



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES
“DR. ANTONIO MORALES MENDÉZ”



**Actividad antibacteriana del extracto metanólico de
Lippia organoides H.B.K. en cepas ATCC**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo de investigación presentado como requisito para Optar al Grado de
Licenciadas en Bioanálisis.

Autores:

Susana Carolina Contreras Quintero

C.I: 21332210

Yusmely Astrid Angulo Ramírez

C.I: 21331146

Tutor:

Prof. Alexis Buitrago, Dr.

Cotutor:

Prof. Janne Rojas, PhD.

Mérida, Marzo de 2021

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por derramar sobre mí bendiciones en cada paso que doy, por darme la fuerza necesaria para salir adelante y permitirme alcanzar esta meta tan anhelada

A mis amados padres Alfonso, Miriam, Isaac y Marlene por brindarme su confianza y apoyo incondicional, por su amor infinito y estar junto a mí en cada paso que doy haciendo más placentero y hermoso el camino recorrido.

A mi amada tía Yoaana por estar para mí siempre ayudándome y apoyándome en todo momento, por brindarme su amor incondicional y ser mi motor y sostén en aquellos momentos de dificultad y por estar siempre junto a mí celebrando cada uno de mis logros como si fuera propio.

Yasmely Angulo

www.bdigital.ula.ve

A Dios y a mis padres, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera, que con su ejemplo, dedicación y amor nunca dejaron de apoyarme. Ellos me dieron la base para poder llegar a ser quien soy ahora. Los amo.

Susana Contreras

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por guiarme en cada paso que doy por brindarme salud, fortaleza, entendimiento y fuerza de voluntad para poder lograr mis objetivos, por haber puesto en mi camino maravillosas personas que han sido apoyo y motivación para hacer posible el cumplimiento de esta meta.

A mis padres Alfonso, Miriam, Isaac y Marlene por todo el apoyo y amor que me han dado a lo largo de la vida, sin pedir nada a cambio.

A mis tíos Yoaana y Franklin todo mi amor, respeto y admiración para ustedes

A mi hermana Yusneidy y mis primos Saray, Leonardo y Sofía por los gratos momentos compadritos durante todo este tiempo sin duda su compañía ha hecho más ameno el camino.

A mis amigos y todas las personas que de una forma u otra han ayudado y estado presente a lo largo del camino, especialmente a mí querida amiga y compañera de tesis Susana por todos los gratos momentos compartidos, por ayudarme y apoyarme incondicionalmente en todos aquellos momentos de adversidad, su amistad durante la carrera ha sido una pieza fundamental para lograr este sueño.

Al Dr. Alexis Buitrago y la Dra. Janne Rojas, por su esfuerzo, apoyo, motivación, horas de dedicación y por los consejos dados

Además quiero expresar mi cordial agradecimiento a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, que me dio todas las herramientas de conocimiento y desarrollo tanto personal como académico.

Yusmely Angulo

A Dios, por siempre guiarme por el camino correcto y cuidar mis pasos para lograr todo lo que me propongo.

A mis padres, mi motivación y mis pilares fundamentales, quienes siempre confiaron en mí y dieron todo de sí para que lograra mis metas, todo lo que soy se lo debo a ellos, mis triunfos son dedicados a ellos, gracias por tanto amor incondicional hacia mí.

A mis tías Elvia, Ilse y Omaira, mis otras madres que estuvieron presentes en este camino, gracias por sus consejos, amor y confianza.

A mis primas Luisa y Reina, hermanas que siempre me apoyan y están cuando las necesito, gracias por ser mis incondicionales.

A mi novio Frank, quien siempre estuvo a mi lado en este camino, apoyándome y brindándome su ayuda cuando lo necesitaba, gracias por siempre confiar en mí y celebrar mis logros como si fueran tuyos.

A mi compañera de tesis y amiga Yusmely, porque juntas con esfuerzo y dedicación logramos lo que tanto soñamos, gracias por ser mi incondicional hermana que me regalo la Universidad.

A mis amigos, que hicieron el camino más cortó con tantos momentos especiales compartidos a lo largo de la carrera.

A mi Tutor Dr Alexis Buitriago y Cotutora PhD Janne Rojas, por su dedicación, paciencia y enseñanzas para lograr esta meta.

A la ilustre Universidad de los Andes, por abrirme sus puertas y permitirme crecer profesionalmente.

Susana Contreras



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES
“DR. ANTONIO MORALES MÉNDEZ”



RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Lippia origanoides* H.B.K. EN CEPAS ATCC

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Lippia origanoides* H.B.K. EN CEPAS ATCC

Autores: Susana Contreras Quintero C.I 21332210
Yusmely Angulo Ramírez C.I 21331146

Tutor: Prof. Alexis Buitrago, Dr.

Cotutor: Prof. Janne Rojas, PhD.

Las sustancias naturales de las plantas sirven como tratamiento de diferentes enfermedades, por la actividad biológica de sus metabolitos secundarios. *Lippia origanoides* es una planta aromática, con excelente actividad antimicrobiana, por tal razón, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad del extracto metanólico de *Lippia origanoides* contra ciertas cepas de referencia internacional. El material vegetal recolectado fue sometido a un proceso de extracción sólido-líquido por maceración en frío utilizando metanol como solvente. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar con discos de papel, utilizando las bacterias de referencia internacional: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); las lecturas de los halos de inhibición realizadas a las 24 y 48 horas de incubación fueron expresadas en milímetros. El ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria permitió establecer que el extracto metanólico de *L. origanoides* a la concentración de 70 mg/mL fue efectiva contra la cepa *S. aureus* con un halo de inhibición 21 mm de diámetro. En ese sentido, podemos concluir que el extracto es una posible fuente de compuestos químicos con efectos sinérgicos sobre este tipo de bacteria grampositiva.

Palabras claves: *Lippia origanoides*, metabolitos secundarios, extracto metanólico, actividad antibacteriana

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO I.....	14
EL PROBLEMA	14
Planteamiento del Problema	14
Justificación de la Investigación	16
Objetivos de la investigación	17
<i>Objetivo General</i>	17
<i>Objetivos Específicos</i>	17
Alcances de la Investigación.....	18
Limitaciones de la Investigación	18
CAPÍTULO II.....	19
MARCO TEÓRIO	19
Trabajos Previos	19
Antecedentes Históricos	22
Bases Teóricas	24
<i>Descripción de la familia</i>	24
<i>Descripción del género y especie</i>	25
<i>Metabolitos presentes en la especie Lippia oreganoides</i>	25
<i>Proceso de Extracción</i>	32
<i>Tipos de extracción</i>	32
<i>Metabolitos secundarios de una planta</i>	33
<i>Función de los metabolitos secundarios en las plantas</i>	34
<i>Fitoquímica</i>	34
<i>Bacterias Gram positivas</i>	34
<i>Bacterias Gram negativas</i>	35
<i>Cepas ATCC</i>	35
<i>Crecimiento bacteriano</i>	36
<i>Mecanismos de resistencia</i>	37

<i>Actividad antibacteriana</i>	37
<i>Pruebas de susceptibilidad</i>	38
Definición de Términos Básicos	39
Operacionalización de variable	40
Hipótesis	41
CAPÍTULO III.....	43
MARCO METODOLÓGICO	43
Tipo de investigación.....	43
Diseño de investigación	43
Población y muestra	44
<i>Unidad de investigación</i>	44
<i>Selección del Tamaño de Muestra</i>	44
Sistema de variables	45
Instrumento de Recolección de Datos	45
Recolección de la Especie Botánica	45
Determinación Taxonómica de las Plantas.....	46
Selección, División y Preparación del Material Vegetal.....	46
Secado, Molienda y Pesada del Material Vegetal	46
Extracción por Maceración del Material Vegetal.....	46
Actividad Antibacteriana	47
Diseño de Análisis	48
CAPÍTULO IV	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
Análisis de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>Lippia origanoides</i>	49
CAPÍTULO V	53
CONCLUSIONES.....	53
RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del carvacrol	26
Figura 2. Estructural del timol	27
Figura 3. Estructura de terpenos.....	27
Figura 4. Estructura de los flavonoides	28
Figura 5. Estructura de los taninos	29
Figura 6. Estructura de la hidroquinona	30
Figura 7. Estructura del esteroI	30
Figura 8. Estructura de las saponinas	31
Figura 9. Estructura de un alcaloide	32

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Operacionalización de la variable dependiente	40
Tabla 2.- Operacionalización de la variable independiente	41
Tabla 3.- Estudio de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la especie <i>Lippia origanoides</i>	50

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las plantas son utilizadas para diferentes fines, en la medicina principalmente se han enfocado en la cura o prevención de diversas enfermedades. Los productos naturales tales como los extractos de plantas o sus compuestos puros, proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevos medicamentos que pueden ser utilizados para el control microbiano (Avello y cols., 2010).

