UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
"Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro"

SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Anethum graveolens* Y PIPERACILINA CONTRA CEPAS BACTERIANAS

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:
Gabriel Domínguez
C.I: V-25.631.448
Orliana Ramírez
C.I: V-23.442.874
Tutor (a):
Prof (a). Johanna Hernández

Mérida, noviembre 2022

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

A la memoria de nuestro querido profesor Luis Rojas, quien en vida fue una inspiración para nosotros y un ejemplo de excelencia y dedicación a la Universidad de Los Andes, especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis; sin él este trabajo no hubiera sido posible, sus enseñanzas nos trascendieron y siempre estarán presentes en nuestras vidas.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTOS

En este punto, solo nos queda decir “Gracias de corazón”.

Primeramente, a Dios todopoderoso por darnos la vida, de su sabiduría y por darnos la oportunidad de estar aquí cumpliendo un sueño y una meta.

A nuestros padres, quienes a lo largo de nuestras vidas han velado por nuestro bienestar, han sido un apoyo incondicional en todo nuestro proceso académico y esperan con tantas ansias como nosotros de ver este sueño cumplido.

A nuestra tutora Johanna, por su paciencia y dedicación, por ser una guía en la realización de este trabajo y por ser más que una profesora ser una amiga para nosotros.

www.bdigital.ula.ve

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, y a los profesores Ysbelia Obregón, Yndra Cordero, Rosa Aparicio, y Luis Rojas (QEPD) quienes nos permitieron la realización de este proyecto, nos llenaron de conocimiento y palabras hermosas que siempre recordaremos.

A nuestros amigos y compañeros de carrera, que día a día nos acompañaron con tardes y noches de estudio, que estuvieron allí para celebrar nuestras victorias y consolarnos en esos días no tan buenos.

A María, Miguel, Geoveslit y Andrés, quienes han formado parte importante de nuestras vidas y a lo largo de nuestro paso por la facultad, el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

contar con ustedes hizo que la travesía a nuestra meta fuera una experiencia divertida y llena de momentos felices para recordar.

A Samuel, Joaquín, Carlos, Yesica y Milagros, quienes son esa familia que siempre han estado para nosotros en esos momentos importantes, y que han sido uno de los más grandes apoyos en todo este proceso.

A nuestro grupo de Bacterio, Mary Carmen, Yessica, Zully, Abigail, Yenliver y Annelsy, quienes estuvimos luchando hasta el final para llegar a nuestra meta, no se hubiera logrado sin ustedes.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INDICE DE TABLAS……	x
INDICE DE FIGURAS……..	xi
RESUMEN……..	xiii
INTRODUCCIÓN……...	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA……	3
Planteamiento del Problema……	3
Justificación de la Investigación……..	6
Objetivos de la Investigación……...	7
Objetivo General……..	7
Objetivos Específicos……..	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación……	7
Alcances de la Investigación……	7
Limitaciones de la Investigación……...	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO…….	9
Trabajos Previos……	9
Antecedentes Históricos……..	13
Bases Teóricas……..	14
Interacciones farmacológicas……...	14
Sinergismo……....	15
Actividad biológica de los fitoquímicos……...	16
Metabolitos secundarios……	17
Extractos……..	22
Métodos para la obtención del extracto……..	23
Tamizaje fitoquímico……..	24
Pruebas de identificación……..	25

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

Familia de las Umbelíferas (Apiaceae)…… 28

Aspectos botánicos……... 28

Distribución geográfica……. 29

Usos farmacológicos……. 29

Composición química…… 29

Generalidades del género *Anethum*…….. 30

Generalidades del *Anethum graveolens*……... 30

Características botánicas……. 30

Taxonomía…….. 32

Composición química…… 32

Actividad biológica y usos tradicionales…… 34

Bacterias……. 34

Pared celular de las bacterias grampositivas…… 35

Pared celular de las bacterias gramnegativas…….. 36

Escherichia coli……... 37

Pseudomonas aeruginosa……... 37

Klebsiella pneumoniae…….. 37

Staphylococcus aureus…… 38

Enterococcus faecalis……... 39

Antibióticos…… 39

Clasificación de los antibióticos…….. 40

Según su aspecto de actividad……... 40

Según su efecto antimicrobiano…….. 40

Según su mecanismo de acción……. 40

Según su estructura química …….. 41

Clasificacion de los antibióticos ß-Lactámicos…. 44

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

Resistencia bacteriana…… 46

Formas de resistencia…….. 46

Mecanismos de resistencia bacteriana…….. 47

Métodos para determinar la actividad antibacteriana…….. 48

Definición operacional de términos…… 51

Operacionalización de las variables……... 54

Hipótesis…… 57

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO……. 58

Tipo de Investigación…… 58

Diseño de Investigación……... 58

Población y Muestra……. 59

Unidad de Investigación……. 59

Selección del Tamaño de la Muestra……. 59

Sistema de Variables…… 59

Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos……. 59

Procedimiento de la investigación ……. 60

Recolección de la especie *Anethum graveolens*…… 60

Obtención de los extractos de hexano y etanol de *Anethum graveolens* por extracción por reflujo en caliente.. 61

Concentración del extracto con la utilización de rotavapor.. 62

Determinación del perfil fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens*…… 64

Determinación de la actividad antibacteriana y sinergismo por el método de difusión en disco en distintas cepas bacterianas…… 67

Diseño de Análisis……. 68

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUCIONES…….. 70

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

Resultados…… 70

Discusiones…….. 82

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES… 85

Conclusiones…… 85

Recomendaciones……... 87

BIBLIOHEMEROGRAFÍA……..... 88

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág.
1	Taxonomía del *Anethum graveolens*……	32
2	Operacionalización de la Variable Dependiente Sinergismo antibacteriano…….	55
3	Operacionalización de la Variable Independiente Composición química de los extractos de *Anethum graveolens*……..	56
4	Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento……	70
5	Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens*……	72
6	Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens*. Controles vs Extractos……..	73
7	Resultados de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana y la combinación del extracto de etanol del *Anethum graveolens* con la Piperacilina expresada en milímetros (mm)……..	81

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº Figuras		Pág.
1	Estructura del Isopreno……	19
2	Estructura del L (+) limoneno……	19
3	Estructuras de flavonoides……	20
4	Estructura general de las cumarinas……	21
5	Estructura de glicósidos……..	21
6	Eneldo (*Anethum graveolens*)……	31
7	Características botánicas del *Anethum graveolens*…...	32
8	Estructuras de la composición química del eneldo……	33
9	Proceso de triturado de la planta Eneldo (hojas y flores)…….	61
10	Extracción por reflujo en caliente …….	62
11	Filtrado de los extractos……..	62
12	Concentración de los extractos mediante rotavapor (IKA RV10 digital)…….	63
13	Extractos de Hexano y Etanol……	63
14	Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*……...	78
15	Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Klebsiella pneumoniae*……	79
16	Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Escherichia coli*……..	79
17	Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*……	80

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

18	Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Enterococcus faecalis*……..	80

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
"Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro"
LINEA DE INVESTIGACIÓN: Productos Naturales
UNIDAD CURRICULAR TRABAJO DE GRADO II

SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Anethum graveolens* Y PIPERACILINA CONTRA CEPAS BACTERIANAS

Autores: Gabriel Domínguez
Orliana Ramírez
Tutor (a): Prof (a). Johanna Hernández

RESUMEN

La aparición de microorganismos resistentes y el difícil acceso a la diversidad de antibióticos aumenta la necesidad de investigar nuevas alternativas naturales para la elaboración de nuevos fármacos en el tratamiento de infecciones bacterianas. *Anethum graveolens* conocido popularmente como eneldo, es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Umbelíferas (*Apiaceae*). La piperacilina es un antibiótico *β*-lactámico, que actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana. El sinergismo antibacteriano es la acción combinada y simultanea entre dos o más fármacos (agentes antibióticos) que producen un efecto antibacteriano mayor que la suma de los efectos de los agentes individuales. Este estudio tiene como objetivo confirmar la relación causa-efecto del sinergismo antibacteriano del extracto de *Anethum graveolens* y piperacilina contra algunas cepas bacterianas. El tipo de investigación es confirmatoria, por lo que muestra una relación causa-efecto. El diseño de este estudio es mixto, transversal y bivariable. Se determinaron los metabolitos secundarios de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens* a través de tamizaje fitoquímico. El método empleado para la determinación de la actividad antibacteriana y el sinergismo fue el de difusión en disco (Kirby-Bauer). En los resultados se evidenció que la combinación del extracto de etanol del *Anethum graveolens* y Piperacilina presentó un sinergismo infraaditivo en *Staphylococcus aureus y Enterocuccus faecalis*, así mismo se demostró que en las cepas gramnegativas estudiadas no hubo ningún cambio que favoreciera o disminuyera la actividad antibacteriana.

Palabras clave: *Anethum graveolens,* piperacilina, sinergismo, actividad antibacteriana, extractos, cepas gramnegativas, cepas grampositivas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

El extracto de distintas plantas aromáticas y medicinales han sido utilizados para una diversidad de propósitos por miles de años dada a su actividad antibacteriana, siendo incluidos en procesos de conservación de alimentos, farmacológicos y tratamientos medicinales naturales, gracias a esto representan una alternativa en la salud. *Anethum graveolens* es una planta que pertenece a la familia Umbelliferae, originaria en el Mediterráneo y Asia occidental. El nombre genérico *Anethum* es derivado de la palabra griega *anethon* y el nombre común eneldo proviene de la palabra nórdica *dylla o dilla,* que probablemente significa calmar (Esmail y Snafi, 2014).

Por otra parte, los antibióticos son sustancias naturales producidas por microorganismos (hongos y bacterias). Pueden ser sintéticas o semi-sintéticas con capacidad de matar o impedir el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente, se aplica a aquellos fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de ahí que se les conoce como antibacterianos (Organización Panamericana de la Salud, 2022). La Piperacilina es un antibiótico betalactámico y comúnmente es administrado en forma conjunta a un inhibidor betalactamasa que es utilizado para el tratamiento de infecciones provenientes de gérmenes gramnegativos, grampositivos y anaeróbicos, semejante al de otras penicilinas (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2021).

www.bdigital.ula.ve

Asimismo, se entiende por interacción farmacológica la modificación del efecto de un fármaco causada por la administración simultánea de otro fármaco, plantas medicinales, alimentos o agentes ambientales, entre ellos encontramos el sinergismo, que se puede describir como la acción combinada y simultanea entre dos o más fármacos que producen un efecto

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

que es mayor que la suma de los efectos de los agentes individuales. (Flores, Ochoa, López, Trejo y Morelos, 2016).

La importancia de esta investigación se centra en el hecho que en los últimos años se ha venido observando la existencia de nuevos agentes patógenos que han presentado resistencia a muchos fármacos, creando un problema de salud pública por el poco acceso a la diversidad de antibióticos, por ende se crea una necesidad en la que se centra la comunidad científica para la búsqueda de nuevas soluciones a esta problemática, razón por la cual el sinergismo es cada vez más nombrado como la nueva alternativa para la elaboración de nuevos fármacos en el tratamiento de infecciones bacterianas. El objetivo general de esta investigación es confirmar la relación causa-efecto del sinergismo antibacteriano de los extractos de *Anethum graveolens* y Piperacilina contra algunas cepas bacterianas.

www.bdigital.ula.ve

Esta investigación está estructurada por cinco capítulos. El primero titulado El Problema, que comprende: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos, Alcances y Limitaciones. El segundo capítulo, titulado Marco Teórico está conformado por los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El tercer capítulo, titulado Marco Metodológico esta ordenado con los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Diseño de Análisis, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimiento de la Investigación y Diseño de Análisis. El cuarto capítulo titulado, Resultados y Discusiones. Y el último capítulo titulado, Conclusiones y Recomendaciones.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El efecto sinérgico se puede describir como la acción combinada y simultánea entre dos o más fármacos que producen un efecto que es mayor que la suma de los efectos de los agentes individuales (Flores y cols. 2016). Al combinar fármacos se puede obtener cualquiera de los casos de sinergismo, es decir, aditivo, supraaditivo o infraaditivo. El aditivo se refiere a que el efecto alcanzado con la combinaciónes igual a la suma de los efectos de los fármacos cuando se administran por separado; el supraaditivo es aquel donde el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los fármacos en administración individual; el infraaditivo es cuando la combinación presenta un efecto menor al observado con la administración individual de los fármacos (Díaz, Galván, López y Carrillo. 2008).

www.bdigital.uta.ve

El extracto de distintas plantas aromáticas y medicinales han sido utilizados para una diversidad de propósitos por miles de años, dada a su actividad antibacteriana, siendo incluidos en procesos de conservación de alimentos, procesos farmacológicos y tratamientos medicinales naturales, gracias a esto representan una alternativa en la salud.

El *Anethum graveolens,* pertenece a la familia Umbelliferae, se originó en el Mediterráneo y Asia occidental. El nombre genérico *Anethum* es derivado de la palabra griega *anethon* y el nombre común eneldo proviene de la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

palabra nórdica *dylla o dilla* que probablemente significa calmar (Esmail y Snafi, 2014). Es una planta con muchas utilidades a nivel mundial, desde el nivel culinario hasta tratamientos terapéuticos y usos medicinales. Desde hace algunos años se ha comenzado a estudiar las características y los posibles usos del extracto derivado de esta planta, comprobándose de esta manera su importante actividad antioxidante, antibacteriana, antifúngica, insecticida, anticancerosa y anti-hipercolesterolémica (Esmail y Snafi, 2014).

La Piperacilina es una penicilina semi-sintética de amplio espectro que ejerce su actividad bactericida mediante la inhibición de la síntesis de la pared celular y de los septos. Comúnmente es administrado conjunto a un inhibidor de beta-lactamasas, que amplía el espectro del antibiótico de forma que incluye numerosas bacterias productoras de beta-lactamasas que han adquirido resistencia a Piperacilina sola (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2021).

www.bdigital.ula.ve

Dados los efectos antibacterianos similares que existen tanto en el extracto de *Anethum graveolens* como en la Piperacilina, se pueden utilizar juntos con el fin de hacer frente ante algunas bacterias gramnegativas (*Klepsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*) y bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus y Enterocuccus faecalis*) que anteriormente hayan presentado resistencia a múltiples fármacos.

Así pues, ante la existencia de nuevos agentes patógenos que han presentado resistencia a muchos fármacos, creando un problema de salud pública por el poco acceso a la diversidad de antibióticos, por ende, se crea una necesidad en la que se centra la comunidad científica para la búsqueda de nuevas soluciones a esta problemática.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Los siguientes autores describen la situación actual del problema:

Bairán, Chávez, Romero y Torres (2022) nos reseñan que los antibióticos a lo largo del tiempo han representado uno de los más grandes avances en la medicina, debido a que estos fármacos han servido para el tratamiento de las diversas enfermedades infecciosas; sin embargo, estos se comenzaron a utilizar de una manera desmedida al grado de generar que diversos microorganismos se volvieran resistentes ante la presencia de estos agentes. Este fenómeno es lo que llamamos resistencia bacteriana, y a pesar de ser un proceso natural, se ha acelerado por el uso y consumo inadecuado de los antibióticos, por lo que en los últimos años la resistencia bacteriana se ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública mundial.

