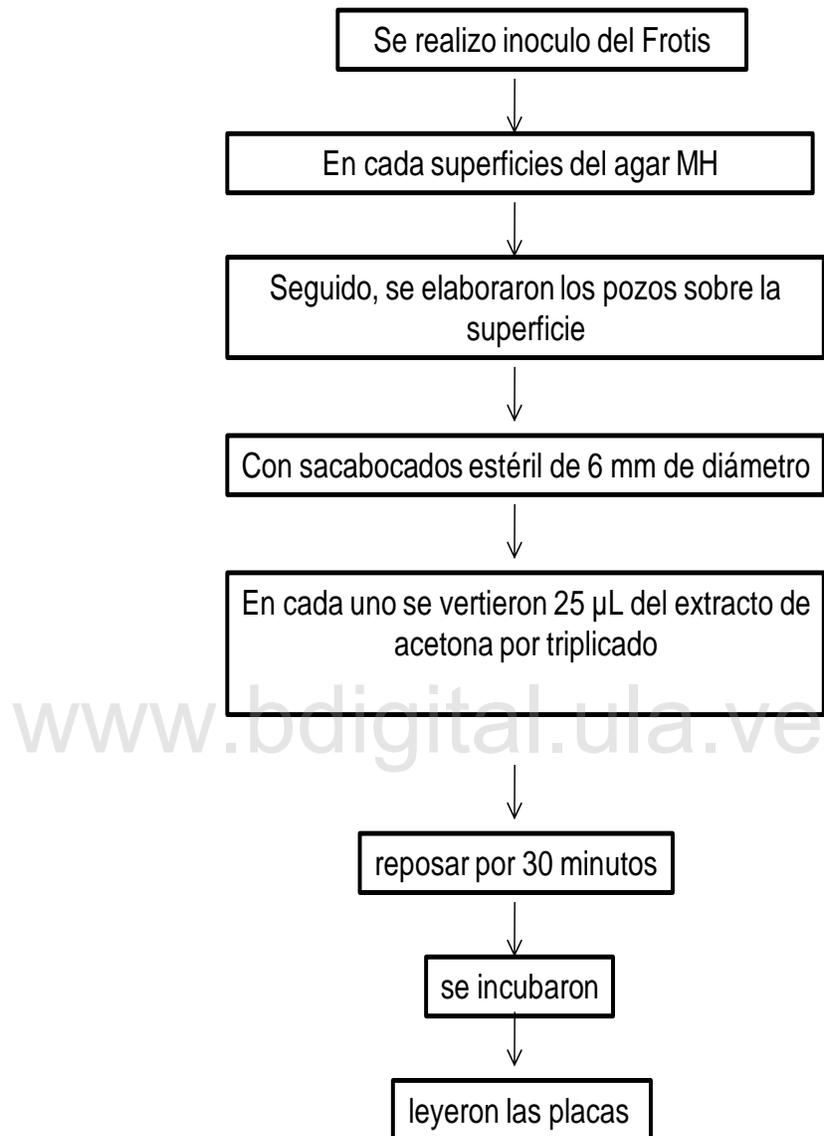


Figura 8. Método de Kirby Bauer en pozos de agar.

Tabla 4: Diluciones empleadas para la determinación de la actividad antibacteriana del aceite y los extractos de la planta *L. conferta*.

Extracto de Acetona	
Solución madre (ppm)	500ppm

### Preincubación e incubación de las placas

Después de haber colocado los pozos en las placas con agar Mueller Hinton estas se dejaron en la nevera a una temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (preincubación) con la finalidad de que los pozos impregnados con el extracto en sus diferentes diluciones difundieran a través del agar para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica.

### Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimetrada. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana), cuando se observó un halo de inhibición alrededor del pozo, y se tomó como un resultado negativo o resistente (sin actividad bacteriana), la ausencia de dicho halo.

El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antibacteriana del extracto de acetona de la especie *L. conferta* se expresó en mm.

## Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques de investigación: Cualitativo y cuantitativo. La metodología cualitativa, es aquella que consiste en la recolección de información basada en la observación de comportamientos naturales y repuestas abiertas para la posterior interpretación de significados; mientras que la metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático (Hurtado, 2010). Por lo tanto, esta investigación tendrá tanto un enfoque cualitativo el cual fue empleado en la realización del tamizaje fitoquímico del extracto de acetona, como un enfoque cuantitativo ya que se realizaron numéricamente los datos recolectados de la unidad de estudio con el fin de medir la actividad antibacteriana del extracto de la especie *L. conferta*.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Determinación de compuestos químicos mediante screening fitoquímico:

Los resultados obtenidos del proceso de screening fitoquímico, realizado al extracto de acetona de la especie *L. conferta*, mostraron la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: positivo la presencia de esteroides, triterpenos y compuestos fenólicos, ver tabla 6.