El desarrollo de fármacos comienza con la identificación de los principios activos, utilizando diversos ensayos biológicos para obtener información sobre la capacidad de los compuestos de interés, ya sea obteniendo la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima bactericida. Para determinar la correcta evaluación, existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar las propiedades de dichos extractos, en especial las propiedades antimicrobiana que poseen, a través de diferentes métodos *In Vitro*, principalmente desarrollados en el laboratorio y así establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia (Rivas y cols., 2016).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos. Las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar toxinas de origen microbiano. Como parte de la protección química, una estrategia utilizada por las plantas es la producción de diversos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, antioxidante, entre otras (Sepulveda y cols., 2003).

La especie *Lippia origanoides* es un arbusto aromático, con olor a orégano en la mayoría de los quimiotipos, ocasionalmente cítrico o excepcionalmente inodoro, es un arbusto pequeño, muy ramificado con ramas sub redondeadas y estriadas, el tamaño de la hoja es muy variable según el ambiente en que se desarrolle, esta planta cuenta con excelentes propiedades antimicrobianas por la acción que ejercen los metabolitos secundarios presentes en la planta (García-Barriga, 1992)

Para determinar la capacidad antibacteriana que tienen los extractos, se empleó un método semicuantitativo que permitió establecer el efecto de los metabolitos secundarios sobre algunas cepas bacterianas las cuales pueden provenir de muestras aisladas de pacientes y cultivos de referencia internacional (ATCC). El método se desarrolla en base a la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y que se encuentra sembrado de forma homogénea con el microorganismo a estudiar (Ramírez y Castaño, 2009)

Con base en lo antes expuesto, la presente investigación se desarrolló con el propósito de determinar las propiedades antimicrobianas del extracto metanólico de la especie *Lippia origanoides* en cepas de referencia internacional.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Lippia origanoides es un arbusto aromático, perteneciente a la familia Verbenaceae, nativa de América Central y del noreste de América del Sur, cuyo potencial medicinal se ha investigado ampliamente debido a la gran cantidad de compuestos bioactivos, entre los cuales destacan timol, carvacrol y compuestos fenólicos (Celis y cols., 2007). En Venezuela se ha empleado como tónico contra el dolor de estómago, diarrea, disentería y como remedio contra el resfriado, la gripe, bronquitis y asma (Ramírez y cols., 2011)

Por otra parte, la organización the American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés) se encarga de la recopilación, cultivo y mantenimiento de bacterias altamente resistentes a la esterilización, las cuales son utilizadas para la determinación de la sensibilidad bacteriana. Las cepas ATCC son microorganismos de referencia cuya actividad antibacteriana ha sido verificada para cada disco antibiótico, por lo cual es empleada en el control de calidad de los mismos (Cordova y Loayza, 2014)

Los antimicrobianos constituyen un grupo de medicamentos ampliamente utilizados en el mundo, obtenidos de fuentes naturales o sintéticas para inhibir la supervivencia de diversos microorganismos, son muy eficaces en el tratamiento y control de las enfermedades infecciosas

Los β -lactámicos actúan inhibiendo la última etapa de síntesis de la pared celular bacteriana y constituyen la familia más numerosa de fármacos, ampliamente utilizados a nivel clínico (Marín y Guidol, 2003).

Los metabolitos secundarios son compuestos que poseen bajo peso molecular y tienen gran importancia ecológica debido a su participación en la adaptación de las plantas a su medio ambiente, estos intervienen en el establecimiento de la simbiosis, proceso en el que organismos de otras especies establecen una íntima asociación con la planta para así beneficiarse mutuamente en su desarrollo vital, como es el caso de la atracción de insectos polinizadores y dispersores de semillas y frutos, a su vez, se puede mencionar que una síntesis activa de metabolitos secundarios es inducida cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, como lo es el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados) y el ataque por microorganismos, tales como virus, bacterias y hongos, desempeñando así un papel de defensa contra estas amenazas (Jiménez y cols., 2003).

De igual manera, los metabolitos secundarios le confieren a las plantas propiedades especiales que les permite presentar una defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos. Durante la respuesta hipersensibilidad, algunos compuestos participan activamente eliminando al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa (Jiménez y cols., 2003).

Después de describir la situación del problema de investigación relacionado con el objeto de estudio, en la cual se desea evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto metanólico de las hojas de la especie en estudio;

los autores de esta investigación han formulado el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Lippia origanoides*, la cual se estudiará en el Laboratorio C “Antonio Morales” Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Universidad de Los Andes, desde junio de 2018 hasta marzo de 2020?

Justificación de la Investigación

Los principales problemas de la resistencia microbiana detectados en América Latina, son derivados de las bacterias Gram negativas, principalmente los bacilos no fermentadores. Es importante resaltar que los grados de resistencia pueden variar mucho entre localidades (Casellas, 2011). En general, la multiresistencia se ha desarrollado debido al uso indiscriminado de antibióticos comerciales, comúnmente utilizados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

El interés del hombre por descubrir nuevas estrategias para combatir las bacterias y su resistencia a los antimicrobianos, lo ha llevado a probar nuevas fuentes de antibióticos o sustancias que sirvan para combatirlas. Uno de estos recursos es la fitoterapia, que desde la antigüedad ha sido utilizada como una fuente inagotable de recursos terapéuticos provenientes de las plantas, que tienen como finalidad curar un sin número de enfermedades (Schmidt y cols., 2008)

La proliferación de enfermedades causada por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud pública, es por esta razón que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin. El hombre a través del tiempo ha

encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas, empleando las plantas a nivel alimenticio, industrial y medicinal; convirtiéndose de esta manera en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad (Corzo, 2012).

Los autores seleccionaron este tema de investigación considerando que las plantas herbáceas que pertenece a la familia Verbenácea como es el caso de la especie *Lippia origanoides*, son ampliamente conocidas por su actividad antimicrobiana que es atribuida a la presencia de diversos metabolitos secundarios. Esta propiedad presente en la planta permitirá obtener más información acerca de la capacidad antimicrobiana contra cepas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos de la investigación

www.bdigital.ula.ve

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Lippia origanoides*.

Objetivos Específicos

- ✓ Obtener el extracto crudo de las hojas de la especie *Lippia origanoides* empleando la técnica de extracción sólido-líquido por maceración con metanol.

- ✓ Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Lippia origanoides* utilizando el método de difusión en agar con discos de papel.

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento que se adquiere sobre el fenómeno de estudio. Establece los conocimientos que posee el investigador para lograr los objetivos y de esto depende la estrategia de investigación; así como, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso que serán distintos en estudios con alcance correlacional, descriptivo o exploratorio (Hernández y cols., 2010).

La profundidad que se alcanzó con esta investigación permitió identificar el grado de asociación entre las variables actividad antimicrobiana y el extracto metanólico de la especie *Lippia origanoides* en cepas ATCC, determinando la acción de los metabolitos secundarios presentes en la planta sobre las cepas bacterianas.