Chahal, Monika, Kumar, Bhardwaj y Kaur (2017) nos reseñan que la revisión de la literatura sobre el eneldo muestra que el *Anethum graveolens* es una planta con una amplia gama de compuestos biológicamente activos, los cuales poseen un amplio espectro de actividades biológicas tales como antimicrobiana, insecticida, antioxidante, antiinflamatoria, antihiperlipedémica, diurética, etc. Esta planta representa una gran promesa para el desarrollo de nuevos fármacos para tratar diversas enfermedades como resultado de su eficacia y seguridad.

www.bdigital.ula.ve

Por otro lado, Mustafa (2018) nos refiere que actualmente, la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos como las plantas medicinales se ha visto obligada por el aumento de la resistencia a los antibióticos en los últimos años. Una de las plantas medicinales es el eneldo que tiene una larga historia de cultivo, uso como hierba culinaria y medicinal. El extracto de eneldo presenta actividades antibacterianas que ayudan a combatir bacterias que presentan resistencia a antibióticos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Después de lo anteriormente expuesto se redacta el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación causa-efecto del sinergismo antibacteriano de los extractos de *Anethum graveolens* y Piperacilina contra cepas gramnegativas y grampositivas?

Justificación de la Investigación

La investigación realizada está centrada en el hecho que en los últimos años se ha venido observando la existencia de nuevos agentes patógenos que han presentado resistencia a muchos fármacos, creando un problema de salud pública por el poco acceso a la diversidad de antibióticos, así como también por el uso irracional e inadecuado de los mismos, por ende se crea una necesidad en la que se centra la comunidad científica para la búsqueda de nuevas soluciones o alternativas a esta problemática, razón por la cual el sinergismo es cada vez más nombrado como la nueva alternativa para la elaboración de nuevos fármacos en el tratamiento de infecciones bacterianas (Guevara, Sahai y Tedesco, 2015).

www.bdigital.ula.ve

El extracto de *Anethum graveolens* representa una potencialidad a la hora de combatir microorganismos ya que este personifica una alternativa natural en la salud, especialmente para combatir el desabastecimiento y poca accesibilidad de medicamentos que presenta Venezuela en la actualidad. Nos propusimos investigar utilizando como componentes del sinergismo el extracto de *A. graveolens* y un antibiótico como la Piperacilina, ya que ambos tienen una similitud en cuanto a su acción biológica, debido a que estos poseen una actividad antibacteriana importante en cuanto a cepas grampositivas y gramnegativas, por lo tanto, se espera que al combinarlos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

se obtenga un efecto mayor que al ser administrados en forma individual (Esmail y Snafi, 2014; Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2021).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar el sinergismo antibacteriano del extracto de *Anethum graveolens* y Piperacilina contra cepas gramnegativas y grampositivas.

Objetivos Específicos

- Preparar los extractos de hexano y etanol de las partes aéreas (hojasy flores) de *Anethum graveolens* mediante la técnica de reflujo.
- Determinar cualitativamente la presencia de algunos metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos por tamizaje fitoquímico.
- Evaluar el efecto sinérgico antibacteriano del extracto de etanol de *Anethum graveolens* y Piperacilina contra cepas gramnegativas y grampositivas.

www.bdigital.ula.ve

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances

Conocer los componentes presentes en los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores del *Anethum graveolens*, la cual representa el primer estudio de los compuestos químicos de esta especie en el estado Mérida, Venezuela. Además, de determinar la actividad antibacteriana y sinergismo

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

en combinación con la Piperacilina, esto con la finalidad de promover alternativas terapéuticas basadas en productos naturales. Asimismo, aportar nuevos conocimientos que ayuden a la comunidad científica en futuras investigaciones.

Limitaciones

El desarrollo de esta investigación tuvo como limitante la difícil adquisición del antibiótico (Piperacilina), ya que actualmente en Venezuela se presenta una escasez de medicamentos, aunado a ello los elevados costos que estos presentan dificultan su obtención, por otra parte, el fallo constante en los servicios básicos como la falta de electricidad, agua, gas y transporte público presentaron limitaciones durante el proceso de investigación.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Silva en el 2022 realizó un trabajo de investigación titulado “Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir del eneldo (*Anethum graveolens*) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante”. Su objetivo fue optimizar el proceso de extracción hidroalcohólica a partir del eneldo (*Anethum graveolens*) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante. Se utilizó un proceso de extracción hidroalcohólica, mediante un proceso de maceración, eliminando los residuos a partir de una bomba al vacio. Se determinó el tamizaje fitoquímico mediante pruebas de precipitación y coloración, finalmente se realizó la determinacion de antioxidantes y la determinación del contenido de polifenoles. En los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico realizado se detectaron metabolitos secundarios entre ellos compuestos grasos, triterpenos/esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, mucílagos y principios amargos. Para cuantificar el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de las diferentes corridas experimentales se utilizaron los ensayos de Folin Ciacalteu y Frap respectivamente. En los valores experimentales se obtuvieron en polifenoles totales (12,9812 mg GAE/g) y actividad antioxidante (423. 998 µmolFe2+/g). Este trabajo guarda relación con nuestra investigación debido a que se demuestra la variedad de compuestos químicos que presenta la especie *Anethum graveolens*.

www.bdigital.ula.ve

Mustafa (2018) publicó un trabajo titulado: “Aislamiento e identificación de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Burkholderia mallei y su susceptibilidad a extractos de *Anethum graveolens*". El objetivo fue: Evaluar el aislamiento e identificación de *Burkholderia mallei* y su susceptibilidad a extractos de *Anethum graveolens*. Los procedimientos que se realizaron fueron: sistema VITEK 2 Compact y la técnica de PCR para la identificación de *Burkholderia mallei* (bacilo gramnegativo). Para el test de susceptibilidad se manejó el método de difusión en disco Kirby-Bauer, utilizando diez antibióticos (amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina, amoxicilina-ácido clavulánico, imipenem, ceftazidima y norfloxacina), ahora para el estudio del efecto antibacteriano del extracto de *Anethum graveolens* se utilizó el método de dilución en caldo. Los resultados fueron: *Burkholderia mallei* aislado era absolutamente resistente a la norfloxacina y 100 % sensible al imipenem y la ceftazidima, se estudió la actividad antibacteriana de extractos acuosos y alcohólicos de *Anethum graveolens* contra *B. mallei*. Los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante el uso del método de dilución del caldo revelaron que el extracto alcohólico y el extracto acuoso exhibían inhibición del crecimiento de *B. mallei* y la CMI era de 0,8 y 1 mg/mL, respectivamente. Este trabajo guarda relación con nuestra investigación, ya que en este estudio se demostró la actividad antibacteriana que poseen los extractos de *Anethum graveolens.*

www.bdigital.ula.ve

Bezalwar y Charde realizaron un trabajo de investigación en el año 2019 titulado "Estudio sobre la acción sinérgica de extractos de semillas de *Coriandrum sativum* sobre antibióticos contra *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. El objetivo de este estudio fue evaluar el sinergismo en extractos de semillas de *Coriandrum sativum* combinados con antibióticos para tratar *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente. Se recolectaron asépticamente diferentes muestras clínicas como orina, pus, sangre y esputo; de diferentes patologías, para finalmente aislar, identificar y analizar

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

su patrón de resistencia a 22 antibióticos. Se utilizaron los 5 aislamientos que presentaron más resistencia a los antibióticos expuestos (cefotaxime, doriperem, polimixina, azlocilina, gentamicina, levofloxacina, Mezlocillin, cefoperazone, ceftazidime). Para el extracto de *Coriandrum sativum* se manejó el método de Soxhlet y proceso de maceración en diferentes disolventes; éter de petróleo, cloroformo, acetona, metanol y agua. En cuanto a la prueba de la actividad sinérgica, se utilizó la combinación de 100µL del extracto junto con 15 mL de agar de alta sensibilidad, luego de la solidificación de estos medios se empleó 100µL del inoculo y se esparcieron por toda la placa, posteriormente se colocaron los discos de antibióticos y finalmente se sometió a incubación a 37°C de 18-24 horas. Resultados obtenidos determinaron que el extracto pudo aumentar la actividad antibacteriana de un total de 8 antibióticos que son; cefotaxime, doriperem, polimixina, azlocilina, levofloxacina, mezlocillin, cefoperazone y ceftazidime. Este trabajo guarda relación con nuestra investigación dado que el *Coriandrum sativum* es una planta perteneciente a la familia de las Umbelíferas (*Apiaceae*), por lo tanto, nos da un indicio de que los extractos de plantas pertenecientes a esta familia pueden dar resultados positivos al combinarse con un antibiótico, aumentando así su poder antibacteriano.

www.bdigital.ula.ve

Calcina y Pacha (2018), publicaron: “Actividad antibacteriana *in vitro* de antibióticos de uso común en combinación con extractos de plantas frente a bacterias patógenas farmacorresistentes”. El objetivo fue: Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de antibióticos de uso común en combinación con extractos de plantas frente a bacterias patógenas farmacorresistentes. El procedimiento fue: El método de maceración, microdilución en caldo, pozo-placa de Kirby Bauer y difusión en disco de Kirby Bauer, los cuales se realizaron mediante la utilización de extractos de ajo, kión, manzanilla y eucalipto, en combinación con vancomicina, gentamicina, penicilina,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

amoxicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina y sulfametoxazol/trimetropim frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Concluyeron: La concentración minina inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos del ajo, kión, manzanilla y eucalipto frente a *Escherichia coli* farmacorresistente fue de 0,032; 0,016; 0,008 y 0,004 mg/mL respectivamente; la CMI para los extractos del ajo, kión, eucalipto y manzanilla frente a cepas de *S. aureus* farmacorresistente fue de 0,008; 0,0005; 0,00025 y 0,00006 mg/mL respectivamente. El extracto metanólico del eucalipto mostró el mejor efecto antibacteriano con un promedio de 26,98 mm frente a *S. aureus* farmacorresistente, seguido del extracto de manzanilla con 24,6 mm. A su vez el extracto de eucalipto mostró un promedio de 8,6 mm de halos de inhibición frente a *E. coli* farmacorresistente. En cuanto a los antibióticos utilizados (sin combinación) sus resultados fueron que la penicilina obtuvo un halo de inhibición de 7 mm, amoxicilina un halo de 7 mm, el cloranfenicol de 28 mm y finalmente el trimetoprim/sulfametoxazol con un halo de 27 mm. En las combinaciones de los extractos con los antibióticos frente a *S. aureus* farmacorresistente, el mejor efecto antibacteriano fue mostrado por la penicilina con el extracto de eucalipto con 29 mm; el cloranfenicol con el extracto de ajo con 34,075 mm; así mismo, el sulfametoxazol/trimetoprim con el extracto de ajo 33,58 mm; la ciprofloxacina con el extracto de eucalipto con 28,5 mm de halos de inhibición. El cloranfenicol en combinación con el extracto de kión mostró la mejor inhibición con 29,23 mm frente *Escherichia coli* farmacorresistente. Este trabajo guarda relación con nuestro estudio en que los autores manejan el sinergismo de extractos de plantas medicinales en conjunto con la utilización de antibióticos frente a bacterias.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antecedentes Históricos

La utilización de plantas para curar las enfermedades es tan vieja como la raza humana. El hombre ha dependido siempre, para su alimentación, del mundo vegetal, así que inevitablemente tuvo que darse cuenta de que después de ingerir determinadas plantas se sentía de otra forma: con lo que también se desarrolló una medicina basada en las plantas. Según los arqueólogos que han estudiado las pinturas rupestres de las cuevas de Lascaux (Francia), las plantas se usaban con fines terapéuticos aun en los años 1800 a.C. El herbario más antiguo, se le conoce con el nombre de *Pen Tsao*, o Gran Herbal, que se encuentra ubicado en China, el cual fue compilado bajo Shen Nung, un emperador que vivió entre el 1000 y 700 a.C. en el que se mencionan más de 350 plantas medicinales (Ryman, 1995).

www.bdigital.ula.ve

Durante la Segunda Guerra Mundial, los extractos fueron utilizados como desinfectantes y antisépticos, para fumigar los pabellones de los hospitales y esterilizar el instrumental quirúrgico. De la misma manera los médicos en tiempos de guerra utilizaban estos extractos para poder evitar la gangrena, curar quemaduras y sanar heridas, en breves espacios de tiempo (Ryman, 1995).

En estos momentos el firme desarrollo tecnológico ayudó no solo una mejor utilización de estos conocimientos, sino también a una mayor comprensión de sus virtudes y posibilidades. Lo que actualmente se busca con esto, es el aprovechamiento de estos productos naturales procurando obtener un mayor efecto con la menor injerencia en su sustentabilidad. Pero también la tecnología actual busca cada vez más especificidad y diversidad de efectos (Bandoni, Retta, Baren y Di Leo Lira, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Los antibióticos han tenido un papel más fuerte en la medicina desde su descubrimiento en 1928 por el joven escocés, Alexander Fleming, la historia dice que investigaba en un laboratorio del hospital Saint Mary de Londres, cómo luchar contra enfermedades infecciosas y, ante todo, cómo eliminar bacterias patógenas, observando que un cultivo de *Staphylococcus aureus* se había lisado al caérsele un moco. Así descubrió el rol antiséptico de la lisozima y su presencia en varios exudados naturales. Como este compuesto no resultó suficientemente activo como agente terapéutico, continuó sus ensayos y así fue como se encontraba en 1928 sembrando esas mismas bacterias en una caja de Petri. Más tarde la placa mostraba, además de las colonias esperables, la presencia de un hongo invasor. Alrededor del hongo. Sospechó que del hongo debía difundir una sustancia inhibitoria. Así fue como se descubrió el primer antibiótico (AB), y se lo nombró Penicilina por el hongo *Penicillium* (Sánchez, 2006).

www.bdigital.ula.ve

Son los trabajos posteriores realizados por Howard Florey y Ernst Chain los que permitirán purificar la penicilina. Su enorme perfil terapéutico solo se pondría en marcha durante la segunda guerra mundial. Fueron las necesidades de combatir las numerosas infecciones generadas por las mutilaciones las que impulsaron a la industria farmacéutica, principalmente en EE. UU y a las instituciones académicas a emprender el estudio de esta sustancia. Se habló del mayor milagro y se salvaron millones de vidas (Sánchez, 2006).