En relación a los metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides (-) citar figura 9 y 10.

Tabla 5: Metabolitos identificados mediante el Screening Fitoquímico.

Prueba de identificación	Metabolito	Extracto de Acetona
<b>Lieberman Bourchard</b>	Esteroides y Triterpenos	++
<b>Hidróxido de amonio</b>	Cumarinas	-
<b>Reacción de Shinoda</b>	Flavonoides	-
<b>Cloruro ferrico</b>	Compuestos Fenólicos	++
<b>Saponinas</b>	Sólidos solubles	NE
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	*
<b>Wagner</b>	Alcaloides	*
<b>Mayer</b>	Alcaloides	*

(+): Positivo, (++): Abundante, (-): Negativo, (\*): No determinado ya que los solventes no permiten extraer los alcaloides; **NE**: No ensayado.



*Figura 9.* Identificación de esteroides y triterpenos: Prueba de Liebermann Bourchard



*Figura 10.* Prueba de cumarinas.



*Figura 11.* Prueba de flavonoides.



*Figura 12.* Identificación de compuestos fenólicos: Reacción de Cloruro Férrico.

### **Cromatografía de Capa Fina (TLC)**

Se utilizó luz ultravioleta (UV) para observar la placa. Observándose un fluorescente en todas partes excepto donde hubo la presencia de una mancha correspondiente a un compuesto orgánico. Procedimos a determinar para la mancha el valor de  $R_f$  (factor de retención), o la distancia que el compuesto se desplazaba en la placa. Cada compuesto tiene un  $R_f$  característico que depende del disolvente empleado y del tipo de placa de CCF utilizada, pero es independiente del recorrido del disolvente. De esta manera se pudo identificar el compuesto en la mezcla al comparar su  $R_f$  con el de un compuesto conocido.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

Con la TLC detectamos la presencia de sustancias que absorben luz UV lo cual podría corroborar la presencia de los fenoles. Ver figura 12 y 13.



Figura 13. Cámara cromatográfica



Figura 14. Visualización en la lámpara de luz ultravioleta (UV).

### **Actividad antibacteriana del extracto de acetona de la especie *L. conferta***

Para el estudio microbiológico de la actividad antibacteriana de las cepas ATCC ensayadas, se tomó en cuenta para la elección de los grupos controles positivos las recomendaciones que establece el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos por sus siglas en inglés CLSI 2017, la cual determina qué tipo de antibiótico debe usarse con cada especie de las cepas bacterianas, seleccionando así para las dos cepas ATCC Gram positivas: *Enterococcus faecalis* el antibiótico ampicilina de 10 $\mu$ g de tipo  $\beta$ -lactámico donde el halo de inhibición para este control es  $\geq 17$  mm, para *Staphylococcus aureus* el control positivo fue la eritromicina de 15  $\mu$ g antibiótico de tipo macrólido donde el halo de inhibición para este control es  $\geq 23$  mm.

Para las cepas ATCC Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, el control positivo fue piperacilina de 100 µg de tipo β-lactámico, donde el halo de inhibición para estas especies debe ser según el control ≥ a 21mm.

Con respecto a las mediciones y observaciones realizadas en el laboratorio a los halos de inhibición de los controles positivos para las especies ATCC Gram positivas las lecturas de estos fueron las siguientes para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* la lectura fue de 32mm para ambas cepas. Mientras que para las cepas ATCC Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, la lectura fue de 27 mm para las tres especies bacterianas. Medidas que son aceptadas para estas especies ATCC según las recomendaciones del CLSI 2017. Tabla 6.

Tabla 6: Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.

Cepas bacterianas ATCC	Halos de Inhibición en mm					
	Piperacilina 100µg		Eritromicina 15µg		Ampicilina 10µg	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	≥23	32	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	≥17	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	≥21	27	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	≥21	27	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	≥21	27	-	-	-	-

**mm:** milímetros; **CLSI:** Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos, **CE:** (cepas ensayadas) lectura de los halos de inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a las cepas ATCC.