Limitaciones de la Investigación

Entre las limitaciones que afectaron el desarrollo de la presente investigación, se encuentra el alto costo para la adquisición de materiales y reactivos, así como también, los constantes cortes eléctricos y el deficiente servicio de internet que retrasó el proceso de investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRIO

Trabajos Previos

Navarrete y cols., (2020) publicaron un estudio titulado: Actividad *In Vitro* de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. Llevaron a cabo dicha investigación con el fin de determinar la actividad antibacteriana de los diferentes extractos etanólicos sobre las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 6380) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Luego de realizar la caracterización fitoquímica evaluaron la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar con disco de papel a las concentraciones de 1 mg/mL y 2 mg/mL; para los extractos activos se estableció la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Los resultados mostraron que *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) fue sensible con *Lantana camara* L. y *Lippia dulcis* T. siendo este último extracto activo también sobre *Proteus vulgaris* (ATCC 6380) con efecto inhibitorio superior al 50%. El extracto de *Lippia dulcis* T. presentó la mayor actividad inhibitoria sobre *S. aureus* (CMI: 1,95 mg/mL). Ningún extracto mostró actividad sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El estudio muestra que productos naturales derivados de plantas medicinales como los extractos etanólicos de *Lantana camara* y *Lippia dulcis*, presentan actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* y *P. vulgaris* y podrían ser alternativa promisorio para tratamiento de infecciones bacterianas

.Vélez y cols., (2019), publicaron un estudio titulado: Fitoquímica de *Lippia citriodora* K cultivada en Ecuador y su actividad biológica. Las muestras vegetales fueron recolectadas en la ciudad de Machala-Ecuador. Con el extracto metanólico determinaron la actividad antibacteriana utilizando la técnica de difusión en agar, empleando las cepas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El procedimiento que propusieron consistió en impregnar discos estériles de papel de filtro (Whatman N° 3) de 5 mm de diámetro con 10 µL de las soluciones de concentración 20 mg/mL y 40 mg/mL obtenidas del extracto.

Posterior a la etapa de incubación, los resultados que obtuvieron fueron clasificados de efectividad baja, media, alta y muy alta. Para el extracto metanólico de las flores a la concentración de 20 mg/mL, observaron una alta actividad antimicrobiana con halos de inhibición de 10 a 15 mm frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, mientras que para *S. aureus* con halos de 6 a 8 mm su actividad fue baja. Para los extractos metanólicos de las hojas a la concentración de 20 mg/mL, el efecto frente a *E. coli* con halos de inhibición de 8 a 10 mm de diámetro presentó una actividad antimicrobiana media, por otra parte para *P. aeruginosa* y *S. aureus* con halos de 10 a 15 mm obtuvieron una alta efectividad antimicrobiana.

Los extractos de hojas y tallos a la concentración de 40 mg/mL, presentaron una actividad antimicrobiana muy alta con un diámetro mayor a 15 mm para las cepas Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa*, así como la Gram positiva *S. aureus*.

Gallegos y cols., (2019) publicaron un estudio titulado: actividad antibacteriana de extractos de orégano (*Origanum* spp.) en bacterias Gram negativas y Gram positivas: El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de orégano en diferentes bacterias. Las plantas de orégano recolectadas en México fueron maceradas con metanol y el extracto obtenido

fue caracterizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, identificando principalmente α -terpineno, limoneno, linalol, timol y carvacrol.

Con relación a la actividad antibacteriana observaron su efecto contra *Escherichia coli* a una concentración de 36 mg/mL, con un halo de inhibición de 6mm de diámetro y para *Streptococcus* sp 4,5 mm de diámetro, para las demás bacterias (*Pseudomonas* sp., *Clostridium* sp., *Salmonella* sp y *Staphylococcus aureus*) su acción inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano no fue significativa.

Giraldo y Mejía, (2017); publicaron un estudio titulado: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama, tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) utilizadas en un producto cárnico madurado fermentado frente a microorganismos, tomando en cuenta los criterios microbiológicos según la norma técnica colombiana (NTC): Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama llevaron a cabo las metodologías de difusión en discos y la prueba de capacidad de especias utilizando las cepas ATCC: *Escherichia coli* (25922), *Salmonella* spp (14028), *Staphylococcus aureus* (25923), *Clostridium* especie (13124) y *Listeria monocytogenes* (13923)

En cuanto a los resultados en la evaluación de la actividad antimicrobiana de la especie orégano en rama por el método de difusión en agar con discos de papel, no obtuvieron inhibición del crecimiento microbiano para ningunas de las cepas estudiadas, indicando que los compuestos químicos presentes en la mezcla de especias no presentaron actividad antimicrobiana. Para la especie tomillo en rama no obtuvieron resultados de inhibición frente a los microorganismos *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, sin embargo para el

microorganismo *Salmonella* obtuvieron una inhibición baja en las concentraciones 10% con halo (HI) de 1,2 mm de diámetro; 7,5% (HI: 0,8 mm); 5,0% (HI: 0,6 mm) y no se logró inhibición en la concentración 2,5%. Los resultados obtenidos con la especie clavo de olor, demostraron que no tiene propiedades antimicrobianas frente a los microorganismos *Clostridium* y *Listeria monocytogenes*, en ninguna de las 4 concentraciones evaluadas, a diferencia de las cepas: *Escherichia coli* que presentó actividad inhibitoria para concentraciones de 10% (HI: 2,3 mm); 7,5% (HI: 1,6 mm); 5,0% (HI: 1,9 mm) y para 2,5% (HI: 0,8 mm). El microorganismo *Salmonella spp* presentó actividad inhibitoria a la concentración de 10% (HI: 4,2 mm); 7,5% (HI: 5,2 mm); 5,0% (HI: 1,2 mm) y 2,5% (HI: 2,2 mm). Por otra parte, frente al microorganismo *Staphylococcus aureus* la especie clavo de olor presentó una actividad inhibitoria de HI de 6 mm de diámetro de halo de inhibición a una concentración del 10% y para 7,5% (HI: 1 mm), las concentraciones de 5,0% y 2,5% no presentaron inhibición.

Por su parte, Barahona (2016) publicó un estudio titulado: Evaluación de la actividad antibacteriana *In Vitro* de dos extractos de plantas de uso medicinal orégano (*Lippia graveolens*) y guayaba (*Psidium guajava*), sobre *Escherichia coli*; causante de colibacilosis en aves domésticas (*Gallus gallus*). El estudio propuesto por el método de dilución mostro un efecto en la inhibición del crecimiento bacteriano de *E. coli* en un 90% para el extracto *Lippia graveolens* y en un 100% para el *Psidium guajava*; a una CIM de 400 400 µg/mL (1%); resultados comparados con el antibiótico de referencia Gentamicina® al 10%.

Antecedentes Históricos

Lippia origanoides es un arbusto silvestre que se encuentra en el nordeste de Suramérica y algunos países de Centroamérica y las Antillas, posee hojas verdes ovadas muy aromáticas e inflorescencias en racimo,

axilares y blancas. Generalmente se le conoce como “orégano” y junto con las especies que son nombradas del mismo modo, presentan como compuestos mayoritarios en su aceite esencial timol y carvacrol. Las infusiones de flores y hojas de esta planta, son consumidas para tratar afecciones respiratorias e intestinales (Oliveira y cols., 2007).

Estudios anteriores han demostrado que la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes antibacterianos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica. Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas, ya que constituyen un recurso para encontrar fármacos ante nuevas afecciones microbiológicas producidas por la resistencia adquirida de los microorganismos y por el aumento de personas inmunodeprimidas (Ramírez, 2007).

Los mecanismos de acción de muchos extractos naturales no se conocen, pero se sabe que deben generalmente su actividad bactericida o bacteriostática al ataque que recibe la membrana celular del microorganismo, hecho que determina que pierda su control e integridad. A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos. En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, se atribuyen fundamentalmente a algunos componentes entre los que destacan: terpenos, aceites esenciales, cumarinas, flavonoides, entre otros (Shiva, 2007).

El género *Lippia* se caracteriza por reunir especies a las que se les atribuyen cualidades aromáticas, variaciones en la composición química de los metabolitos secundarios en plantas de la misma especie, ha conducido a designar quimiotipos, en el caso de *Lippia origanoides* se ha observado cambios drásticos en cuanto a su composición química donde el porcentaje de

carvacrol varía significativamente encontrándose como compuesto mayoritario (Ruiz y cols., 2007).

Uno de los factores ambientales más importantes que influye en la distribución de las plantas es la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Entre los nutrientes se puede mencionar el nitrógeno como el elemento más importante para el desarrollo y crecimiento de las plantas en términos de acumulación de biomasa. En otro orden de ideas, *Lippia origanoides* ampliamente distribuida en zonas semiáridas con suelos secos, posee un alto potencial para el control de patógenos, así como presenta diversas actividades biológicas (Antolines y Rodríguez, 2008).