Bases Teóricas

Interacciones farmacológicas

Por interacción farmacológica se entiende la modificación del efecto de un

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

fármaco causada por la administración simultánea de otro fármaco, plantas medicinales, alimentos o agentes ambientales. Las interacciones entre dos medicamentos pueden originar efectos deseados o indeseados, pudiendo dar como resultado lo siguiente: Sinergismo, Dos fármacos en administración conjunta producen un efecto mayor que la suma de cada uno de ellos cuando se administran por separado. Adición o suma, La suma del efecto de cada fármaco administrado por separado es igual al efecto que produce la combinación. Potenciación, un fármaco carece de efecto o éste es demasiado bajo, pero al administrarlo en combinación se incrementa el efecto del otro fármaco. Antagonismo, un medicamento interfiere en la acción de otro provocando una disminución del efecto (Flores, Ochoa, López, Trejo y Morelos, 2016).

Sinergismo

www.bdigital.ula.ve

Según Díaz y cols. (2008), el efecto sinérgico antibacteriano o sinergismo antibacteriano es la acción combinada y simultanea entre dos o más fármacos (agentes antibióticos) que, producen un efecto antibacteriano que es mayor que la suma de los efectos de los agentes individuales. Al combinar fármacos se puede obtener cualquiera de los casos de sinergismo, es decir, aditivo, supraaditivo o infraaditivo. El aditivo se refiere a que el efecto alcanzado con la combinación es igual a la suma de los efectos de los fármacos cuando se administran por separado; el supraaditivo es aquel donde el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los fármacos en administración individual; el infraaditivo es cuando la combinación presenta un efecto menor al observado con la administración individual de los fármacos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Actividad biológica de los fitoquímicos

Se refiere al estudio cualitativo y cuantitativo de todos los metabolitos de un organismo, por ejemplo, una planta o un ser humano. En el caso de una planta se pueden realizar estudios de la composición química durante su desarrollo. Nos da información muy detallada sobre un gran número de compuestos que se encuentran en un organismo en un momento dado al nivel de proteína, el ADN o los compuestos primarios y secundarios. Lo central es que ya no se aíslan unos compuestos individuales, sino que se realiza un análisis más o menos completo de un organismo (Heinrich, 2005).

Muchas clases de plantas contienen fitoquímicos que se caracterizan por ser componentes bioactivos que exhiben propiedades farmacológicas. Algunos fitoquímicos están presentes en alimentos funcionales de vegetales comestibles. Los alimentos funcionales de origen vegetal son componentes usuales de la dieta que además de exhibir propiedades nutritivas poseen efectos terapéuticos asociados a su contenido de fitoquímicos. Los fitoquímicos presentes en alimentos funcionales de origen vegetal son de especial interés en la industria farmacéutica para la obtención de fármacos inocuos y efectivos para el tratamiento de diversas enfermedades. La aplicación racional de componentes bioactivos de plantas comestibles como fármacos demanda un conocimiento profundo de sus propiedades farmacológicas para estimar sus efectos terapéuticos y potencial toxicidad (Drago, López y Sainz, 2006).

www.bdigital.ula.ve

Una amplia variedad de vegetales es altamente apreciada por su potencial terapéutico atribuido al contenido de componentes conocidos como fitoquímicos bioactivos. En la industria farmacéutica las plantas son la materia prima más importante para la obtención de drogas

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

quimioterapéuticas ya que exhiben efectos farmacológicos aplicables para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedades crónico degenerativas como diabetes y cáncer. A fin de obtener principios activos medicinales inocuos y eficaces, se ha intensificado la búsqueda de fitoquímicos de origen vegetal derivados de vegetales considerados como alimentos funcionales (Drago, López y Sainz, 2006).

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son todos esos compuestos que no se forman a partir de principales vías metabólicas de todos los organismos (Stoessl, 1983). Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros. Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo que tiene una serie de desventajas. Su acumulación en las plantas es baja y lenta, ya que está regulada espacial y temporalmente. Es decir, ocurre en células, órganos y tejidos específicos, en fases determinadas del ciclo de vida de la planta, bajo condiciones estaciónales o de estrés (Verpoorte y Alfermann, 2000).

www.bdigital.ula.ve

Estos también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. Se agrupan en cuatro clases principales que son los terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (García y Pérez, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas (García y Pérez, 2009).

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (Figura 1) (C5) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C5 y se llaman monoterpenos (como el L (+) limoneno, ver figura 2); los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (García y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Los esteroides son derivados de triterpenos con una estructura tetracíclica que consta de tres anillos de seis miembros y un anillo de cinco miembros todos fusionados. Las estructuras que presentan un grupo alcohol en los esteroides son conocidas como esteroles (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Farmacológicamente los triterpenoides y esteroides han sido estudiados por su actividad citotóxica, actividad antimicrobiana, anticonceptiva y antiinflamatorios (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

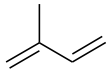


Figura 1. Estructura del Isopreno

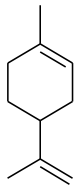


Figura 2. Estructura del L (+) limoneno

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (García y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

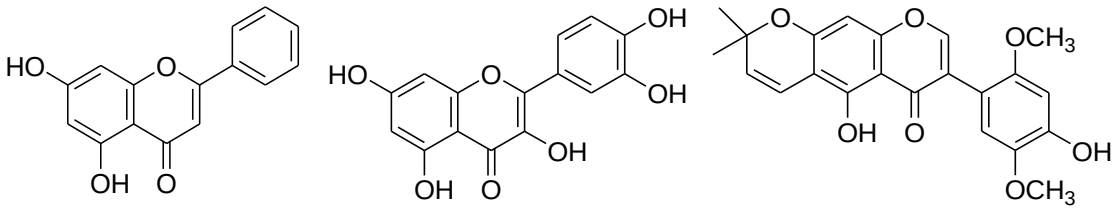
Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides, así como también las cumarinas. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro (García y Pérez, 2009).

Flavonoides

Son compuestos caracterizados por una estructura benzo-*γ*-pirano, compuesto por dos anillos aromáticos unidos por un anillo pirano, dejando un esqueleto de difenilpiranos C6-C3-C6, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes así mismo poseen un poder vasoconstrictor a concentraciones activas bajas sobre el musculo liso vascular (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas como la crisina (1), flavonoles como la quercetina (2) e isoflavonas como la elongatina (3), ver figura 3 (García y Pérez, 2009).



Crisina (1) Quercetina (2) Elongatina (3)

Figura 3. Estructura de Flavonoides

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Taninos

www.bdigital.ula.ve

Son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas (García y Pérez, 2009). Presentan actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y levaduras, además muestras actividades contra parásitos como nematodos gastrointestinales al igual que helmintos, dependiendo de la estructura es útil contra diferentes virus (Sánchez y García, 2022).

Cumarinas

Estructuralmente poseen un anillo aromático unido a un anillo de pirano (figura 4). Se clasifican en simples, furanocumarinas, piranocoumarinas y diversas. Las cumarinas son de gran interés debido a sus propiedades farmacológicas en particular, fisiológica, bacteriostática y la actividad antitumoral (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

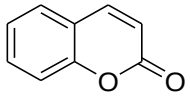
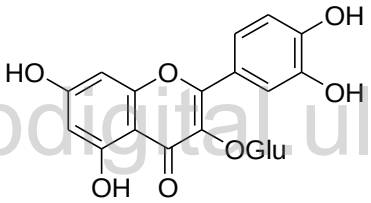


Figura 4. Estructura general de las cumarinas

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022

Glicósidos

Los glicósidos (figura 5) son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos (García y Pérez, 2009).



www.bdigital.ula.ve

Figura 5. Estructura general de glicósidos

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Saponinas

Se encuentran como glicósidos esteroideos o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (García y Pérez, 2009).

Sus propiedades farmacológicas en los seres humanos radican en la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

capacidad expectorante, diurética y reduciendo la fragilidad de las venas. Adicionalmente sirven como detergentes y emulsionantes. Las saponinas esteroidales se utilizan como materia prima para la síntesis de principios activos esteroideos que funcionan como antiinflamatorios, andrógenos, estrógenos, anticonceptivos (Sánchez y García, 2022).

Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (García y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

En la industria farmacéutica los alcaloides han sido importantes debido a las diferentes actividades farmacológicas que presentan como, por ejemplo, reducen la presión sanguínea, estimulan la circulación y la respiración y otros son antitumorales y analgésicos (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Extractos

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

blandos y los crioextractos (Carrión y García, 2010).

Métodos para la Obtención de los Extractos

Extracción Sólido-Líquido

Se denomina a la separación preferencial de uno o más componentes de una mezcla sólida por disolución en un solvente líquido (Guerra, 2005).

Extracción con Disolventes

En el método de extracción con disolventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias contaminadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendios característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles (Martínez, 2003). Los disolventes derivados de petróleo, como éter dietílico, ciclohexano, hexano, acetato de metilo, propanol, etc., son tóxicos al inhalarlo y al contacto con la piel, y dependiendo del tiempo de exposición será la gravedad de los efectos. Los extractos obtenidos con este tipo de disolvente suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor y se recuperan muchos compuestos de tipo aromático. Los restos de disolvente deben separarse a temperatura baja (Ortuño, 2006).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Extracción por Reflujo en Caliente

Es una técnica que se utiliza en los laboratorios experimentales, es empleada para producir el calentamiento de reacciones que tienen lugar a temperaturas más altas que la temperatura ambiente y en las cuales se debe mantener un volumen constante durante toda la reacción. A través de este proceso se impide la perdida de disolvente, y por lo tanto, no se libera éste a la atmósfera. El procedimiento de reflujo inicia con el acoplamiento de un matraz que contenga la reacción a tratar, a una de las bocas del tubo refrigerante del reflujo. Según va produciéndose el calentamiento del matraz, la temperatura también aumenta con lo que se produce la evaporización del disolvente. Dichos vapores ascienden poco a poco por el cuello del matraz, hasta llegar al tubo refrigerante, donde tiene lugar la condensación de éstos, debido a la acción que produce el agua fría que se encuentra circulando por el exterior del tubo, para seguidamente, volver de nuevo al matraz. Esto provoca un reflujo continuado de disolvente, el cual se mantiene constante en la reacción, en cuando a su volumen se refiere (Méndez, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Concentración de los Extractos Mediante Rotavapor

Este procedimiento consiste en evaporar el solvente mediante una combinación de temperatura provista por un baño calefactor y la generación de presión de vacío. Se produce una rotación que aminora el peligro de ebullición y se acelera la evaporación mediante el aumento de la superficie de la solución (Carrión y García, 2010).

Tamizaje Fitoquímico

Permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Palacios, 2013).

Pruebas de Identificación

Estas pruebas comprenden coloración, de precipitación, fluorescencia, microsublimación, cromatografía, que permiten detectar sustancias químicas características de una planta (Palacios, 2013).

Reconocimiento de Alcaloides

www.bdigital.ula.ve

Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos y se encuentran en las plantas superiores de un ácido orgánico. El reconocimiento es basado en la capacidad que tienen los alcaloides de formar precipitados con reactivos como el mercuriyoduro, producto de la combinación de este con el yodo y métales pesados de potasio (de Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff). Estos precipitados formados por la reacción que se plantea suelen ser de un color pardo (Coy, Parra y Cuca, 2014).

Esta reacción tiene su fundamento en que el yoduro de potasio reacciona con cloruro mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico, este es soluble en exceso de iones de yoduro y forma un anión complejo incoloro. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuri amoníaco, que es soluble en exceso de complejo, generando un color

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

amarillo (Coy, Parra y Cuca, 2014)

Reconocimiento de Compuestos fenólicos

Su reconocimiento se efectúa mediante la “prueba del cloruro férrico” es una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado de FeO (OH). La sustancia orgánica se disuelve en agua, metanol o etanol, luego se añade la disolución neutra de cloruro: se forma un complejo coloreado transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol. Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos (Coy, Parra y Cuca, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Reconocimiento de Flavonoides

Son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas verdes. Estos compuestos al igual que los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico (Coy, Parra y Cuca, 2014). La identificación de estos metabolitos secundarios se realiza por medio de las pruebas de Shinoda (Zn/HCl). Su fundamento se basa en la reacción del magnesio en medio ácido, que reduce el flavonoide generando un producto coloreado que va del rojo anaranjado al violeta (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Reconocimiento de Taninos

Son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su estructura es compleja y presentan masas moleculares altas. Su reconocimiento se realiza mediante un ensayo de gelatina-sal, el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

cual consiste en la observación de un precipitado, ya que los taninos tienen la propiedad de reaccionar con las proteínas formando compuestos insolubles (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Reconocimiento de Cumarinas

Las cumarinas presentan fluorescencia a la luz ultravioleta (azul, amarilla, verde, púrpura), lo cual permite su reconocimiento. Para llevar a cabo su detección, se tiene en cuenta el hecho de que son fluorescentes a la luz ultravioleta y para aumentar la intensidad, se tratan previamente con amoniaco (Butrón y Solano, 2008).

Reconocimiento de Saponinas

www.bdigital.ula.ve

Son glucósidos hidrosolubles, con propiedades tenso-activas y hemolíticas. El ensayo de formación de espuma, así como la técnica de hemólisis de eritrocitos constituyen métodos sencillos y rápidos para detectar la presencia de saponinas en un extracto (Mena, Tamargo, Salas, Plaza, Blanco, Otero y Sierra, 2015). La prueba de formación de espuma, se realiza agitando la solución que se obtiene y se debe observar espuma formada, la cual debe ser estable por lo menos 30 minutos (Carvajal, Hata, Sierra, Rueda, 2009).

Reconocimiento de Terpenos y Esteroides

Forman el conjunto más amplio conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. Estos compuestos tienen en común que están formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del isopreno (Coy, Parra y Cuca, 2014). La identificación de estos metabolitos secundarios se realiza con el ensayo de Liebermann-Burchard

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

que consiste en una reacción donde el esterol se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial de esta prueba ocurre la protonación del grupo OH del esterol habiendo una pérdida de agua y obteniéndose el ión carbonio 3,5 colestadieno que constituye la primera parte para la formación de color (Ochoa y Sarmiento, 2018).

Reconocimiento de Quinonas y Antraquinonas

Las 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 (Bermejo, Pereira, Cintra y Morales,2014). Las quinonas tienden a dar colores amarillos, rojos o purpuras, en presencia de ácidos o álcalis concentrados (Parra, Castro y Aponte, 2016).

www.bdigital.ula.ve

Familia de las Umbelíferas (Apiaceae)

Aspectos Botánicos

Agrupa más de 250 géneros y más de 2.500 especies. Una de las características que identifican a esta familia es que son plantas aromáticas, con un olor y sabor anisado que puede variar entre las especies. En general, son plantas herbáceas, arrosetadas, y de hojas alternadas, de lámina finamente dividida y con pecíolo abrazador en la base. Las flores actinomorfas y hermafroditas están dispuestas en umbelas, generalmente compuestas, y poseen un pequeño cáliz de 5 sépalos, una corola de 5 pétalos, 5 estambres alternados con los pétalos, y un ovario ínfero de dos carpelos, que una vez fertilizado origina un fruto seco e indehiscente, característico de la familia, llamado esquizocarpo (Krarup, 1997).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Distribución Geográfica

Se encuentran ampliamente difundidas en el mundo, aunque la mayoría tiene su origen en las zonas templadas del hemisferio norte, por tal motivo estas plantas hortícolas de la familia están adaptadas para crecer con temperaturas más o menos moderadas, con un óptimo entre 15 y 18°C, por lo que se clasifican como hortalizas de estación fría (Krarup, 1997).