Tabla 7. Resumen de la actividad antibacteriana de los extractos de la especie *L. conferta* frente a bacterias de referencia internacional.

Bacterias	Extracto de acetona
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	(S)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	(S)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	(R)
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	(S)
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 23357	(R)

(S): Sensible (Presento actividad antibacteriana), (R): Resistente (No presentó actividad antibacteriana).

### Discusiones

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

En la actualidad existe la necesidad por parte del hombre de desarrollar nuevas estrategias para combatir las bacterias y su resistencia a los antibacterianos, lo que ha llevado a estudiar nuevas fuentes de antibióticos o sustancias que sirvan para eliminar microorganismos patógenos. Uno de estos recursos es la fitoterapia, que desde la antigüedad ha sido utilizada como fuente inagotable de recursos terapéuticos por médicos que por empirismo o tradición han creado compuestos a base de plantas para curar todo tipo de enfermedades. Esta sabiduría popular ha sido recientemente puesta en el ojo de la ciencia, puesto que científicos alrededor del mundo están empleando variadas técnicas para conocer los secretos terapéuticos que se esconden en las plantas (Rueda y col, 2014). En este sentido, en el presente trabajo se determinó la composición química y se evaluó la actividad antibacteriana del extracto de acetone de la plante *L. conferta* frente a bacterias de referencia internacional.

Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura, en el caso de fenoles los encontramos en las especies *L. meyeri* y *L. hastata* (Bruno y cols., 1991), con los compuestos carnosol (2), isosalvicanol (3) y salvicanol (4). También coinciden los triterpenos los cuales han sido detectados en la especie *L. ralcyna* (Lawrence y cols., 1979), con los compuestos ácido betulínico y ácido ursólico (6).

En relación a la composición química detectada podemos mencionar que Pérez y cols (2014) publicaron un artículo relacionado con el estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth), en el mismo detectaron los terpenoides carnosol y ácido ursólico (aislado como 3-acetil-ursolato de metilo) los cuales fueron obtenidos de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth), a partir de los extractos de hexano y acetona respectivamente. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en el presente estudio en relación a la composición química de los extractos de acetona aun cuando las especies estudiadas en ambas investigaciones sean diferentes pero de igual género. Coincidiendo entre sí especialmente por la presencia de terpenoides y fenoles.

Córdova-Guerrero y cols., 2016 (Argentina) Evaluaron el efecto antibacteriano y antifúngico de un extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana* perteneciente a la familia Lamiaceae. Los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/mL causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Sin embargo, no presentaron efecto significativo sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis* al compararse con los valores del vehículo en las valoraciones de difusión en pozo. Estos resultados tienen correlación con la presente investigación donde también se observó inhibición frente a las bacterias Gram positivas. Sin embargo es importante acotar que el presente estudio determinó actividad antibacteriana también frente a bacterias Gram negativas, lo cual es de interés ya que estas

bacterias producen una variedad de infecciones como resultado de la resistencia a antibióticos clásicos que han desarrollado.

Así mismo Benítez Vivar, (2018) publicó en Ecuador un Trabajo de grado titulado Aislamiento, identificación y actividad antibacteriana de metabolitos secundarios a partir de las especies *Lepechinia paniculata* (Kunth) Epling y *Piper lanceifolium* Kunth. La presente investigación se basó en el estudio fitoquímico de las especies *Lepechinia paniculata* y *Piper lanceifolium*, se obtuvieron extractos de acetato de etilo y metanol a partir de las hojas. Se determinó la actividad antibacteriana mediante concentración mínima inhibitoria (CMI). De *L. paniculata* el extracto de acetato de etilo presentó actividad frente a *Proteus vulgaris* (62,5ug/mL), el extracto de metanol actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (500ug/mL) y el compuesto Ledol actividad frente a *Klebsiella pneumoniae* (125ug/mL) y *Staphylococcus aureus* (500ug/mL). El extracto metanólico de *P. lanceifolium* fue inactivo frente a las cepas utilizadas en el ensayo. En tal sentido, esta investigación se correlaciona con el presente estudio, debido a que el extracto de acetona obtenido de *L. conferta* produjo inhibición en bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*), y además también sobre bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*) lo que resulta de gran interés por la multiresistencia que presentan dichas bacterias a antibióticos clásicos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

Una vez analizados los resultados y planteada la discusión, Los componentes químicos encontrados en el tamizaje fitoquímico fueron: Compuestos fenólicos y esteroides. Estos tienen un amplio uso por sus propiedades. Los esteroides sirven como precursores para una variedad de productos con actividades biológicas específicas (por ejemplo, las hormonas esteroides). Los compuestos fenólicos han demostrado tener un efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares.