Bases Teóricas

Descripción de la familia

Verbenaceae son hierbas, arbustos, árboles o lianas; a veces aromáticas con tallos que presentan formas cuadrangulares. Con estípulas ausentes, tienen hojas opuestas ocasionalmente verticiladas o subopuestas simples, tienen un margen entero, aserrado o lobado. Las flores son zigomorfas, usualmente bisexuales, o a veces unisexuales (plantas dioicas), pueden ser grandes y vistosas o muy pequeñas; el cáliz siempre es tubular, actinomorfo o zigomorfo a veces agrandado en el fruto. Los frutos son drupas o esquizocarpos que se dividen en 2-4 núculas encerradas o subtendidas por el cáliz persistente. Las semillas tienen un endosperma ausente. Esta familia está integrada por unos 100 géneros y 3000 especies, distribuidas principalmente en regiones tropicales, subtropicales y templadas del hemisferio Sur, siendo menos numerosas en el hemisferio Norte (Bonifacino y Rossado, 2017).

Descripción del género y especie

El género *Lippia* comprende alrededor de 200 especies distribuidas en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de la América, África y Asia. Su composición química depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento. Se caracteriza por reunir especies a las que se les atribuyen cualidades aromáticas. Sin embargo, aún hay plantas dentro de este género que no han sido lo suficientemente estudiadas para ser incluidas, por su utilidad, en este campo de aplicación. En el caso de *Lippia origanoides*, se trata de un arbusto silvestre cultivado en el nordeste de Suramérica y algunos países de Centroamérica y las Antillas, posee hojas verdes ovadas muy aromáticas e inflorescencias en racimo, axilares y blancas. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos, tales como: *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; por lo cual se ha convertido en un producto de exportación (Henao y cols., 2009).

Metabolitos presentes en la especie *Lippia oreganoides*

Las ventajas en cuanto al uso medicinal de las plantas, se deben a la presencia de los diferentes metabolitos secundarios con efectos farmacológicos en los seres humanos entre los cuales podemos mencionar: carvacrol, timol, terpenos, flavonoides, taninos, hidroquinonas, esteroides, saponinas, alcaloides. La presencia de flavonoides y taninos, así como los alcaloides, proporciona defensa contra insectos, resistencia a parásitos; de allí la gran importancia que presentan desde el punto de vista fitoquímico, con respecto a su amplia acción biológica. Los monoterpenoides, son los responsables de su fragancia y sabor (Henao y cols., 2009).

A continuación se describen los metabolitos secundarios antes mencionados:

Carvacrol

El carvacrol de fórmula $C_{10}H_{13}OH$ (Figura 1) es un alcohol derivado del cimeno. Es un líquido aceitoso, espeso e incoloro, que se obtiene tratando las esencias del orégano con hidróxidos alcalinos. El carvacrol se utiliza en farmacia para la fabricación de perfumes y suplementos para animales, así como para prevenir la oxidación de la carne de consumo humano. Sus efectos son: antimicrobiano, antioxidante y antígenotóxico (Espinoza y cols., 2008).

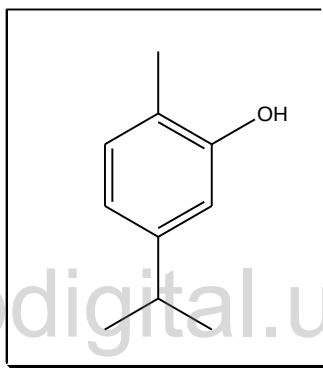


Figura 1. Estructura del carvacrol

Timol

El timol 2- isopropil-5-metilfenol (Figura 2) es una sustancia cristalina incolora con un olor característico que está presente en el tomillo y el orégano. Se utiliza por vía oral en el tratamiento de la bronquitis, tosferina, dolor de garganta, diarrea, dispepsia, gastritis, desórdenes de la piel, diurético y antihelmíntico. Tópicamente se utiliza para prevenir las caries y para combatir la halitosis, para el tratamiento de la alopecia y también forma parte de muchos tratamientos antiinflamatorios. Por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas es utilizado contra la otitis (Kohlert y cols., 2002).

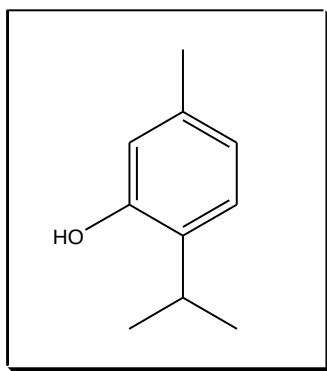


Figura 2. Estructural del timol

Terpenos

Los terpenos son lípidos insaponificables pues en su formación no intervienen los ácidos grasos. También se conocen con el nombre de isoprenoides, pues la unidad estructural con la que están formados es la molécula de isopreno 2-metil-1,3-butadieno (Figura 3). Abundan en los vegetales y en su mayoría son pigmentos, aceites o aromas esenciales y vitaminas (Castaños, 2015).

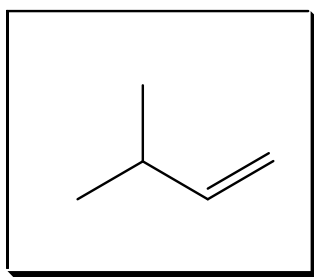


Figura 3. Estructura de terpenos

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y como componente en ciertas bebidas. Estudios indican que algunos flavonoides (Figura 4), poseen acciones antioxidantes, éstas se producen sólo

a dosis altas, tienen efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Martínez y cols., 2002).

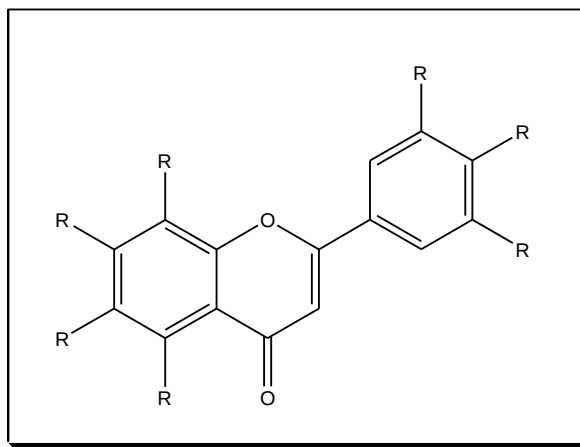


Figura 4. Estructura de los flavonoides

Taninos

Son compuestos fenólicos (Figura 5) solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000 uma. Presentan la capacidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. Tienen un ligero olor característico, sabor amargo y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro (Isaza, 2007).

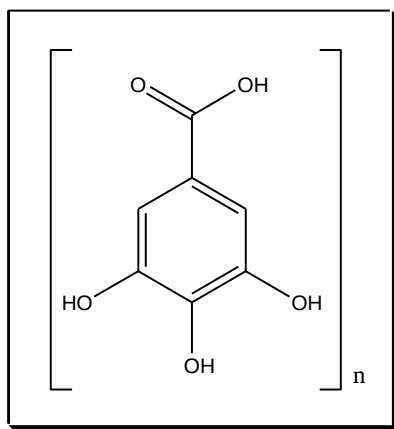


Figura 5. Estructura de los taninos

Hidroquinonas

La hidroquinona es un agente despigmentante tópico, estructuralmente relacionado con la monobenzona (Figura 6). A diferencia de este último, la despigmentación causada por la hidroquinona es reversible. Se utiliza para el blanqueo temporal de condiciones de hiperpigmentadas de la piel como cloasma (melasma). La hidroquinona inhibe la formación de melanina al bloquear la oxidación enzimática de la tirosina para ocasionar 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) en los melanocitos (Sarkar y cols., 2014).