Usos Farmacológicos

Entre los usos farmacológicos más comunes de esta familia tenemos: espasmolítico, antibacteriano, bacteriostático, fungicida, digestivo, carminativo, antiséptico, diurético, expectorante, galactógeno y aromatizantes (Fernández, Álvarez, Bobillo, Beato y Santos, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Composición Química

Varias especies de la familia Apiaceae son una excelente fuente de aceites esenciales, que contienen más de 760 componentes químicos diferentes. La composición química varía según la parte de la planta utilizada para la extracción, así como también depende de los diversos métodos de extracción, estados fenológicos de la planta, temporada de cosecha, edad de la planta, naturaleza del suelo y condiciones ambientales. Los fitoquímicos como monoterpenos, ftalidas, terpenoides, los fenilpropanoides (cumarinas y fenilpropenos) y los poliacetilenos son comúnmente los compuestos químicos mayormente encontrados en las plantas de esta familia (Thiviya, Gunawardena, Gamage, Madhujith y Merah, 2022).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Generalidades del género *Anethum*

Es un género de plantas herbáceas anuales o bienales, olorosas, glabras, con los tallos erectos y estriados, fistulosos. Hojas con los pecíolos abrazadores, 3-4 veces pinnatisectas, con los últimos segmentos filiformes. Inflorescencias en umbelas compuestas, sin brácteas ni bractéolas, con numerosos radios. Flores sobre largos pedicelos, con el cáliz sin dientes y la corola con 5 pétalos suborbiculares, amarillos. Fruto en esquizocarpo más o menos ovoide, comprimido lateralmente, glabro, con costillas finas y estrechamente aladas. Carpóforo libre, bipartido en la base. Comprende 2 especies nativas de Europa y Asia. Su nombre procede de la denominación clásica del eneldo, *anethon* (Sánchez, 2010).

El género *Anethum* está compuesto por dos especies (*Anethum sowa* y *Anethum graveolens* L). El eneldo indio o *sowa* es el nombre comercial de *A. sowa*, y la principal diferencia física (entre *A. sowa* y *A. graveolens)* es el color de sus semillas (Moshfekus y Yong, 2021).

www.bdigital.ula.ve

Generalidades del *Anethum graveolens*

Características Botánicas

El *Anethum graveolens* conocido popularmente como eneldo (Figura 6) es una planta herbácea perteneciente a la familia de las Umbelíferas (Apiaceae), del género *Anethum* (Tabla 1). Se tiene mención de ella desde la antigüedad. Es oriunda de la región oriental del mar Mediterráneo, donde hoy abunda. El eneldo es una hierba anual por lo general crece a una altura de 50-150 cm. (Warrier, Nambiar y Ramakutty, 1994).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 6. Eneldo (*Anethum graveolens*)

La raíz de esta planta es axonomorfa, midiendo desde los 7 a los 10 centímetros de largo. El tallo es folioso, con estrías finas de color verde y blanco, de un tamaño aproximado de 45 centímetros. Sus hojas son verdes y finas, muy similares a plumas, se distribuyen en cada nudo con un contorno en forma de rombo, a su vez son mucronadas y pinnatisectas. El eneldo presenta unas flores que carecen de cáliz, poseen pétalos de color amarillo con el ápice curvado hacia adentro, están agrupadas en umbrales de unos 15 a 30 radios desiguales, que producen una fruta madura seca comúnmente llamada esquizocarpos. El fruto es plano, ovalado y de color marrón en el centro y una tonalidad más clara en los bordes del mismo, ellos miden un promedio de 4 a 6 milímetros de ancho por 25 milímetros de largo (Silva, 2022). (Figura 7).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 7. Características botánicas del *Anethum graveolens*

Taxonomía

Tabla 1. *Taxonomía de Anethum graveolens (Eneldo)*

www.bdigital.ula.ve

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Apiales
Familia:	Apiaceae
Subfamilia:	Apioideae
Tribu:	Peucedaneae
Género:	*Anethum*
Especie:	*Anethum graveolens*

(Tomado y modificado de Campaña, y cols., 2015).

Composición Química

Los frutos de *Anethum graveolens* contienen flavonoides derivados del kaempferol (1), ácidos fenólicos (ácido cafeico, clorogénico) (2,3), ácidos

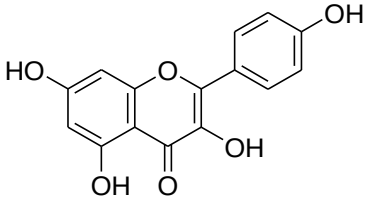
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

grasos (10%-20%), fitoesteroles (β-sitosterol) (4) ver figura 10 (Fernández y cols., 2009). Ver figura 8

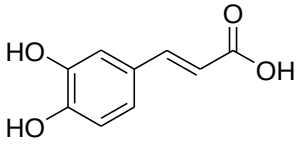
Según Silva (2022), el extracto de etanol del *Anethum graveolens* contiene compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas / benzoquinonas, saponinas, alcaloides y catequinas.

Los monoterpenos son los principales constituyentes del aceite esencial extraído de los frutos de esta planta, de los cuales se encontraron principalmente estos componentes volátiles: 7-*α*-hidroxi manool (24,43 %), carvona (14,28 %), limoneno (13,9 %), epi-*α*-bisabolol (6,81 %), *α*-terpineno (5,44 %) y *α* -felandreno (4,63%), el *p* -cimeno (2,13 %), el sabineno (1,98) y el *α*-pineno (1,43 %) (Ramadan, Abd-Algader, kamali, Ghanem, Farrag, 2013).

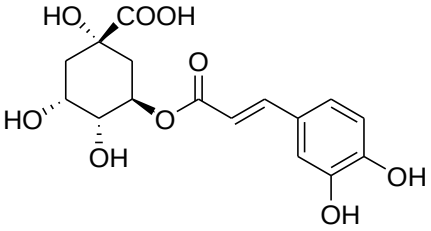
www.bdigital.ula.ve



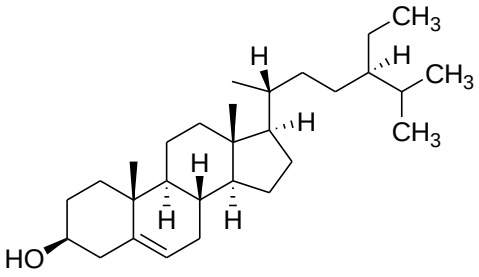
Kaempferol (1)



Ácido cafeico (2)



Ácido clogénico (3)



β-sitosterol (4)

Figura 8. Estructuras de la composición química del Eneldo

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Actividad Biológica y usos tradicionales

Las semillas tienen un fuerte olor picante, por lo tanto, se utiliza como agente aromatizante en la industria alimentaria para ensaladas, salsas, sopas, té, alimentos marinos y especialmente encurtidos (Babri, Khokhar, Mahmood, Mahmud, 2012). Las hojas de eneldo son ricas en minerales como fósforo, potasio y magnesio y se usa en ensaladas y té. Las semillas de eneldo se usan comúnmente para la inflamación de la vejiga, enfermedades hepáticas e insomnio (Kaur y Arora, 2010).

Además, el extracto de eneldo tiene actividad hipolipidémica, podría usarse como agente cardioprotector en la disminución del colesterol en la sangre (Hajhashemi y Abbasi, 2008). También, es usado como un agente antiespasmódico, anticonvulsivo, antiemético y remedio anticramp (en niños) igualmente es recomendado tópicamente como sanador de heridas (Naseri y Heidari, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Bacterias

Son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros, casi siempre del orden de 1 µm de diámetro, y la ausencia de membrana nuclear. El ADN de casi todas las bacterias tiene una forma circular con una longitud aproximada de 1 mm; este es el cromosoma procariótico, la mayor parte de las células procarióticas posee un solo cromosoma. No tienen núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular que debe su resistencia a una capa compuesta de diversas sustancias conocidas como mureína, mucopéptido o peptidoglucano, que es un polímero complejo que consiste de tres partes: una estructura básica,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

compuesta de moléculas alternadas de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilmurámico y un grupo idéntico de enlaces peptídicos cruzados. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamientos. (Brooks,Carroll, Butel, Morse, Mietzner, 2011).

La mayor parte de las bacterias se clasifican como grampositivas o gramnegativas con base en su respuesta al procedimiento de tinción de Gram, que depende de la capacidad de ciertas bacterias (grampositivas) para retener un complejo de cristales de color violeta (un colorante de color violáceo) además de yodo después de un breve lavado con alcohol o acetona. Las bacterias gramnegativas no retienen el complejo de colorante-yodo y se vuelven translúcidas, pero pueden volverse a teñir con safranina (un colorante de color rojo). Así, las bacterias grampositivas adquieren un aspecto violáceo bajo el microscopio, en tanto que las bacterias gramnegativas se ven de color rojo o rosado (Andrade, 2015).

www.bdigital.ula.ve

Pared Celular de las Bacterias Grampositivas

La mayor parte de las paredes celulares de las bacterias grampositivas contienen cantidades considerables de ácidos teicoico y teicurónico, los cuales pueden constituir hasta 50% del peso seco de la pared y 10% del peso seco de la totalidad de la célula; además, algunas paredes de bacterias grampositivas pueden contener moléculas de polisacáridos. El término ácido teicoico abarca la totalidad de la pared celular, membrana o polímeros capsulares que contienen glicerofosfato o residuos de ribitol fosfato. Estos polialcoholes están conectados por enlaces fosfodiéster y por lo común se encuentran unidos con otros carbohidratos y con Dalanina. Como tienen carga negativa de la superficie celular en su conjunto. Hay dos tipos de ácidos teicoico: ácido teicoico de la pared y ácido teicoico de la membrana,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

como estos últimos tienen asociación estrecha con los lípidos, se han denominado ácidos lipoteicoicos. En conjunto con los peptidoglucanos, el ácido teicoico de la pared y el ácido teicoico de la membrana constituyen una red polianiónica o matriz que proporciona funciones relacionadas con la elasticidad, porosidad, fuerza tensil y propiedades electrostáticas de la envoltura (Andrade, 2015).

Pared Celular de las Bacterias Gramnegativas

Las paredes celulares de bacterias gramnegativas contienen tres componentes que se encuentran fuera de la capa de peptidoglucanos: lipoproteínas, membrana externa y lipopolisacáridos. La membrana externa es diferente desde el punto de vista químico de todas las demás membranas biológicas. Es una estructura con una bicapa cuya hoja interna tiene una composición similar a la de la membrana celular. La capacidad de la membrana externa para que excluya moléculas hidrófobas es una característica poco común entre las membranas biológicas y sirve para proteger a la célula de sustancias nocivas, como las sales biliares. Por su naturaleza lipídica, es de esperarse que la membrana externa excluya también a moléculas hidrofílicas. Sin embargo, dicha membrana posee conductos especiales, formados por proteínas denominadas porinas, que permiten la difusión pasiva de compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos y ciertos iones. Las moléculas grandes de antibióticos penetran la membrana externa con relativa lentitud, lo que explica la resistencia relativamente elevada a los antibióticos de las bacterias gramnegativas (Andrade,2015).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Escherichia coli

Son bacilos gramnegativos de 1 a 3 µm de largo por 0,5 µm de ancho, anaerobios facultativos, fermentadores, oxidasa negativa, son móviles por la presencia de flagelos, es relativamente resistente y uno de los microorganismos más estudiados por el ser humano. Es una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, y por ende en las aguas negras, es un organismo ubicuo. Entre las enfermedades más comunes que puede ocasionar esta bacteria se encuentra: Infecciones gastrointestinales, infecciones del tracto urinario y meningitis neonatal (Murray, 2008).

Pseudomonas aeruginosa

www.bdigital.ula.ve

Son bacilos gramnegativos no fermentadores de 1 a 2 µm de largo por 0,3 µm de ancho, pequeños, rectos o ligeramente curvados, que suelen disponerse en parejas, psicrófilos (crecimiento a bajas temperaturas), oxida la de glucosa y de requerimientos nutricionales sencillos. Esta bacteria es común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, y en aguas residuales. Este microorganismo representa una fuente conocida e infecciones intrahospitalarias y pueden producir complicaciones graves. En pacientes inmunocomprometidos es un patógeno oportunista, puede infectar el tracto pulmonar, tracto urinario, tejidos, heridas y también causas otras infecciones en sangre (Murray, 2008).

Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae es un bacilo gramnegativo, no móvil, de la familia *Enterobacteriaceae.* Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella.* Usualmente desarrolla una cápsula

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, y de acuerdo con sus determinantes antigénicos se puede clasificar en 77 serotipos diferentes. La cápsula protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos (Simoons-Smit, Verweij-van y McLaren, 1986). *K. pneumoniae* causa infección del tracto urinario y neumonía en personas sin enfermedades de base, pero la mayoría de las infecciones son adquiridas en el hospital y/o en pacientes con alguna condición debilitante. Es causa además de bacteriemia, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del tracto biliar, peritonitis y meningitis (López y Robledo, 2007).

Staphylococcus aureus

Son cocos grampositivos, que se presentan solos, en pares o en agrupaciones, inmóviles, catalasa positivos, anaerobios facultativos, con presencia de coagulasa, crecen en cloruro de sodio al 10%, mesofílicos (temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20ºC y 45ºC). *Staphylococcus* es un género importante en humanos, produciendo un amplio espectro de enfermedades sistemáticas que pueden poner en riesgo la vida, infecciones de la piel, tejidos blandos, entre otros. Las especies que se asocian con mayor frecuencia a enfermedades en los humanos son: *Staphylococcus aureus* (el miembro más virulento y mejor conocido del género), cuyas colonias son doradas debido a los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, de ahí el nombre de la especie. Causa enfermedad mediante la producción de toxinas o a través de la invasión directa y de la destrucción del tejido. Las manifestaciones clínicas de algunas enfermedades estafilocócicas son casi exclusivamente el resultado de la actividad de la toxina, mientras que otras enfermedades resultan de la proliferación de los microorganismos, dando lugar a la

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

formación de abscesos y a la destrucción tisular, en presencia de un cuerpo extraño es necesario la presencia de un número significativamente menor de estafilococos para producir enfermedad (Murray, 2008).