El extracto de acetona de la especie *L. conferta*, inhibió el desarrollo de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y Gram negativa como *P. auriginosa* ATCC 27853. Lo que contribuye a ampliar la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos que puedan mejorar el proceso salud enfermedad debido a la multiresistencia de estas bacterias en la sociedad mundial actual.

#### Recomendaciones

Los resultados obtenidos de actividad antibacteriana que presento el extracto de acetona de las partes aéreas (hojas) de la especie *L. conferta*, sugiere la posibilidad de realizar futuros estudios encaminados a determinar su

actividad sobre un espectro bacteriano mayor, así como sobre hongos patógenos.

De igual forma resultaría de interés el estudio sinérgico del extracto de acetona de la especie *L. conferta* y antibióticos comerciales sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas estudiadas en el presente trabajo; así como sobre otros microorganismos (hongos).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## REFERENCIAS

- Alarcón-Aguilera, F. J., Román-Ramos, R., Pérez-Gutierrez, S., Aguilar-Contreras, A., Contreras-Weber, C. C., & Flores-Sáenz, J. L. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2).
- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales: estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas, Venezuela: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinares, I., Llor, N., & Nicolas, E. (2014). Operaciones básicas en el Laboratorio de Química. Retrieved from [http://www.ub.edu/oblq/oblq\\_castellano/index1.html#](http://www.ub.edu/oblq/oblq_castellano/index1.html#)
- Balandrin, M. F., & Klocke, J. A. (1988). Medicinal, Aromatic and Industrial Materials from Plants. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (pp. 3–36). Berlin: Springer - Verlag.
- Benítez Vivar, L. (2018). *Aislamiento, identificación y actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios a partir de las especies de Lepechinia paniculata (Kunth) Epling y Piper lanceifolium Kunth*. Universidad Católica de Loja.
- Brooks, G., Butel, J., Carroll, K., Morse, S., & Mietzner. (2014). *Jawetz, Melnick y Adalberg. Microbiología Médica* (26<sup>a</sup> ed.). McGraw Hill Interamericana.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de Fotoquímica y Farmacognosia*. (S. A. Acribilia, Ed.). Zaragoza, España.
- Bruno, M., Savona, G., Piozzi, F., De La Torre, M. C., Rodríguez, B., & Marlier, M. (1991). Abietane diterpenoids from *Lepechinia meyeri* and *Lepechinia hastata*. *Phytochemistry*, 30(7), 2339–2343.
- Carrión Jara, A. V., & García Gómez, C. R. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. Universidad de Cuenca. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2483>
- Cegarra, J. A., Soriano, P., & Costa, M. (2006). Especies medicinales y tóxicas del género *Lepechinia willd* en Venezuela. *Revista de Fitoterapia*, 6(2), 155–159.
- Ciccio, V., Soto, V., & Poveda, L. (1999). Essential oil of *Lepechinia schiedeana* (Lamiaceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop*, 47(3). Retrieved from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-77441999000300009](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441999000300009)
- Córdova-Guerrero, I., Aragón-Martínez, O., Díaz-Rubio, L., Franco-Cabrera, S., Serafín-Higuera, N., & Isiordia-Espinoza, M. (2016). Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. *Rev. Arg. Microbiol.*, 48(3).
- Cowan, M. (1999). Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.