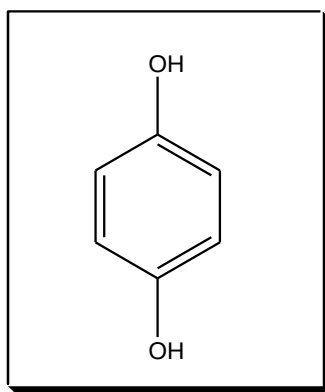


Figura 6. Estructura de la hidroquinona

Esteroles

Reciben su nombre por la presencia un grupo de alcoholes monohidroxílicos policíclicos, el mismo se encuentra ampliamente difundido en el reino animal y vegetal. Las moléculas de estos alcoholes contienen cuatro anillos de carbono, entre ellos tres son hexagonales pero sin carácter aromático. Los esteroides (Figura 7) son esteroides con 27 a 29 átomos de carbono solubles en los disolventes orgánicos, además poseen un elevado punto de fusión (Martínez, 2002)

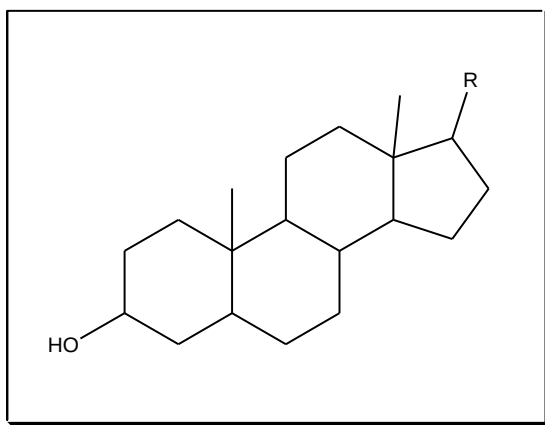


Figura 7. Estructura del esteroide

Saponinas

Las saponinas esteroideas son glicósidos con un núcleo espirostanano (Figura 8) que tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos, las mismas forman abundante espuma cuando se agitan sus soluciones acuosas. La extracción de las saponinas a partir de diversos materiales biológicos ha sido bien documentada utilizando múltiples procedimientos, siendo el agua o alcoholes de bajo peso molecular los principales solventes empleados para su extracción (Hernández y cols., 2005).

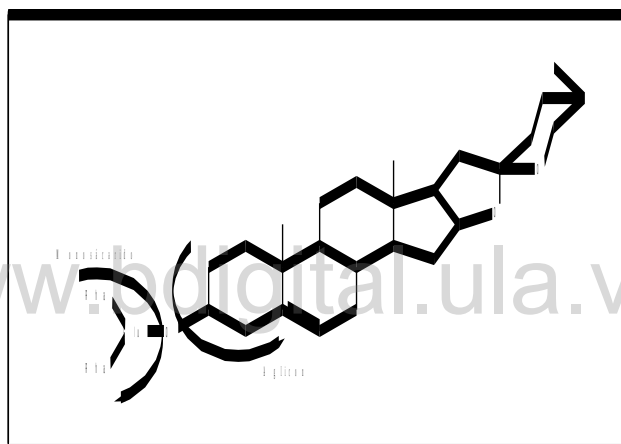


Figura 8. Estructura de las saponinas

Alcaloides

Los alcaloides derivados de ciertos aminoácidos son uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos encontrados en los organismos vivos. Este grupo incluye alrededor de 12000 productos. Los alcaloides se caracterizan porque tiene nitrógeno en su estructura y contiene al menos un átomo de nitrógeno en un anillo heterocíclico (Figura 9). Los mismos se utilizan en la medicina tradicional y se consideran en la actualidad fármacos prominentes. Su clasificación estructural se ha establecido de acuerdo con su origen biogenético (Vargas y cols., 2004)

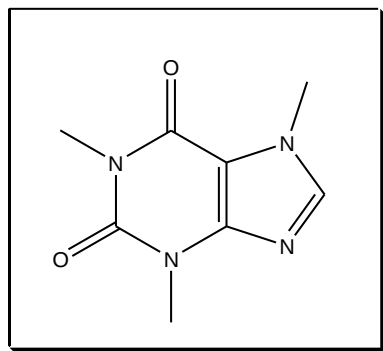


Figura 9. Estructura de un alcaloide

Proceso de Extracción

La extracción consiste en la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, utilizando uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen una diversidad de sustancias químicas. Al embeber la droga con el líquido de extracción se disuelven primero las sustancias a las que el disolvente puede llegar sin obstáculos. Las sustancias que están contenidas en la droga son disueltas y arrastradas de los fragmentos celulares por los disolventes mediante un proceso denominado lavado celular, simultáneamente transcurre el proceso de difusión celular. El tiempo necesario para el equilibrio de concentraciones es parcialmente dependiente de la parte de la planta que se esté utilizando (raíz, hoja, otras) y el grado de trituración de la muestra. La extracción termina cuando se produce un equilibrio de concentraciones (Guerra, 2005).

Tipos de extracción

El proceso de separación puede ser clasificado de acuerdo a la naturaleza del material extraído o por el tipo de fases en contacto, como sólido-líquido, líquido-líquido, entre otros. La separación de sustancias a partir de matrices vegetales se clasifica como extracción sólido-líquido y puede llevarse a cabo a través de diversos métodos como es el caso de la percolación, que

consiste en que el solvente atraviese la masa de droga pulverizada alcanzando concentraciones crecientes de modo que se obtenga componentes solubles de manera progresiva. Otro tipo de extracción es la maceración, que consiste en un contacto prolongado durante cierto tiempo de la planta con el solvente protegiéndose de la luz, constituyendo un conjunto homogéneo, en el cual se disuelven sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular (Carrión y García, 2010)

Entre otros tipos de extracción tenemos la decocción, este procedimiento consiste en llevar la matriz vegetal más el solvente a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable de 15 a 30 minutos. También existe el procedimiento denominado infusión el cual consiste en someter la matriz vegetal previamente humedecida con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua durante cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5%. Por otra parte, la técnica de digestión es una maceración realizada a una temperatura que oscila alrededor de los 50 o 60° C, al aumentar la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión y García, 2010).

Metabolitos secundarios de una planta

Los metabolitos secundarios son compuestos, que tienen una gran importancia ecológica ya que intervienen en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, por medio del establecimiento de simbiosis con otros organismos. Una síntesis activa de los metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como el ataque por parte de microorganismos (virus, bacterias y hongos) y la

competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas. (Rocha y cols., 2003).

Función de los metabolitos secundarios en las plantas

Se encargan de la defensa química contra el daño que ocasionan los cortes y el ataque de los microorganismos patógenos en las plantas superiores. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente inhibiendo el crecimiento de los microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa (Rocha Sepúlveda y Ducoing, 2003).

Fitoquímica

La fitoquímica es la ciencia que estudia cada grupo de la planta, desde su estructura química molecular, hasta las propiedades biológicas de los vegetales. Los fitoquímicos bioactivos son moléculas que presentan funciones ecológicas específicas como: atrayentes o repelentes de animales, pigmentos, función protectora frente a predadores y mecanismos de defensa de las plantas. Químicamente, se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Serrano y Sugrañes, 2017).

Bacterias Gram positivas

Se clasifican por el color púrpura que adquieren después de aplicarles un proceso químico denominado tinción de Gram, pueden observarse en forma de cocos y bacilos. Algunas bacterias grampositivas causan enfermedades, otras normalmente ocupan un lugar específico en el cuerpo, como la piel y son denominadas flora saprófita que por lo general no provocan

enfermedades. Presentan una pared celular que contiene un espacio periplásmico incluido entre la membrana de plasma y una capa gruesa de peptidoglicano. Otra característica de las bacterias grampositivas es la presencia de ácido teicoico dentro de la pared celular (Farrar, 2018).

Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas son aquellas que no se tiñen de color azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, por el contrario adquieren un color rosado tenue y esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la bacteria que está constituida por pocas capas de peptidoglicano y una membrana externa compuesta por lipopolisacaridos, lipoproteínas y fosfolípidos. El peptidoglicano está unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática que contiene una alta concentración de proteínas de transporte. (Tortora y cols., 2007)

Cepas ATCC

La finalidad de las cepas proveniente de la colección americana de cultivos (ATCC, por sus siglas en inglés) de referencia internacional, está basada en la evaluación de la calidad de los medios de cultivo y los desinfectantes, el aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayos y la validación de ensayos microbiológicos de control de calidad. Por ello es necesario asegurar su origen y trazabilidad, contar con procedimientos normalizados para su adecuado manejo, así como preservarlas de modo que mantengan su pureza, viabilidad y características bioquímicas, con el fin de evitar la pérdida de las propiedades que pueden originarse por cultivos repetidos o por generaciones múltiples, la conservación de cepas se basa en un sistema de lotes de siembra en dos niveles, en el cual el lote de siembra de referencia es usado para generar el lote de siembra de trabajo (Del Puerto y cols., 2009).