Enterococcus faecalis

Son cocos grampositivos que se disponen en parejas y cadenas cortas, se clasificaron previamente como estreptococos del grupo D debido a que poseen el antígeno de la pared celular del grupo D, un ácido teicoico con glicerol que se asocia a la membrana citoplasmática. Coloniza en el aparato digestivo de los humanos y los animales. La virulencia está mediada por la capacidad de adherirse al huésped, secretar citolisinas y proteasas que producen una lesión localizada del tejido y resistencia del antibiótico. El hábitat normal de este microorganismo 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, esta bacteria es la principal causante de infecciones del tracto urinario, bacteriemia, infecciones intraabdominal y endocarditis (Murray, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio, los cuales suprimen el crecimiento de otros microorganismos y pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano. El término “antimicrobiano” se aplica a toda sustancia que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de uno o más microorganismos. (Virga y Aguzzi, 2020).

Clasificación de los Antibióticos

Los antibióticos se clasifican según: su espectro de actividad (amplio o reducido) su estructura química, su mecanismo de acción y su efecto antimicrobiano (bactericida o bacteriostático) (Maguiña, Ugarte, Montiel, 2006).

Según su espectro de actividad. Amplio, aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes. Reducido, antibióticos activos sobre un grupo reducido de especies (Jackson y cols., 1998).

www.bdigital.ula.ve

Según su efecto antimicrobiano. Bacteriostáticos, aquéllos que inhiben la multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento y, Bactericidas, los cuales poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica irreversible (Jackson y cols., 1998).

Según su mecanismo de acción. Los hay Inhibidores de la formación de la pared bacteriana afectando la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana; Inhibidores de la síntesis proteica a nivel ribosomal entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la subunidad 30S y los que actúan sobre la subunidad 50S, así los antibióticos que actúan en el mismo nivel no deben asociarse, pues compiten por el sitio de unión y se antagonizan; Inhibidores de la duplicación del ADN,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Inhibidores de la membrana citoplasmática e inhibidores de las vías metabólicas (Brugueras y García,1998).

Según su estructura química

Betalactámicos

Estos antibióticos son bactericidas lentos cuya acción se ejerce en la fase de crecimiento bacteriano e inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Entre ellos podemos encontrar a las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenemos, inhibidores de las betalactamasas y carbapenemes (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

www.bdigital.ula.ve

Aminoglucosidos

Son compuestos que su mecanismo de acción se refleja sobre los ribosomas inhibiendo la síntesis de proteínas, son de acción bactericida rápida y activos contra las bacterias en su fase estacionaria. En este grupo hallamos la amikacina, espectinomicina, estreptomicina, gentamicina, isepamicina, kanamicina, netilmicina y tobramicina (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Lincomicina

Su derivado semisintético más común es la clindamicina. Tiene su mecanismo de acción en los ribosomas e inhibe la síntesis proteica (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cloranfenicol

Es bacterioestático en la mayoría de los gérmenes, pero puede actuar de manera bactericida en algunos casos, como por ejemplo contra *Streptococcus pneumoniae*. Tiene su actividad sobre los ribosomas (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Glucopéptidos

Su uso es exclusivo para bacterias grampositivas, actuando sobre la fase de crecimiento bacteriano. Su representante más utilizado es la vancomicina (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

www.bdigital.ula.ve

Glucopolipéptidos

En este grupo encontramos a la daptomicina, y a los glucopolipéptidos de segunda generación como son dalbavancina, oritavancina y telavancina. Son indicados a adultos para el tratamiento de infecciones de piel y tejidos blandos (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Oxazolidinonas

Su delegado más importante es la linezolida, es bacteriostático, y bactericida en casos de Estreptococos. Utilizado exclusivamente para bacterias grampositivas aerobias. Su acción inhibe la síntesis proteica (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Rifampicina

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de ARN

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

dependiente de ADN bacteriano al inhibir la ARN polimerasa (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Sulfonamidas

Son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro, tanto contra microorganismos grampositivos como gramnegativos. Entre ellos se encuentra el Trimetoprima/sulfametoxazol (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Tetraciclinas

Son bacteriostáticos de amplio espectro, inhiben la síntesis de proteínas bacterianas al unirse al ARN ribosómico. En este grupo de antibióticos podemos encontrar a doxiciclina, tetraciclina y tigeciclina (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

www.bdigital.ula.ve

Fosfomicina

Es un antibiótico que penetra en las bacterias a través de dos sistemas de permeasas e impide la síntesis de la pared bacteriana. Este mecanismo hace que su efecto sea bactericida (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Quinolonas

Son inhibidores de la transcripción y la replicación del ADN bacteriano, sus derivados más conocidos son ciprofloxacina, delafloxacina, levofloxacina moxifloxacina, norfloxacina y ofloxacina (Organización Panamericana de la Salud, 2022).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Clasificación de los Antibióticos ß-Lactámicos

Penicilinas

Antibióticos del grupo de los ß-lactámicos empleados profundamente en el tratamiento de infecciones provocadas por bacterias sensibles. La mayoría de las penicilinas son derivados del ácido 6-aminopenicilánico, difiriendo entre sí según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino, de las varias penicilinas producidas de modo natural, la bencilpenicilina o penicilina G es la única que se usa clínicamente (Mediavilla, García y Flores, 2014).

Las penicilinas actualmente disponibles se pueden dividir en cuatro grandes grupos a partir principalmente a su espectro de actividad: penicilinas naturales (penicilina G, penicilina V, penicilina benzatina), resistentes a penicilinasas (oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilinas, amoxicilina, bacampicilina), penicilinas de espectro ampliado (carbencilina, ticarcilina y piperacilina) (Moreno, 2000).

www.bdigital.ula.ve

Cefalosporinas

Son una clase de antibióticos ß-lactámicos. Junto con las cefamicinas pertenecen a un subgrupo llamado los cefamos. Las cefalosporinas son similares a las penicilinas, pero más estables ante muchas ß-lactamasas bacterianas y, por lo tanto, tienen un espectro de actividad más amplio (Mediavilla, García y Flores, 2014).

Monobactámicos

Los monobactámicos son un grupo de antimicrobianos clasificados entre los antibiótico ß-lactámicos. Muchas moléculas monobactámicas provienen

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de gérmenes que viven en la tierra, aunque pocos tienen actividad antibacteriana de importancia. A diferencia de otros ß-lactámicos, los antibióticos monobactámicos tienen un solo anillo ß-lactámico en vez de tener dos. Los primeros se caracterizan por la presencia de un anillo ß-lactámico monocíclico, al cual se unen diferentes radicales que confieren al aztreonam una elevada resistencia a la inactivación por ß-lactamasas de bacterias gramnegativas (Enterobacterias, Pseudomonas y otras bacterias gramnegativas aerobias) (Mediavilla, García y Flores, 2014).

Carbapenemas

Son un tipo de antibióticos ß-lactámicos con amplio espectro de actividad bactericida y son sumamente resistentes a las ß-lactamasas. Esta clase de antibióticos fueron descubiertos originalmente del microorganismo *Streptomyces cattleya*, el cual, produce su propio antibiótico llamado tienamicina. En los carbapenemes, el azufre endocíclico es sustituido por un grupo metileno, quedando el átomo de azufre en posición adyacente al anillo bicíclico (Mediavilla, García y Flores, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Inhibidores de ß-lactámasas

Son un grupo de moléculas que actúan de manera reversible o irreversible e inhiben a muchas de las enzimas ß-lactamasas bacterianas. Carecen de actividad antimicrobiana intrínseca, por lo que suelen ser administradas en conjunto con antibióticos ß-lactámicos, reduciendo la acción que le confiere resistencia a ciertas bacterias en contra de estos antibióticos. Conservan en su estructura el anillo ß-lactámico En el ácido clavulánico, el anillo tiazolidínico de las penicilinas es sustituido por un anillo oxazolidínico. En sulbactam es la 6-desaminopenicilinasulfona y el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tazobactam es la sulfona del ácido penicilánico. Ambos compuestos carecen de actividad antibacteriana propia, pero al inhibir competitivamente las *ß*-lactamasas de diferentes especies bacterianas, potencian la actividad de penicilinas y cefalosporinas (Mediavilla, García y Flores, 2014).

Resistencia Bacteriana

La resistencia es un recurso de supervivencia que presentan las bacterias contra uno o más antimicrobianos a través de mecanismos que disminuyen la capacidad microbicida o inhibitoria que poseen tales fármacos. El desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural en los microorganismos que se acelera por la presión selectiva ocasionada por el uso irracional de agentes antimicrobianos en seres humanos y en animales (Bisso, 2018).

www.bdigital.ula.ve

Formas de Resistencia

Resistencia natural

La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico (Pérez y Robles, 2013).

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de resistencia (plásmidos, transposones e integrones) (Pérez y Robles, 2013).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química

El fenotipo de resistencia antibiótica por destrucción o modificación de la estructura química es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las ß-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo ß-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Entre las enzimas que se encargan de la modificación de la estructura podemos mencionar al cloranfenicol acetiltransferasa y también a las enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) (Pérez y Robles, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Alteración del sitio blanco del antibiótico

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras (Pérez y Robles, 2013).

Alteración en las barreras de permeabilidad

Este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana (Pérez y Robles, 2013).

Bombas de eflujo

En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo proveen resistencia antimicrobiana tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales (Pérez y Robles, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Métodos para determinar la actividad antibacteriana

En la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos. Entre los más utilizados se pueden mencionar: método del antibiograma disco-placa (Prueba de Kirby Bauer), método de la cinta o epsilómetro Etest^{R} (AB BIODISK) y los métodos de dilución. El más utilizado para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos es la prueba de Kirby Bauer (Velasco, Araque, Araujo, Longa, Nieves, Ramírez, Sánchez y Velazco, 2008).

Método del antibiograma disco-placa

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (Picazo, 2000).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración (Picazo, 2000).

Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valorde la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de las cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición. Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI (Picazo, 2000).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Métodos de dilución

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi)automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste (Picazo, 2000).

www.bdigital.ula.ve

Método del Epsilon test

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira (Picazo, 2000).

Definición Operacional de Términos

Antibiograma

www.bdigital.ula.ve

Método usado para medir la sensibilidad a uno o varios antibióticos de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección. Además, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico. También, el antibiograma sirve para orientar las decisiones terapéuticas individuales y del mismo modo para seguir la evolución de la resistencia bacteriana (Varela, 2008).

Bacteriostático

Término específico que se refiere a la propiedad por medio de la cual un biocida puede inhibir la multiplicación bacteriana (Brooks y cols., 2011).

Bactericida

Término específico que se refiere a la propiedad por medio de la cual un biocida aniquila bacterias (Brooks y cols., 2011).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cepas Bacterianas

Definidas como un conjunto de células homogéneas, o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias, cuyas características generales son las siguientes: Estabilidad genética, facilidad de cultivo, máxima velocidad de reproducción en las condiciones operativas elegidas, metabolismo orientado a la producción deseada con el mayor rendimiento posible, facilidad de manipulación y facilidad de conservación (Coronel, 2015).

Extractos

Los extractos son productos extraídos de sustancias biológicamente activas que poseen las plantas, empleando solventes como agua, alcohol, etanol, etc. Hay muchos tipos de compuestos fitoquímicos presentes en los extractos vegetales en altas concentraciones, por lo que pueden realizar una función beneficiosa en el organismo a través de los alimentos o aplicación en la piel mediante un cosmético; también actúan como conservantes y antioxidantes (Silva, 2022).

www.bdigital.ula.ve

Piperacilina

Fármaco compuesto por un antibiótico *ß*-lactámico y comúnmente es administrado conjunto a un inhibidor betalactamasa, que es utilizado para el tratamiento de infecciones provenientes de gérmenes de gramnegativo y anaeróbicos, semejante al de otras penicilinas (Comité de medicamentos de la Asociación española de pediatría, 2021).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tinción de Gram

Es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología que permite diferenciar rápida y fácilmente las bacterias según sus características morfológicas. El principio del método se basa en la tinción de todas las bacterias mediante cristal violeta o violeta de genciana y posteriormente decolorar los microorganismos con alcohol-acetona, lo que sucede con los gramnegativos, mientras que los grampositivos siguen manteniendo la coloración. Posteriormente se utiliza un colorante de contraste para visualizar los microorganismos gramnegativos como la fucsina o safranina. De este modo podemos visualizar las bacterias grampositivas de color azul-violáceo mientras que las gramnegativas se visualizaran de color rojo o rosa (Mora, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Bacterias grampositivas

Se llama bacterias grampositivas a aquellas que retienen la tinción azul-violeta. Las bacterias grampositivas tienen una pared gruesa compuesta de peptidoglicanos y polímeros, e impermeable, que hace que resista la decoloración (Rodríguez y Arenas, 2018).

Bacterias gramnegativas

Se denomina bacterias gramnegativas a las que se decoloran y después se tiñen con safranina. Las bacterias gramnegativas tienen una capa delgada de peptidoglicanos más una bicapa de lipoproteínas que se puede deshacer con la decoloración. (Rodríguez y Arenas, 2018).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Operacionalización de las Variables

Cuando se habla de operacionalización de las variables nos estamos refiriendo al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores (Arias, 2006). Es decir, logramos convertir las ideas de investigación expresadas en los objetivos y/o hipótesis formuladas, en acciones específicas que permitan su valoración real mediante la aplicación de las estrategias y procedimientos que permitan determinar su manifestación real en la realidad estudiada.

Entendiendo por variable según Arias (2006), una característica o cualidad; magnitud o cantidad, que puede sufrir cambios, y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación.

www.bdigital.ula.ve

Así tenemos que, la operacionalización en la presente investigación se plantea de la siguiente manera:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 2. Operacionalización de la Variable Dependiente: Sinergismo antibacteriano

Variable	**Tipo de Variable**	**Definición conceptual**
Sinergismo antibacteriano	Dependiente	Es la acción combinada y simultanea entre dos o más fármacos (agentes antibióticos) que, producen un efecto antibacteriano que es mayor que la suma de los efectos de los agentes individuales (Díaz, Galván, López y Carrillo, 2008).
Definición operacional	**Dimensiones**	**Indicador**
Prueba de difusión en agar utilizando el método de Kirby- Bauer difusión en disco-placa	-*Escherichia coli* -*Pseudomonas aeruginosa* -*Klebsiella pneumoniae* -*Enterococcus faecalis* *Staphylococcus aureus*	Presencia o ausencia del halo de inhibición (mm.) frente a cepas gramnegativas y grampositivas.