- <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>
- Delgado, G., Sánchez, E., Hernández, J., Chávez, M. O., Álvarez, L., & Martínez, E. (1992). Abietanoic acid from *Lepechinia caulescens*. *Phytochemistry*, 31(9), 3159–3161.
- Dewick, P. (1991). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 8, 149–170. <https://doi.org/10.1039/NP9910800149>
- Dimayuga, R. F., Keer García, S., Per Halfdan, N., & Christophersen, C. (1991). Traditional medicine of Baja California Sur (México) III. Carnosol: a diterpene antibiotic from *Lepechinia hastata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 31, 43–48.
- Domínguez, Z. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa.
- García, M., & Rangel, R. (2000). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 149–154.
- Hammer, K., Carson, C., & Riley, T. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990.
- Hurtado, J. (2010). *El “acerca de” contenidos de la investigación* (5ª ed.). Caracas, Venezuela: Ediciones Quiero.
- Jonathan, L., Chun-Tao, C., Pezzuto, J., Fong, H., & Fansworth, N. (1989). 7-Omethylhorminone and other cytotoxic diterpenequinones from *Lepechinia butalla*. *J. Natural Products*, 52(3), 571–575.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (2007). *Plant Systematics: A phylogenetic approach* (3ª ed.). <https://doi.org/10.1093/bib/1.2.201>
- Katzung, B. (1996). *Farmacología Básica y Clínica* (6ª ed.). Manual Moderno.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schereckenberger, P., & Winn, W. (2005). *Diagnóstico Microbiológico* (5ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Lawrence, B. M., & Morton, J. K. (1979). Volatile constituents of *Lepechinia calcyna*. *Phytochemistry*, 18, 1887–1889.
- Lock, U. (1994). *Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales*. Lima, Perú: Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú.
- López, N. (2010). Obtención y aplicación de extractos naturales. *Revista Del Centro Nacional de Tecnología Y Seguridad Alimentaria*. Retrieved from [https://www.ctnc.es/recursos/publico/Ponencias CEIDEA/100210Murcia\\_CNTA.pdf](https://www.ctnc.es/recursos/publico/Ponencias CEIDEA/100210Murcia_CNTA.pdf)
- Malbrán, C. (2012). Métodos de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2–14.
- Manrique, E., & Mosquera, O. (1997). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de Espeletia murilloi*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Mantilla, J., & Sanabria, A. (1985). Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 4(2), 25–33.

<https://doi.org/1909-6356>

- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica* (2ª ed.). Caracas, Venezuela: Editorial Torino.
- Miranda, M., & Cuellar, A. (2000). *Manual de prácticas de laboratorio: farmacognosia y productos naturales*. Habana, Cuba: Universidad de La Habana.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica* (6ª ed.). Barcelona, España: Elsevier.
- Pérez, A., Vivas, K., Rojas, L., Usubillaga, A., & Chataing, B. (2014). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Lepechinia bullata* (Kunth) Epling. *Revista de La Facultad de Farmacia de La Universidad de Los Andes*, 56(1), 40–45.
- Picazo, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- Primo, V., Rovera, S., Zanón, M., Oliva, M., Demo, J., & Daghero, L. (2001). Determinación de la actividad antibacteriana y antiviral del aceite esencial de *Minthostachys verticillata* (Griseb) Epling. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Ríos, N., Márquez, R., Mendoza, X., Rojas-Fermín, L., Velasco, J., Díaz, T., ... Meléndez, P. (2015). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hyptissuaveolens* L. Poit. (Lamiaceae) de los Llanos Venezolanos. *Revista Peruana de Biología*, 22(1).
- Rueda M, Bustamante J y Gomez P (2014). Antibioticos a partir de Productos Naturales, *Revista Latinoamericana de Química*, pp: 12-18.
- Ruíz, A., & Guillén, S. (2005). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* (2ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Saavedra, K., & Gómez, J. (2011). Usos medicinales de la Salvia (*Salvia officinalis* L.). Retrieved February 20, 2019, from [http://www.tlahui.com/medic/medic32/salvia\\_officinalis.htm](http://www.tlahui.com/medic/medic32/salvia_officinalis.htm)
- Seija, V. (2006). *Etiopatología Microbiológica* (2ª ed.). WB Saunders.
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny.
- Takeoka, G. R., Guenther, M., Smith, S. L., & Jennings, W. (1986). Changes in Aroma Concentrates during storage. In *Biogeneration of Aromas*. Washington, USA: Croteaur, R.
- Tamayo, R., Verdecia, A., & Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Revista Médica Multimed*, 15(3).
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (9ª ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Tyler, V., Bradt, L., & Robbers, J. (1988). *Pharmacognosy* (9ª ed.).
- Urbina, F., & Villamizar, D. (2012). *Análisis del aceite esencial de la especie Piper eriopodon y determinación de su actividad antimicroniana*. Universidad de Los Andes.
- Velásquez, D. (1997). Clave para los géneros de Lamiaceae en Venezuela. *Acta Botánica Venezolánica*, 20(1).

Voigt, R., & Bornschein, M. (1982). *Tratado de Tecnología Farmacéutica*.  
España: Acribia.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)