Crecimiento bacteriano

El aumento del número de bacterias se define como crecimiento bacteriano y es el resultado del aumento del número total de células. En un sistema de cultivo cerrado (sin entrada ni salida de los componentes del sistema), está limitado por el agotamiento de los nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Cuando las bacterias se siembran en el laboratorio en un medio líquido por ejemplo en un tubo de ensayo, se trata de un sistema cerrado de cultivo. Si se toman muestras a intervalos regulares en diferentes tiempos de incubación y se realiza un recuento del número de células viables por mililitro de cultivo, la representación gráfica de los datos (conteo de células viables en función del tiempo) dará la curva de crecimiento característica que consta de cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

Fase de latencia: generalmente, el crecimiento bacteriano no se inicia tras el cultivo en un nuevo medio, notándose esta fase inicial sin grandes diferencias a nivel del crecimiento. Esta fase puede tener varias explicaciones, como diferencias de condiciones entre el cultivo inicial y el nuevo; células que sufrieron daños anteriormente y necesitan un tiempo para recuperar; inoculación de un cultivo antiguo: síntesis de los componentes celulares necesarios para la división celular.

Fase exponencial: todas las células entran en división celular durante un periodo de tiempo que depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio. En esta fase, las células están en su mejor estado de desarrollo, siendo este el momento dispensable para la realización de ensayos científicos. La tasa de crecimiento es afectada por las condiciones de cultivo y también por las características genéticas de los microorganismos.

Fase estacionaria: después de la fase de crecimiento exponencial, puede ocurrir la depleción de uno de los nutrientes esenciales al crecimiento celular

o la acumulación de un producto de metabolismo que impida el crecimiento. De esta forma, las bacterias cesan su crecimiento, entrando en una fase estacionara, durante la cual la tasa de crecimiento es nula.

Fase de declive o de muerte celular: en el caso de que el cultivo bacteriano continúe tras la fase anterior, las células van a acabar por morir, pudiendo inclusivamente ocurrir lisis celular. La muerte celular ocurre a una velocidad mucho menor que el crecimiento bacteriano (Varela y Grotiuz, 2008).

Mecanismos de resistencia

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el Cloranfenicol® por la acetil transferasa y el caso más típico es las β -lactamasas para el grupo del β -lactámicos. Algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función por la generación de otras enzimas (Fernández y cols., 2003).

Actividad antibacteriana

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados en: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar los extractos de plantas con actividad antimicrobiana. Las metodologías aplicadas siempre consideran

la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el fin de evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores para inhibir el crecimiento del microorganismo (Ramírez y Díaz, 2007).

La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en un laboratorio ha sido estandarizada en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC/mL), lo cual equivale a un patrón de 0,5 en la escala de Mac Farland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas. Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de la muestra (Ramírez y Díaz, 2007).

Pruebas de susceptibilidad

El antibiograma es una práctica habitual en el laboratorio de microbiología para la categorización clínica de los resultados de sensibilidad. Consiste en el reconocimiento fenotípico de los mecanismos de resistencia de un microorganismo ante uno o varios antibióticos. En la actualidad las pruebas de susceptibilidad están basadas en la difusión de discos en agar y concentración mínima inhibitoria (CMI), estableciendo puntos de corte con los cuales se diferencian las categorías clínicas de tratamiento, una de dichas categorías denominada sensible, se refiere a que un aislado bacteriano es inhibido por una concentración de un antimicrobiano, teniendo alta probabilidad de éxito terapéutico; la categoría intermedio, es cuando un aislado bacteriano es inhibido por una concentración de un antimicrobiano teniendo un efecto terapéutico incierto; por ultima la categoría resistente, se

refiere a un aislado bacteriano que no es inhibido por la concentración de un antimicrobiano lo que conlleva a una alta probabilidad de fracaso terapéutico. (Cantón, 2010)

Definición de Términos Básicos

Aislamiento: son los mecanismos que impiden que dos especies diferentes se crucen, el aislamiento está basado en barreras ambientales, de conducta, mecánicas o fisiológicas que impiden que dos individuos de dos especies distintas produzcan descendencias viables. (Brumeld y Capparella, 1996)

Agar: es un elemento solidificante empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura de ebullición del agua y se solidifica al enfriarse a 40°C; con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias. (Casado y cols., 2012).

Extracción: la extracción es aquel procedimiento utilizado para separar una sustancia que puede ser disuelta en dos disolventes no miscibles que presentan diferentes grados de solubilidad y que se encuentran en relación a través de una interfase. La relación de las concentraciones que presente dicha sustancia a una determinada temperatura, en cada uno de esos disolventes, será constante y se conoce con el nombre de coeficiente de reparto (Ucha, 2010).

Inóculo: término colectivo para referirse a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, entre otros.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped. El término también se usa para referirse a los organismos simbióticos o patógenos transferidos por cultivos. Es una porción de gérmenes, generalmente, patógenos, que con

un vehículo cualquiera, se transfieren a un organismo o a un sustrato para inocularlos y de esta manera crecen y se reproducen (Tesauro, 2013)

Maceración: consiste en dejar un sólido sumergido en un líquido con el objetivo de ablandarlo o de separar sus elementos solubles. Su procedimiento puede desarrollarse en frío o caliente debido a un proceso de extracción entre materias de diferentes estados físicos de sólido-líquido, en el cual los compuestos químicos de interés se encuentran en la materia sólida, ya que estos poseen solubilidad; se usa un líquido que permita su extracción (Pérez 2018) .

Bacteria: las bacterias son estructuras unicelulares que por lo general son menores a los 5 mm, se reproducen por medio de un proceso asexual denominado fisión binaria que se encuentran constituidas por un conjunto de componentes, los cuales forman el exterior y el interior de este microorganismo procariota. Presentan una envoltura que rodea exteriormente a las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. (Lucana y Huanca, 2014).

Operacionalización de las variables

Operacionalización de variable dependiente: actividad antibacteriana

Tabla 1.-Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana

1. Variable	2. Tipo de Variable	3. Definición Conceptual
Actividad Antibacteriana	Dependiente cuantitativa continua	Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento de cepas bacterianas (Chávez 2018).
4. Definición Operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
La actividad antibacteriana se detecta mediante métodos de difusión en agar con discos de papel.	•Sensible •Sensible intermedio •Resistente	Se observa claramente el halo de inhibición Se observa en menor dimensión el halo de inhibición No hay presencia de halo de inhibición.

Contreras , Angulo y Buitrago (2019)

Operacionalización de variable independiente: extracto metanólico de las hojas de *Lippia origanoides*

Tabla 2.-Operacionalización de la variable independiente

1. Variable	2. Tipo de Variable	3. Definición Conceptual
Extracto metanólico de las hojas de <i>Lippia origanoides</i> .	Independiente cualitativa	Los extractos de plantas medicinales se utilizan desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado (Bueno 2009).
4. Definición Operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
Extracto metanólico provenientes de la maceración de hojas de la planta <i>Lippia origanoides</i>	Compuestos químicos presentes	Presencia de metabolitos provenientes de la planta

Contreras, Angulo y Buitrago (2019)

Hipótesis

Las hipótesis indican lo que estamos buscando o tratando de probar y pueden definirse como explicaciones tentativas del fenómeno investigado formulado a manera de proposiciones. Las hipótesis no necesariamente son verdaderas; pueden o no serlo, pueden o no comprobarse con los hechos. Son refutables. Dentro de la investigación científica, las hipótesis son proposiciones tentativas acerca de la relación entre dos o más variables y se apoyan en los conocimientos organizados y sistematizados (Hernández y cols., 2004).

Hipótesis Alternativa (H(A))

Es posible que el extracto metanólico de las hojas de *L. origanoides* presente actividad antimicrobiana frente a las cepas ATCC, cuyo ensayo se

realizará en el laboratorio C " Antonio Morales Méndez" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde junio de 2018 hasta marzo de 2020.