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 3. Operacionalización de la Variable Independiente: Composición química de los extractos de *Anethum graveolens*

Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual
Composición química de los extractos de *Anethum graveolens*	Independiente	Preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienenal evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidosextractivos de origen vegetal (Carrión y García, 2010).
Definición operacional	**Dimensiones**	**Indicador**
Pruebas químicas cualitativas (Tamizaje fitoquímico)	Pruebas químicas cualitativas para determinar - Alcaloides - Flavonoides - Taninos - Saponinas - Terpenos y esteroides - Compuestos fenólicos - Cumarinas - Antraquinonas y quinonas - Lactonas sesquiterpenicas - Glucósidos cardiotonicos	- Alcaloides: precipitados de colorpardo. - Flavonoides**:** coloración de rojoanaranjado a violeta. - Taninos: aparición de un precipitado blanco - Saponinas: formación de abundante espuma, por más de 30 minutos. - Terpenos y esteroides**:** coloración rosada, azul o verde - Compuestos fenilicos**;** coloración de azul a negro**.** - Cumarinas: presencia de fluorescencia - Antraquinonas y quinonas: coloración roja - Lactonas sesquiterpenicas: coloraciones roja, violeta o rosa - Glucósidos cardiotonicos: formación de una anillo marrón

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis

En vista de que en estudios anteriores se han demostrado que existe sinergismo al combinar antibióticos con extractos de especies pertenecientes a la familia de las Umbelíferas es de esperar que la combinación de la Piperacilina con el extracto de etanol obtenido del *Anethum graveolens* presenten igual, menor o mayor efecto sinérgico.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Según el tipo de investigación y el objetivo que se intenta alcanzar, los métodos, técnicas, tácticas y estrategias van a variar (Hurtado, 2015). Para nuestro caso, la investigación es de tipo confirmatoria, ya que nuestro trabajo de investigación se centró en la relación causa-efecto existente en el sinergismo del extracto del *Anethum graveolens* y Piperacilina sobre cepas gramnegativas y grampositivas, dando de esta manera la generación de una hipótesis, que posteriormente se verificó mediante la observación y la experiencia directa.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la investigación

Podemos describir que nuestro trabajo se realizó bajo un diseño de investigación mixto, dado que la recolección de datos fue de campo y de laboratorio, pues la recolección de la planta se desempeñó en la finca “El Pantano” en Timotes estado Mérida y el sinergismo fue determinado en las instalaciones del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Con respecto al tiempo en la recolección de datos se fijó un diseño transversal contemporáneo, ya que los datos se tomaron en el presente y en un solo momento del tiempo. A su vez es un diseño bivariable, por tener una variable dependiente constituida por el sinergismo antibacteriano, y una variable independiente representada por la composición química de los extractos del *Anethum graveolens*.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Nuestra unidad de investigación está representada por la especie *Anethum graveolens*.

Selección y tamaño muestral

El tamaño de la muestra está representado por 193,32 gramos de las partes aéreas (hojas y flores) del *Anethum graveolens*.

Sistema de Variables

La operacionalización de las variables en esta investigación se encuentran ordenadas en variables dependientes e independientes debido a que es un estudio de tipo confirmatorio, estas se conforman en una variable dependiente representada por el sinergismo antibacteriano, y una variable independiente, representada por la composición química de los extractos de *Anethum graveolens.*

www.bdigital.ula.ve

Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

Toda investigación se basa en la recopilación de información que permita conocer datos significativos y con importancia sobre el estudio que se está realizando. Según Arias (2006) "…se entenderá por técnica el procedimiento o forma particular de obtener datos e información. La técnica utilizada en esta investigación fue la Observación estructurada. Definida por el mismo Arias (2006) "…aquella que de realizarse en correspondencia con unos objetivos utiliza una guía diseñada previamente en la que se especifican los elementos que serán observados. Y según Hurtado (2015) "los instrumentos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

representan la herramienta con la cual se va recoger, filtrar y codificar la información". Los instrumentos están en correspondencia con las técnicas, y la selección de las técnicas a utilizar en una investigación está relacionada con el tipo de indicios que permiten captar el evento de estudio. Los instrumentos que se utilizaron en esta investigación fueron la realización de tablas de resultados, que ayudaron a comprimir la información obtenida y mejorar su entendimiento, además de fotografías e imágenes del procedimiento realizado.

Procedimiento de la Investigación

Recolección de la especie *Anethum graveolens*

Para la recolección de las muestras se realizó una salida de campo a Timotes estado Mérida, específicamente a la finca "El Pantano" (a una altitud de 2.001 metros sobre el nivel del mar), en donde se recolectaron de forma manual, tomándolas de una de las orillas de la finca, luego se procedió a lavarlas cuidadosamente con agua, para eliminar la mayor parte del exceso de tierra y demás impurezas, a continuación se colocaron en bolsas plásticas que luego se instalaron en cavas con hielo, luego se trasladaron al Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, y finalmente se procedió a ser lavadas con agua destilada, de esta manera limpiar las impurezas que no fueron removidas en el primer lavado. Se procedió a pesar la muestra (hojas y flores) para encontrar que se recolectaron en peso fresco 193,32 gramos, se llevó a la estufa para secar la muestra y se obtuvo un peso neto de 72,21 gramos.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Obtención de los extractos de hexano y etanol de *Anethum graveolens* **por extracción por reflujo en caliente**

Se realizó el ensamble del equipo de extracción, se procedió a triturar con un mortero las partes aéreas (hojas y flores) del *Anethum graveolens* y se ubicaron en un balón, al que posteriormente se le agregó 500 mL de solvente, en este caso utilizamos dos tipos, hexano y etanol, para obtener los extractos de hexano y etanol respectivamente, a continuación se conectó al equipo que se ubicó sobre una manta eléctrica el cual se mantuvo a una temperatura de 45°C para el caso del extracto de hexano y 40°C para el extracto de etanol, se conservó de esa manera durante una hora, después de caer la primera gota, siendo retirada y finalmente se dejó enfriar unos minutos, utilizando un embudo y papel filtro se filtró en un matraz el material obtenido de los elementos vegetales (Figura 9-11).

www.bdigital.ula.ve

Figura 9. Proceso de triturado de la planta Eneldo (hojas y flores)

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 10. Extracción por reflujo en caliente

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022

www.bdigital.ula.ve

Figura 11. Filtrado de los extractos

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022

Concentración de los extractos con la utilización de Rotavapor

Se procedió a disponer del material de vidrio (matraz de fondo redondo), en el que se agregó el material que anteriormente se filtró hasta la mitad del

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

matraz, luego se conectó al rotavapor marca IKA RV10 digital, el cual su baño maría estuvo a una temperatura mínima necesaria para lograr evaporar el solvente, se activó este y se bajó el montaje hasta que tocó el baño de maría, se continuó con la destilación hasta que el contenido que se encontraba en el matraz no disminuyó más, finalmente se desmontó el equipo y el contenido que quedó en el matraz se vertió en un frasco ámbar, este procedimiento se realizó para ambos extractos (Figura 12 y 13).

www.bdigital.ula.ve

Figura 12. Concentración de los extractos mediante Rotavapor (IKA RV10 digital)

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022

Figura 13. Extractos de hexano y etanol

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación del perfil fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens*

Ambos extractos fueron sometidos a diversas reacciones químicas para así identificar los metabolitos secundarios presentes, a este procedimiento se le conoce como tamizaje fitoquímico cualitativo. El protocolo utilizado en cada ensayo se describe a continuación.

Alcaloides

Ensayo de Mayer. Disolver una porción del extracto en 2 mL de HCl al 5%. Agitar, filtrar, tomar una alícuota y adicionar gotas de Reactivo de Wagner. Resultado positivo formando un precipitado rojo pardo (Alarcón, 2018).

www.bdigital.ula.ve

Ensayo de Wagner. Disolver una porción de extracto en 2 mL de HCl al 5%. Agitar, filtrar, tomar una alícuota y adicionar gotas de reactivo de Wagner. Resultado positivo formación de un precipitado rojo pardo (Alarcón, 2018).

Ensayo de Dragendorff. En una alícuota del extracto se añadió una gota de HCL concentrado, se calentó suavemente, enfriar hasta que le pH sea ácido y se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Es positivo si hay opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado (+++) (Silva, 2022).

Flavonoides

Prueba de Shinoda. Evaporar el solvente de la alícuota del extracto, disolviéndolo en 1mL de HCl concentrado. Un resultado positivo se aprecia por la formación de una coloración roja que indica la presencia de auronas o

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

chalconas. En caso de cambiar la coloración se coloca un trozo de magnesio metalico, si se forma una coloración naranja a roja, indica la presencia de flavonas; si es rojo es flavonides y si es magenta flavononas (Silva, 2022).

Saponinas

Ensayo de Espuma. En un tubo de ensayo se coloca 1 mL de extracto, agitar vigorosamente y se toma la altura de la espuma. Se considera positiva la prueba si se obtiene de 8 mm a 10 mm de altura estable por 30 minutos (Alarcón, 2018).

También se puede realizar diluyendo la cantidad del extracto en 5 veces su volumen en agua, se agüita de igual forma por minutos y dará positivo si se forma una espuma abundante por más de 2 minutos (Silva, 2022).

www.bdigital.ula.ve

Compuestos fenólicos

Ensayo de Cloruro Férrico III. Evaporar el solvente de una alícuota del extracto y adicionar 3 gotas de una disolución de $FeCl_3$ al 5%. Es positivo si hay pigmentación rojo-vino para compuestos fenólicos en general, verde intenso taninos pirocatecólicos y azul taninos pirogalotánicos (Silva, 2022).

Taninos

Ensayo de Gelatina. A una pequeña cantidad del extracto se le adiciona 2 mL de agua destilada, al cual se le adicionó una solución de gelatina al 1%; la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos (Marcano y Hasewaga 2002).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cumarinas

Reacción con NH_4OH concentrado. Se disolvió una alícuota de los extractos en 1 mL de etanol y se agregaron dos gotas de NH4OH concentrado, luego se observaron en cámara de luz ultravioleta a 365 nm, se considera positiva la prueba cuando presenta una fluorescencia azul-violeta (Domínguez y Xorge, 1973).

Triterpenos/esteroles

Ensayo de Liberman-Burchard. Se disolvieron cada uno de los extractos en 4mL de cloroformo; a una alícuota de 2mL se le adicionaron 0.25 mL de anhídrido acético más dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de diferentes colores indica la presencia de fitoesteroles o terpenos. El color verde indica la presencia de fitoesteroles, mientras que de rosa a morado se indica la presencia de terpenos y triterpenos (Bulugahapitiya, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Glucósidos

Ensayo de Keller-Kiliani. Disolver el extracto en 1 mL de agua destilada, se agregan 2 mL de ácido acético glacial y posteriormente se adicionan algunas gotas de cloruro férrico al 5%. Vertir en tubos de ensayo con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo marrón en la interfaz indica la presencia de glucósidos cardiotónicos, al igual que la formación de un anillo violeta debajo del anillo marrón o bien en la fase de ácido acético; un anillo verdoso también puede formarse gradualmente, indicando la presencia de estos compuestos (Bulugahapitiya, 2013).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antraquinonas

Reacción con NH_4OH concentrado. Al extracto de etanol se le agrega una gota de hidróxido de amonio concentrado. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla, hay antraquinonas presentes (Marcano y Hasegawa, 2002).

Quinonas

Reacción con NH_4OH concentrado. Al extracto de etanol se le adicionan 4 gotas de NH_4OH concentrado. La reacción se considera positiva cuando hay desarrollo de una fluorescencia azul, verde o amarilla a una longitud de onda de 365nm (Alarcón, 2018).

www.bdigital.ula.ve

Lactonas sesquiterpenicas

Prueba de Baljet. Disolver los extractos y adicionar de 3 a 4 gotas del reactivo de Baljet; un cambio de coloración de naranja a rojo demuestra la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Garcia, Cruz, Alarcon, Nieto y Gallegos, 2019).

Determinación de la actividad antibacteriana y sinergismo por el método de difusión en disco utilizando distintas cepas bacterianas

Se detectó a través del método de Kirby Bauer en agar Mueller Hinton siguiendo las recomendaciones de *Clinical and Laboratory Standars Institute* (CLSI-2015). Se utilizaron diferentes cepas bacterianas patógenas tanto grampositivas como gramnegativas. Se emplearon los discos de papel con el antibiótico piperacilina y discos impregnados con el extracto de etanol, a su vez se utilizaron también discos de papel con el antibiótico piperacilina

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

combinado con el extracto de etanol del *Anethum graveolens*. Las placas se incubaron a 36 º C durante 18 a 24 horas (Picazo, 2000).

Lectura interpretada de las placas

Se realizó después de 24 horas de incubación, con una regla milimetrada se midió la zona clara alrededor del disco de antibiótico, al igual se realizó la medición del disco impregnado con el extracto como la del disco impregnado con ambos (antibiótico y extracto), esta zona clara corresponde con la inhibición del crecimiento bacteriano. Estos datos se compararon entre sí, para determinar la interacción farmacológica obtenida. La interpretación de los halos de inhibición permitió establecer la actividad antibacteriana del extracto y el sinergismo antibacteriano (Varela, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques para el diseño de análisis, el enfoque cuantitativo y el enfoque cualitativo. Según Hernández, Fernández y Bastidas (2010) el enfoque cuantitativo hace referencia a la recolección de datos como método para probar hipótesis, con bases en mediciones numéricas, para de esta manera poder crear modelos de comportamiento y comprobar teorías. De la misma manera define al enfoque cualitativo como método para la recolección de datos que no utiliza medición numérica para descubrir y afinar preguntas en el proceso de interpretación.

Para fines de nuestro proyecto de investigación, utilizamos ambos enfoques tanto cuantitativo como cualitativo, ya que se estudiaron numéricamente los datos que se obtuvieron de la unidad de estudio, de esta manera logramos medir la correspondencia del sinergismo del extracto de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Anethum graveolens y la Piperacilina contra cepas bacterianas, expresándolos en milímetros producidos por los halos de inhibición, además se observaron las reacciones químicas de color y precipitación obtenidas por el procedimiento de tamizaje fitoquímico, para evaluar la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUCIONES

Resultados

Determinación del % de rendimiento de los extractos de hexano y etanol de *Anethum graveolens*

Para la determinación del % de rendimiento se utilizó la siguiente formula:

$$\%R = \frac{Peso\ final\ del\ extracto\ obtenido}{Peso\ inicial\ de\ la\ muestra} \times 100$$

Tabla. 4. Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento

www.bdigital.ula.ve

	EH	EE
Peso inicial de la planta seca y molida (g)	72,21	72,21
Peso final del extracto (g)	0,69	1,53
% R	0,96	2,12

Leyenda: EH: extracto de hexano, EE: extracto de etanol, %R: porcentaje de rendimiento

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Detección cualitativa de los compuestos químicos de los extractos de *Anethum graveolens* mediante tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico de los extractos del *Anethum graveolens* se realizó con pruebas colorimétricas o de precipitación cualitativas. Las pruebas utilizadas para la determinación fueron alcaloides (Dragendorff, Mayer y Wagner), triterpenos y esteroles (Liebermann-Burchard), cumarinas (Ensayo de NH_4OH), quinonas (H_2SO_4 concentrado), antraquinonas (Ensayo de NH_4OH), saponinas (Ensayo de la espuma), compuestos fenólicos ($FeCl_3$), taninos (gelatina), flavonoides (Hidróxido de sodio al 10% y Shinoda), lactonas sesquiterpenicas (prueba de Baljet) y glucosidos cardiotónicos (Keller-Kiliani). Los resultados fueron interpretados como negativos (-) o positivos (+ poco; ++ moderado; +++ abundante).

www.bdigital.ula.ve

Las pruebas realizadas a los extractos del *Anethum graveolens* revelaron conforme a los parámetros establecidos, que en el extracto de hexano se observó escasa presencia de Triterpenos/Esteroles, así mismo en el extracto de etanol se determinó escasa cantidad de alcaloides, moderada existencia de Triterpenos/Esteroles, abundantes compuestos fenólicos y presencia de glucósidos cardiotónicos. Igualmente, en el extracto de etanol hubo ausencia de saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, antraquinonas y lactonas sesquiterpenicas (Tabla 5 y 6).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla. 5. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens*

MS	Ensayo	EH	EE
Alcaloides	Ensayo de Wagner	ND	-
	Ensayo de Mayer	ND	-
	Ensayo de Dragendorff	ND	+
Triterpenos/esteroles	Ensayo de Liberman	+	++
Flavonoides	Prueba de Shinoda	-	-
	NaOH al 10%	-	-
Saponinas	Ensayo de Espuma	ND	-
Compuestos fenólicos	Ensayo de Cloruro Férrico	ND	+++
Taninos	Ensayo de Gelatina	ND	-
Cumarinas	Ensayo de NH_4OH concentrado	ND	-
Antraquinonas	NH_4OH concentrado	ND	-
Quinonas	H_2SO_4 concentrado	-	-
Lactonas sesquiterpenicas	Baljet	ND	-
Glicósidos cardiotónicos	Ensayo de Keller-Kiliani	ND	+

Leyenda: MS: Metabolitos secundarios, EH: extracto de hexano, EE: extracto de etanol, -:Ausencia, +:Escaso, ++: Moderado, +++: Abundante, ND: no determinado

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla. 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens.*

Metabolitos Secundarios	Pruebas Químicas	Control Positivo	Extracto de hexano	Extracto de etanol
ALCALOIDES	Wagner Positivo (+) EE		ND	
	Dragendorff Negativo (-) EE		ND	
	Mayer Negativo (-) EE		ND	

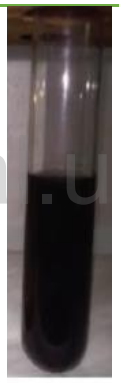
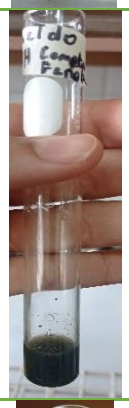
Leyenda: EE: extracto de etanol, ND: no determinado

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla. 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens.* (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Pruebas Químicas	Control Positivo	Extracto de hexano	Extracto de etanol
TRITERPENOS/ ESTEROLES	Liberman/Bauchart Positivo (+) para ambos extractos			
COMPUESTOS FENOLICOS	$FeCl_3$ Negativo (-) EE		ND	
SAPONINAS	Prueba de la espuma Negativo (-) EE		ND	

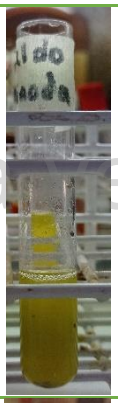
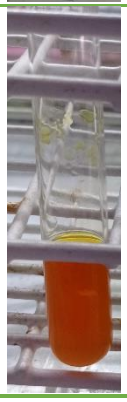
Leyenda: EE: extracto de etanol, ND: no determinado

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla. 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens.* (Continuación).

Metabolitos Secundarios	**Pruebas Químicas**	**Control Positivo**	**Extracto de hexano**	**Extracto de etanol**
TANINOS	Ensayo de la gelatina Negativo (-) EE		ND	
FLAVONOIDES	Shinoda Negativo (-) para ambos extractos			
	NaOH al 10% Negativo (-) para ambos extractos			

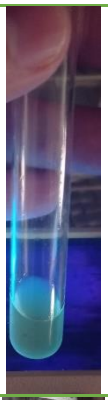
Leyenda: EE: extracto de etanol, ND: no determinado

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla. 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens.* (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Pruebas Químicas	Control Positivo	Extracto de hexano	Extracto de etanol
CUMARINAS	NH_4OH[ ] Negativo (-) EE		ND	
ANTRAQUINONAS	NH_4OH[ ] Negativo (-) EE		ND	
QUINONAS	H_2SO_4[ ] Negativo (-) para ambos extractos			

Leyenda: EE: extracto de etanol, ND: no determinado

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla. 6. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Anethum graveolens.* (Continuación).

Metabolitos Secundarios	Pruebas Químicas	Control Positivo	Extracto de hexano	Extracto de etanol
LACTONAS SESQUITERPENICAS	Baljet Negativo (-) EE		ND	
GLUCOSIDOS CARDIOTONICOS	Keller-Kiliani Positivo (+) EE		ND	
Leyenda: EE: extracto de etanol, ND: no determinado				

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

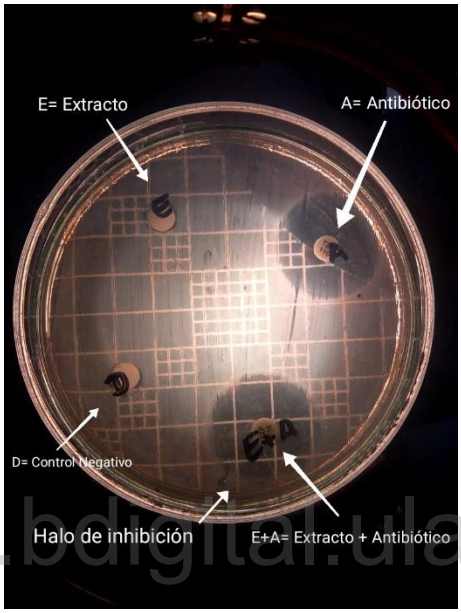
Determinación de la actividad antibacteriana y sinergismo

Como se puede apreciar en las figuras 14-18, la determinación de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de *Anethum graveolens* [10mg/mL] y del antibiótico Piperacilina [110µg] se realizó a través del método de difusión en disco, proporcionando resultados medibles en halos de inhibición (Tabla 7).

Asi mismo la determinación del sinergismo antibacteriano se efectuó a través del método de difusión en disco (Figuras 14-18), combinando el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

extracto de etanol del *Anethum graveolens* [10mg/mL] y la Piperacilina [110µg], dando como resultado halos de inhibición que se miden en milímetros y se reflejan en la Tabla 7, esto con el fin de comparar los resultados de la combinación de estos mismos.



www.bdigital.ula.ve

Figura 14. Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa.*

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

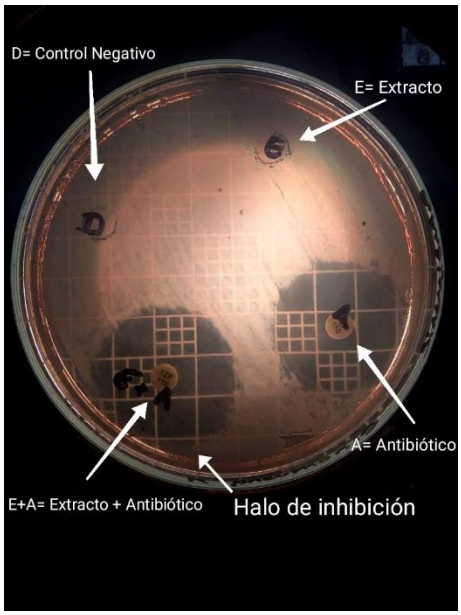


Figura 15. Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Klebsiella pneumoniae*

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

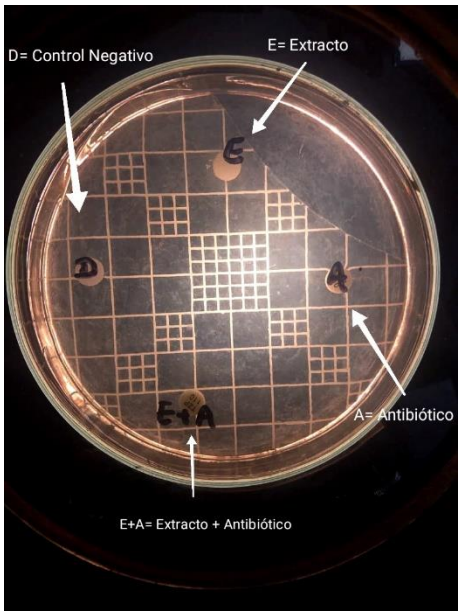


Figura 16. Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Escherichia coli*

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

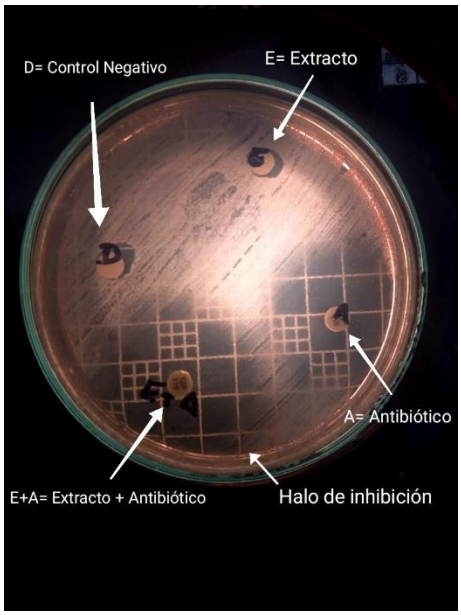


Figura 17. Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

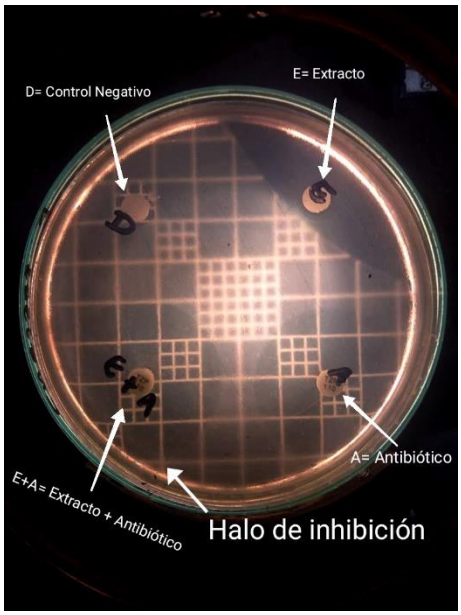


Figura 18. Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Enterococcus faecalis*

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 7. Resultados de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana y la combinación del extracto de etanol del *Anethum graveolens* con la Piperacilina expresada en milímetros (mm).

	Halo de inhibición (mm)			
Cepas bacterianas ATCC	**Control Negativo (DMSO)**	**Piperacilina [110ug]**	**Extracto de etanol [10mg/mL]**	**E+A**
Klebsiella pneumoniae	0	33	9	33
Pseudomonas aeruginosa	0	26	9	26
Escherichia coli	ND	ND	ND	ND
Staphylococcus aureus	0	35	9	38
Enterococcus faecalis	0	35	11	37

Leyenda: E+A: Extracto combinado con el antibiótico (Piperacilina), DMSO: Dimetilsulfóxido, ND: No Determinado

Elaborado por Domínguez, Ramírez y Hernández, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Discusiones

Tamizaje fitoquímico

Silva en el año 2022 realizó un estudio fitoquímico al extracto de etanol de *Anethum graveolens* logrando observar la existencia de diversos metabolitos secundarios, entre los cuales resaltaron, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, saponinas y alcaloides. En el mismo contexto el tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de hexano y etanol del eneldo en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis demostró tener concordancia y diferencias en los resultados obtenidos, en el extracto de hexano se observó solamente escasa presencia de Triterpenos/Esteroles, así mismo, en el extracto de etanol se determinó escasa cantidad de alcaloides, moderada existencia de Triterpenos/Esteroles, abundantes compuestos fenólicos y presencia de glucósidos cardiotónicos. No se reportaron quinonas, saponinas ni flavonoides, siendo esto una diferencia significativa con el trabajo realizado por Silva (2022), esto posiblemente se deba a diversos factores tales como el método de extracción, la parte de la planta utilizada para la extracción, estado fenológico de la planta, temporada de floración, edad de la planta, naturaleza del suelo y condiciones ambientales.

www.bdigital.ula.ve

Actividad antibacteriana y sinergismo

En el año 2018 Mustafa realizó un trabajo de investigación en el cual determinó la actividad antibacteriana del extracto de *Anethum graveolens* frente a *Burkholderia mallei* (bacilo gramnegativo), utilizando el método de dilución en caldo para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), los resultados revelaron que el extracto alcohólico y acuoso exhibieron inhibición del crecimiento de *B. mallei* a una CMI de 0,8 y 1 mg/mL respectivamente.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Nuestra investigación demostró que el extracto de etanol del eneldo presentó actividad antibacteriana reducida al observarse un halo de inhibición de 9 milímetros (mm) en cada cepa gramnegativa estudiada (*Klepsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa).* En comparación con el trabajo de Mustafa, una de las principales diferencias es el método utilizado para evaluar la actividad antibacteriana, siendo el método de difusión en disco utilizado en nuestro trabajo, en el cual, al utilizar un extracto polar (etanol) quedan retenidos en el disco de papel (celulosa) los compuestos polares, es decir, no difunden en el agar, por tal motivo se puede mostrar una menor actividad antibacteriana en comparación con el método de dilución en caldo.

En el trabajo realizado por Calcina y Pacha (2018), se logró observar cómo es posible establecer un aumento en la actividad antibacteriana combinando diferentes extractos de plantas y antibióticos para hacerle frente a bacterias farmacoresistentes. Sus resultados nos reseñan que en las combinaciones de los extractos con los antibióticos frente a *S. aureus* farmacorresistente, el mejor efecto antibacteriano fue mostrado por la penicilina con el extracto de eucalipto con 29 mm; el cloranfenicol con el extracto de ajo con 34,075 mm; asi mismo el sulfametoxazol/trimetoprim con el extracto de ajo 33,58 mm; el ciprofloxacino con el extracto de eucalipto con 28,5 mm de halos de inhibición. El cloranfenicol en combinación con el extracto de kión mostró la mejor inhibición con 29,23 mm frente *Escherichia coli* farmacorresistente, estos resultados nos indican que es posible crear otras alternativas terapéuticas. Al combinar fármacos se pueden obtener distintos tipos de sinergismo, tales como: aditivo o también llamado sinergismo de suma, en el cual, el efecto de la combinación (extracto más antibiótico) es igual a la suma de los efectos de los agentes individuales, el supraaditivo o sinergismo de potenciación es aquel en el que el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los agentes

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

individuales y por último el sinergismo infraaditivo o antagónico, definido como un efecto combinado que es menor a la suma de los efectos de los agentes individuales (Díaz y cols, 2008). Ahora bien, nuestros resultados reflejan un aumento mínimo en el halo de inhibición de la combinación del extracto de etanol del eneldo más la piperacilina, aun así, este pequeño aumento se considera como sinergismo infraaditivo o antagónico, este tipo de sinergismo solo se observó en las cepas grampositivas estudiadas, en el caso de las cepas gramnegativas el resultado fue indiferente, esto se podría explicar por el mecanismo de acción del antibiótico (inhibición de la síntesis de la pared celular), así como también por la composición química de la pared celular bacteriana. (Brugueras y García,1998).

Una investigación realizada por Bezalwar y Charde (2019), determinó que el *Coriandrum sativum* es una planta de la familia Umbelífera que posee actividad antibacteriana frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, el extracto de esta planta fue utilizado en combinación con 22 antibióticos para verificar si presentaba actividad sinérgica. Los resultados obtenidos demostraron que el *Coriandrum sativum* logro aumentar la actividad antibacteriana de 8 antibióticos estudiados (cefotaxima, doripenem, polimixina, azlocilina, levofloxacina, mezlocilina, cefoperazona, ceftazidima). Nuestra investigación concuerda en que el *Anethum graveolens*, el cual pertenece también a la familia de las Umbelíferas expresa actividad antibacteriana, no obstante, al usarlo en combinación con el antibiótico (Piperacilina) en cepas grampositivas, presenta un sinergismo infraaditivo o antagónico, es decir el efecto de la combinación (extracto más antibiótico) es menor que la suma de ambos agentes por separado.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- A través de la técnica de extracción por reflujo en caliente se lograron obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores del *Anethum graveolens*, con un porcentaje de rendimiento del 0,96% y 2,12% respectivamente.

- El tamizaje fitoquímico realizado al extracto de hexano del *Anethum graveolens* reveló únicamente presencia de Triterpenos/esteroles.

www.bdigital.ula.ve

- El análisis fitoquímico del extracto de etanol del eneldo demostró tener gran cantidad de compuestos fenólicos, poca presencia de alcaloides, moderada cantidad de Triterpenos/esteroles, así como también presencia de glucósidos cardiotónicos.

- La mejor actividad antibacteriana observada del extracto de etanol del eneldo se presentó en la cepa de *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 11mm, las demás cepas estudiadas *(Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia y Pseudomonas aeruginosa)* presentaron un halo de inhibición de 9mm para cada una de ellas.

- La combinación del extracto de etanol del eneldo (10mg/mL) más la Piperacilina (110ug) dio como resultado un sinergismo infraaditivo,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

solo en las cepas grampositivas estudiadas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis)*.

- En las cepas gramnegativas estudiadas (*Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa)* no se logró observar ninguna interacción que favoreciera o disminuyera la actividad antibacteriana de los componentes utilizados para evaluar el sinergismo.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

RECOMENDACIONES

- Determinar el sinergismo en otras cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas, para así establecer si la combinación del extracto de etanol del eneldo más el antibiótico (Piperacilina) es más efectiva en otras bacterias.

- Analizar la actividad antibacteriana de los extractos de eneldo por medio de la técnica de dilución en caldo para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), de esta manera se lograría determinar la concentración exacta a la cual las cepas bacterianas son inhibidas.

- Se recomienda determinar el sinergismo del extracto de *Anethum graveolens* con antibióticos de otros grupos diferentes a los *ß*-lactámicos, para así conocer si el extracto de esta planta puede o no potenciar otros antibióticos.

www.bdigital.ula.ve

- Se sugiere utilizar el aceite esencial del eneldo para la determinación del sinergismo, de esta manera se podría identificar cuál de los metabolitos secundarios tendría mejor efecto en combinación con el antibiótico.

- Evaluar otra actividad biológica en los extractos de *Anethum graveolens* como actividad antifungica, antioxidante y antiinflamatoria.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

BIBLIOHEMEROGRAFIA

Alarcón, M. (2018) *Actividad antioxidante y tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de Oyedaea verbesinoides DC* [Tesis de pregrado]. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida, Venezuela.

Andrade, M. (2015). *Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Lippia origanoides y Sinergismo en Combinación con Timol.* [Tesis de Pregrado]. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Escuela de Bioanálisis. Mérida, Venezuela.

Arias, F. (2006) El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica. 5ta edición. Caracas, Venezuela. Editorial Episteme.

Babri, R., Khokhar, I., Mahmood, Z., y Mahmud, S. (2012).Chemical composition and insecticidal activity of the essential oil of *Anethum graveolens L*. *Science International.* 24(4):453-455.

Bandoni, A., Retta, D., Di Leo Lira, P., y Baren, C. (2009). ¿Son realmente útiles los aceites esenciales?. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8*(5),317-322.

Bairán, G., Chávez, E., Romero, C., y Torres, E. (2022). Resistencia bacteriana: un problema latente de salud mundial. *RD-ICUAP*, *8*(22), 1-12.

Bermejo, A., Pereira, S., Cintra, M., y Morales, G. (2016). Determinación de parámetros químico- físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach L* (Pursiana). *Revista Habanera de Ciencias Médicas*.

Bezalwar, P., y Charde, V. (2019). Estudio de la acción sinérgica de extractos de semillas de *Coriandrum sativum* sobre antibióticos frente a P. aeruginosa multirresistente. *Revista de conservación del medio ambiente*, *20* (3), 83–88. https://doi.org/10.36953/ECJ.2019.20312

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Bisso, A. (2018). Resistencia a antimicrobianos. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*. 31(2):50-59.

Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., y Mietzner, T. (2011). *Microbiología Médica.* 25va ed. México. Editorial McGraw-Hill 71 Interamericana.

Brugueras, M., y García, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 14(4), 347-361.

Bulugahapitiya, V. (2013). *Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods*. 1ra. ed. Matara, Editorial Indika Graphics.

Butrón, A., y Solano, M. (2008). Fitoquimica y actividad antibacteriana de las cumarinas. [Tesis de pre-grado]. Universidad Autónoma de México. Los Reyes Iztacala, Mexico.

www.bdigital.ula.ve

Campaña, A. Jácome, P. Muñoz, A. y Sigüenza, S. (2015). *Álbum de plantas alimenticias y hornamentales.* Isuu, 44. Disponible en: https://issuu.com/sashavaleriasiguenzarobles/docs/album_de_plantas _alim enticias_y_hor/77

Carrion, A., y Garcia, C. (2010). *"Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica".* [Tesis de pre-grado]. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Cuenca, Ecuador.

Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana Krukoff*). *Colombia forestal,* 12(1), 161-170.

Calcina J., y Pacha D. (2018*). Actividad antibacteriana in vitro de antibióticos de uso común en combinación con extractos de plantas frente a bacterias patógenas farmacorresistentes.* [Tesis de pre-grado]. Universidad Nacional del Altiplano,Perú.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Chahal, K., Monika, A., Kumar, A., Bhardwaj, U., y Kaur, R. (2017). Chemistry and biological activities of *Anethum graveolens* L. (dill) essential oil: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2), 295-306.

Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría (15 de marzo 2021). Piperacilina-tazobactam. Consultado el 11/10/2022.

Coronel, D. (2015). *Aislamiento e identificación de taxa de levaduras presentes en el fruto de mortiño (Vaccinium floribundum) con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica*. [Tesis de pregrado]. Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador

Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *raputia heptaphylla* (rutaceae). *Revista elementos.* 4 (4) 31-39.

Díaz, M., Galván, R., López, F., y Carrillo, N. (2008). Sinergismo de la cafeína sobre los efectos antinociceptivos del metamizol. *Cirugía y Cirujanos*, 76 (3), 241-246.

Domínguez, S., y Xorge, A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica.* México. Editorial Limusa.

Drago, M., Lopez, M., y Sainz, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 37*(4),58-68.

Esmail, A., y Snafi, A. (2014). The pharmacological importance of *Anethum graveolens*. A review*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,* 6 (4), 11-13.

Fernández, C., Álvarez, M., Bobillo, T., Beato, T., y Santos, I. (2009). *Plantas Medicinales Españolas. Familia Umbelliferae (Apiaceae).* Departamento de Botánica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. España.

Flores, J., Ochoa, M., López, M., Trejo, E., y Morelos, A. (2016).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos. *Revista ADM,* 73(5), 227-234.

García, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas*. Reduca,* 2(3),119-145.

García, R., Cruz, F., Alarcón, J., Nieto, A., y Gallegos, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* banks ex köning et sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. *Polibotánica*, 48: 151-168.

Gennaro, A. (2003). *Remington Farmacia*. 20ª Edición. Buenos Aires Argentina. Editorial Panamericana.

Guerra, A. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades fisicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos, así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (Phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio.* [Tesis pregrado]. Universidad San Carlos de Guatemala, Ciudad de Guatemala.

www.bdigital.ula.ve

Guevara, A., Sahai, J., y Tedesco, R. (2015). Persistencia clonal de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalo-β-lactamasas en un hospital de Ciudad Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 35*(2),77-82.

Hajhashemi, V., y Abbasi, N. (2008). Hypolipidemic activity of Anethum graveolens in rats. *Phytotherapy research: PTR*, *22*(3), 372–375. https://doi.org/10.1002/ptr.2329

Heinrich, M. (2005). ¿Estudios metabolómicos - Nuevas oportunidades para la fitoquímica?. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4*(6),106.

Hernández, R., Fernández, C., y Bastidas, M. (2010). *Metodología de la Investigación*. 5ta Edición. México. Editorial McGraw Hill.

Hurtado, J. (2015). *El proyecto de investigación. Comprensión holística de la*

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

metodología y la investigación. 8va Edición. Caracas, Venezuela. Ediciones Quirón.

Jackson, L., Reyes, L., y Hamilton, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica.* 8(1), 13-27.

Kaur, G., y Arora, D. (2010). Bioactive potential of *Anethum graveolens, Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi* belonging to the family *Umbelliferae*- Current status. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(2), 87-94.

Krarup, C. (1997). *Hortalizas de estación fría.* Biología y diversidad cultural. P. Universidad Católica de Chile, Vicerrectoría Académica, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile, 111p.

López, J., y Robledo, J. (2007). *Enterobacterias y otros bacilos gramnegativos. Microbiología de las Infecciones Humanas.* 1era Edición. Medellín. Fondo Editorial CIB.

www.bdigital.ula.ve

Maguiña, C., Ugarte, C., Montiel, M. (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, *23*(1), 15-20.

Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela: Caracas.

Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquía. Medellín. Colombia.

Mediavilla, A., Flores, J., y García, L. (2014). Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociación de antibióticos. *Farmacología Humana.* Barcelona Ed. Masson S.A. p. 1061-1083.

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

Méndez, A. (2010). *Reflujo*. La Guía. Recuperado el 20 de abril de 2019 de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

https://quimica.laguia2000.com/quimica-organica/reflujo.

Mora, X. (2012). Diferenciando Bacterias Gram+ y Gram-. *Cunicultura*. p 25-27.

Moreno, J. (2000). Uso actual de las penicilinas clásicas. *Medicina General*. p 264-269.

Moshfekus, S., y Yong, E. (2021). Anethum sowa Roxb. ex fleming: Una revisión sobre usos tradicionales, fitoquímica, actividades farmacológicas y toxicológicas. Revista de Etnofarmacología.Volume 280.

Murray, P. (2008). *Microbiología médica*. 5ta ed. España. Editorial Elsevier.

Mustafa K. (2018). Isolation and Identification of *Burkholderia mallei* and its Susceptibility to *Anethum graveolens e*xtracts. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 30(4), pp. 11-22.

Naseri, G., y Heidari, A. (2007). Antispasmodic effect of *Anethum graveolens* fruit extract on rat ileum. International Journal of Pharmacology 3(3):260-264.

Ochoa, L., y Sarmiento, A. (2018). *Estudio fitoquímico de la especie vegetal Bucquetia glutinosa (L. f.) DC. (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica.* [Tesis de pre-grado]. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Bogotá, Colombia.

Organización Panamericana de la Salud. (2022). *Tratamiento de las enfermedades infecciosas.* Octava edición. Washington, D.C. Editorial OPS.

Ortuño, M. (2006). *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes.* 1era Edición. España. Editorial Aiyana.

Palacios, M. (2013). *Farmacognosia y Fitoquímica.* Universidad Católica “Los Ángeles de Chimbote”. Escuela de Farmacia y Bioquímica, Perú.

Parra, D., Castro, M., Aponte, Y. (2016). *Marcha Fitoquímica Preliminar.* Corporación Tecnológica de Bogotá. Tecnología en Regencia de

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Farmacia. Bogotá D.C. Colombia.

Pérez, H., y Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD.* 4(3):186-191.

Picazo, J. (2000). *Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.

Ramadan, M., Abd-Algader, N., El-kamali, H., Ghanem, K., y Farrag, A. (2013). Volatile compounds and antioxidant activity of the aromatic herb *Anethum graveolens. Journal of the Arab Society for Medical Research,* 8(2), 79–88.

Rodríguez, P., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica.* 16 (2), 166-167. Ciudad de México.

www.bdigital.ula.ve

Ryman, D. (1995). *Aromatherapy.* 1era Edición. Barcelona, España. Editorial Kairós S.A.

Sánchez, C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana?. *Química Viva*, 5(2),63-77.

Sánchez, J. (2010). *Flora ornamental española.* Tomo VI. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España.

Sánchez, F., y García, F. (2022). Fitoquímica. Ciudad de México, México. Comité Editorial de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Silva, J. (2022). *"Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir del eneldo (Anethum graveolens) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante".* [Tesis de Postgrado]. Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador.

Simoons, A., Verweij-van, V., y McLaren, D. (1986). The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella. Journal of medical microbiology*, *21*(2), 133–137. https://doi.org/10.1099/00222615-21-2-133.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Stoessl, A. (1983). Secondary plant metabolites in preinfectional and postinfectional resistance. *The Dynamicsof Host Defence*. p 71-122.

Thiviya, P., Gunawardena, N., Gamage, A., Madhujith, T., y Merah, O. (2022). La familia Apiaceae como fuente valiosa de componentes biocidas y sus usos potenciales en la agricultura. *Horticultura.* 8(7), 614. https://doi.org/10.3390/horticulturae8070614

Varela, C. (2008). *Comparación de la resistencia al tratamiento de infecciones urinarias no complicadas a nivel internacional, con historias clínicas de servicio de urgencias del hospital san Ignacio.* [Tesis de post-grado]. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá: Colombia.

Velasco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K., y Velazco, E. (2008). *Manual Práctico de Bacteriología Clínica, Practica 2* Prueba de Susceptibilidad antimicrobiana. 1ª Ed. Mérida, Venezuela. Editorial Venezolana, C.A.

www.bdigital.ula.ve

Verpoorte, R., y Alfermann, A. (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. *Biologia Plantarum*, 45, 388-388. https://doi.org/10.1023/A:1016262910973

Virga, M., y Aguzzi, A. (2020) Farmacología de las infecciones. 1ª edición. Córdoba, Argentina.

Warrier, P., Nambiar, V., y Ramakutty, C. (1994). Indian Medicinal Plants. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(11), 935.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)