Hipótesis Nula (H (0))

No es posible que el extracto metanólico de las hojas de *L. origanoides* presente actividad antimicrobiana frente a las cepas ATCC, cuyo ensayo se realizará en el Laboratorio C "Antonio Morales Méndez" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde junio de 2018 hasta marzo de 2020.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Según Frank Morales (2010), existen varios tipos de investigación científica dependiendo del método y de los fines que se persiguen, la investigación es un proceso metódico y sistemático enfocado en generar nuevos conocimientos que sirvan para la solución o respuesta de diversas interrogantes.

En tal sentido, el autor expresa que pueden existir varios tipos de investigación, los cuales pueden clasificarse de diversas maneras, sin embargo es común hacerlo en función de su nivel, su diseño y su propósito, dada la naturaleza compleja de los fenómenos estudiados generalmente es necesario aplicar diferentes tipos de investigación.

Con base en lo antes expuesto, se consideró que el presente trabajo correspondía a una investigación evaluativa ya que tuvo como finalidad, evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las hojas de la especie *Lippia origanoides*.

Diseño de investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En atención al diseño, la investigación se clasifica en: documental, de campo y experimental (Arias 2006)

En ese sentido, el presente trabajo fue una investigación experimental, debido a que el extracto de las hojas de la especie *Lippia origanoides* se sometió a diferentes procesos dentro del laboratorio C “Antonio Morales”, del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, lo que permitió evaluar la capacidad antimicrobiana que posee empleando cepas ATCC de referencia internacional.

Población y muestra

Unidad de investigación

Risquez y cols., (1999), definen la población como un conjunto total finito o infinito de elementos o unidades de observación que se consideran en un estudio, es decir que es el universo de la investigación sobre el cual se pretende generar los resultados.

La población en esta investigación se consideró finita, con respecto al extracto de las hojas de la especie *Lippia origanoides*, el cual se estudió en el Laboratorio C de productos naturales “Antonio Morales”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde junio de 2018 a marzo de 2020.

Selección del Tamaño de Muestra

Según varios autores una decisión importante en cualquier investigación es la selección adecuada del tamaño muestral, dichos autores sostienen que la estimación del tamaño de la muestra puede considerarse un instrumento del que dispone el investigador para evaluar la factibilidad y la necesidad de recursos que presenta un proyecto.

De acuerdo a Hernández y cols. (2003), la muestra en un proyecto de investigación corresponde a un subgrupo de la población de interés sobre la cual se desean recolectar datos, dicha muestra debe ser estadísticamente representativa ya que realizar un estudio con un tamaño de muestra que no

ofrezca un poder estadístico suficiente no es considerado ético para el desarrollo de un proyecto de investigación. Para efectos del presente estudio, se evaluó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de la especie *Lippia origanoides*.

Sistema de variables

Las variables representan a los elementos, factores o términos que pueden asumir diferentes valores cada vez que son examinados, o que reflejan distintas manifestaciones según sea el contexto en el que se presentan. En los trabajos de investigación las variables constituyen el centro del estudio y se presentan incorporadas en los objetivos específicos (Arias 2006)

Esta investigación correspondió a una variable dependiente, ya que la actividad antimicrobiana depende de la eficacia del extracto metanólico de las hojas de la planta contra las diferentes cepas bacterianas en estudio.

Instrumento de Recolección de Datos

Un instrumento de recolección de datos es en principio cualquier recurso del que pueda valerse el investigador para acercarse a los fenómenos y extraer de ellos información. De este modo el instrumento sintetiza en sí toda la labor previa de la investigación, resume los aportes del marco teórico al seleccionar datos que corresponden a los indicadores y, por lo tanto a las variables o conceptos utilizados (Sabino 2010)

Recolección de la Especie Botánica

La muestra vegetal frescas de las hojas de la especie *Lippia origanoides* se recolectó cerca del cementerio Remanso de los Ángeles (8°30'06" N-71°21'33" W) vía San Juan de Lagunillas en el municipio Sucre. El material botánico colectado fue transportado para su procesamiento al laboratorio C de productos naturales "Antonio Morales" del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Determinación Taxonómica de las Plantas

La muestra recolectada de las hojas de *Lippia origanoides* fue identificada por el Dr. Pablo Meléndez. Una muestra testigo fue depositada, en el Herbario “Dr. Luis Ruiz Terán” (MERF), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. La muestra testigo reposa en el inventario bajo el código: JR 61.

Selección, División y Preparación del Material Vegetal

El material vegetal, fue sometido por separado, a un proceso de selección para eliminar las impurezas y partes en descomposición de las hojas. Luego se seleccionó una muestra representativa destinada a la preparación del extracto.

Secado, Molienda y Pesada del Material Vegetal

El material vegetal seleccionado de las hojas de *Lippia origanoides* (1050 g), se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario MERF, a la temperatura no superior a 40°C durante al menos 72 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que la muestra se encontrará libre de humedad y quebradiza al tacto, para luego realizar el proceso de molienda, hasta obtener un polvo fino capaz de traspasar un tamiz de malla número 20. La muestra obtenida con un peso de 280 g se colocó en un envase rotulado y ubicó en un lugar seco y fresco.

Extracción por Maceración del Material Vegetal

La muestra seca y molida de las hojas de *Lippia origanoides*, luego de pesar una cantidad representativa, fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol durante un período de 10 días divididos en dos ciclos de cinco días. El extracto metanólico obtenido se filtró por gravedad y concentró destilando el metanol a presión reducida, utilizando un rotavapor a la temperatura de 40°C. El producto seco se pesó (22 g) y colocó en un envase de color ámbar rotulado

y sellado, conservándose en un lugar seco y fresco.

Actividad Antibacteriana

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo se utilizaron las bacterias de referencia internacional *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). El método empleado experimentalmente permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias frente a una sustancia de origen vegetal (Velasco y cols., 2007). El protocolo experimental que se utilizó se define a continuación.

Preparación del medio de cultivo: Se colocaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton en placas de Petri. Una vez solidificada la placa, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4°C hasta el día del ensayo.

Preparación de los discos: Los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 10 µL del extracto y el solvente de extracción, luego se colocaron por separado en una placa Petri y se esterilizaron bajo luz UV, durante 90 minutos previo al ensayo.

Reactivación de los microorganismos: Las bacterias se mantuvieron en medio de conservación a temperatura ambiente (Weng-Aléman y cols., 2003), a partir de este medio, se reactivaron las cepas y se verificó su pureza.

Preparación de los inóculos: Los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85% p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de la cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton hasta lograr una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Siembra: Los inóculos del microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Seguidamente, se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro impregnados con la muestra, solvente (control negativo) y fármacos de referencia para cada microorganismo (controles positivos).

Pre-incubación e Incubación: Con el propósito de permitir que los componentes presentes en el extracto se difundan adecuadamente sobre el agar inoculado, se realizó una pre-incubación durante 18 h a la temperatura de 4°C. Por otra parte, el crecimiento bacteriano se llevó a cabo incubando las placas a la temperatura de 37°C, durante 48 h.

Lectura de los ensayos: Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 h y 48 h, expresando el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento microbiano alrededor de los discos.

Determinación de la (CIM): Para determinar la concentración mínima inhibitoria se prepararon diluciones a diferentes rangos de concentración y se aplicó el procedimiento antes descrito, el cual, permitió determinar la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CLSI, 2018)

Diseño de Análisis

Según Hernández y cols. (2010), existen dos tipos de enfoques en la investigación estos pueden ser cuantitativos y cualitativos. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. En esta investigación los datos recolectados fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo expresada por medio de una tabla en la que se registrará la actividad antibacteriana mediante la medición de los halos de inhibición y la concentración mínima inhibitoria obtenidas del extracto metanólico de la especie *Lippia origanoides*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Lippia origanoides*

La especie *Lippia origanoides* fue sometida a un proceso de extracción con el fin de evaluar su actividad antibacteriana frente a diferentes cepas de referencia internacional. Para el presente estudio se utilizaron las cepas bacterianas: *E. faecalis* (ATCC 29212) y *S. aureus* (ATCC 25923) *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 23357) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853); utilizado el método de difusión en agar con discos de papel, para el cual se emplearon distintas concentraciones de extracto metanólico (Velasco y cols., 2007).

Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 4 a continuación, en donde, el extracto metanólico de las hojas de *Lippia origanoides* a una concentración de 70 mg/mL fue efectivo contra la cepa *S. aureus* mostrando un halo de inhibición 21 mm de diámetro. Por el contrario, no se observó inhibición en el crecimiento bacteriano contra el resto de las cepas de referencia.

Tabla 4. Actividad Antibacteriana del extracto metanólico de *Lippia origanoides*

Microorganismos	Extracto	Zona de inhibición (mm)*					CIM (mg/mL)
		Antibióticos					
		TS	VA	GM	AZ	CE	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	21mm	40*					70
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	NA		26*				NE
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	NA			34*			NE
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357)	NA				42*		NE
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NA					38*	NE

mm: milímetros; **TS:** Trimetoprim-Sulfametoxazol® (23,7/1,25 µg), **VA:** Vancomicina®(30 µg), **GM:** Gentamicina® (10 µg), **AZ:** Aztreonam® (30 µg), **CE:** Cefepima® (30 µg), **CIM:** concentración mínima inhibitoria; **NA:** no activo; **NE:** no ensayado; *mm: de los halos de inhibición (disco de 6 mm de diámetro)/ promedio 2 ensayos

En otro orden de ideas, los antibióticos son considerados habitualmente como uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes en la historia de la medicina, los cuales son considerados agentes altamente eficaces al modificar la flora bacteriana natural. Los mismos no solamente actúan en nuestra respuesta contra las infecciones sino en otros aspectos de la vida cotidiana, sin embargo, el uso inapropiado de antibióticos generan un incremento en la resistencia bacteriana (Belloso, 2009).

Durante años se han realizado distintas investigaciones empleando plantas, con el fin de obtener alternativas naturales que provengan de dichas fuentes, tal es el caso de la especie *Lippia* que ha sido utilizada en diversos ensayos para determinar sus propiedades antimicrobianas. Basándose en estudios previos, las plantas pertenecientes al género *Lippia* presenta mayor actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas, esto se debe en gran parte a la morfología de la membrana citoplasmática de dichas bacterias (Henao y cols., 2009).

En relación con el estudio realizado por Navarrete y cols. (2020), titulado: Actividad *in vitro* de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas, demuestran

que ningún extracto presento actividad sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, mostró actividad antibacteriana contra *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus* a una CMI de 1,95 mg/mL para ambos casos. Resultado que se relaciona con el presentado en nuestra investigación.

No obstante en la investigación realizada por Vélez y cols., (2019); titulada: Fitoquímica de *Lippia Citriodora* K cultivada en Ecuador. Para el extracto metanólico de las flores preparado a una concentración de 20 mg/mL, observaron su efectividad frente a *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* con halos de inhibición de 10 mm a 15 mm, mientras que para la bacteria *Staphylococcus aureus* su acción fue moderada con halos entre 6 mm a 8 mm. Por su parte, el extracto metanólico de las hojas a la concentración de 20 mg/mL presento un efecto moderado frente a *E. coli* con halos de inhibición de 8 mm a 10 mm de diámetro. Al comparar estos resultados con los de nuestra investigación podemos afirmar que hubo un efecto menor de nuestro extracto con una concentración de 70 mg/mL contra la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Con respecto al estudio publicado por Gallegos y cols., (2019); titulado: Actividad antibacteriana de extractos de orégano (*Origanum* spp.) En bacterias Gram negativas y Gram positivas: La actividad antimicrobiana con extractos alcohólicos de orégano obtuvieron como resultados asociados a sus halos de inhibición un mayor efecto contra *Escherichia coli* (+6 mm) y *Streptococcus* spp. (+4 mm), moderada a baja acción contra *Clostridium* spp. (+2 mm) y *Pseudomonas* spp (+1,5 mm), así como ningún efecto contra *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*; todos estos valores comparados con el fármaco de referencia Cefalexina® y Ceftibuten® (+15 mm). Los resultados presentados por los investigadores antes mencionados, discrepan con los obtenidos en nuestra investigación, en donde se observó efecto inhibitorio contra la bacteria grampositiva *Staphylococcus aureus* y ninguna acción contra las especies bacterianas gramnegativas.

La investigación realizada por los autores Giraldo y Mejía en el 2017, titulada: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama, tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) utilizadas en un producto cárnico madurado fermentado frente a microorganismos criterio microbiológico según la norma NTC, el cual lo realizaron por el método de difusión con discos contra cepas como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Staphylococcus aureus*. Dicha investigación concuerda con la nuestra en que el orégano no presenta actividad antibacteriana frente a *E. coli* ya que no obtuvieron presencia de halos de inhibición, sin embargo nuestra investigación presentó mejores resultados frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ya que obtuvimos un halo de 21 mm y una CIM de 70 mg/mL.

En cuanto al estudio publicado por Barahona en 2016, titulado: Evaluación de la actividad antimicrobiana *In Vitro* de los extractos de plantas de uso medicinal orégano (*Lippia graveolens*) y guayaba (*Psidium guajava*), sobre *Escherichia coli*; causante de colibacilosis en aves domésticas, (*Gallus gallus*) difiere con la presente investigación donde no hubo actividad antibacteriana frente a bacterias de *Escheria coli*, ya que en el mismo presento una inhibición de un 90% sobre el crecimiento de la cepa *E. coli* a la CIM de 400 µg/mL (1%) utilizando el extracto de *Lippia graveolens*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia facultativa grampositiva, causante de infecciones intrahospitalarias, ocasiona una gran variedad de enfermedades desde cutáneas hasta infecciones del tracto respiratorio. Estas cepas bacterianas son resistentes a la penicilina, por lo tanto los antibióticos más eficaces para combatirlos son los aminoglucósidos, la Oxacilina® o la Nafcilina®. En el presente trabajo se comprobó la efectividad de extractos metanólicos de *Lippia origanoides* frente a *S. aureus*, por lo tanto puede ser tomada como alternativa para combatir las afecciones de dicha bacteria.
- No obstante, a pesar de la buena actividad del extracto de *Lippia origanoides* frente a *Staphylococcus aureus*, el mismo no presentó buena actividad antibacteriana contra las demás cepas bacteriana en estudio.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda la realización de ensayos de los extractos frente a cepas bacterianas como *Streptococcus mutans*, puesto que al realizar la revisión bibliográfica del género *Lippia* se pudo conocer que la planta presenta buena efectividad frente a estas cepas.
- Profundizar sobre el estudio de tamizaje fitoquímico de *Lippia origanoides* para comprobar la presencia y efectividad de los metabolitos secundarios presentes en esta especie

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antolines, C., & Rodríguez, N. (2008). Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* y *Lippia origanoides* (Verbenaceae): respuesta a la disponibilidad de nitrógeno. *Revista Acta Biológica Colombiana*, 13(1), 53-64.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación Introducción a la metodología científica*. (6ta ed.). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Avello, L., & Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, 138(10), 1288-1293.
- Barahona, B. (2016). Evaluación de la actividad antibacteriana In Vitro de dos extractos de plantas de uso medicinal orégano (*Lippia graveolens* HBK) y guayaba (*Psidium guajava*), sobre *Escherichia coli*; causante de colibacilosis en aves domésticas (*Gallus gallus*). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Belloso, W. (2009). Historia de los antibióticos. *Revista Hospital Italiano de Buenos Aires*, 29(2), 109.
- Bonifacino, M., & Rossado, A. (2017). Sistemática de plantas vasculares. Verbenaceae. Recuperado de: http://www.thecompositaeht.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/verbenaceae.html [Consulta: 06 de diciembre de 2019]
- Brumeld, R., & Capparella, A. (1996). Genetic differentiation and taxonomy in the house House Wren species group. *Revista The Condor*, 98(5)547-556.
- Bueno, T. (2009). Obtención de extractos a partir de plantas medicinales. Recuperado de: <https://www.monografias.com/trabajos66/extractos-plantas-medicinales/extractos-plantas-medicinales.shtml> [Consulta: 23 de enero de 2020]
- Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Revista Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 26(6), 375-377.
- Carrión, A., & García, C. (2010). "Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica" Ecuador. Universidad de Cuenca.
- Casado, M., Torrico, G., & Medina, M. (2012). Los medios de cultivo en microbiología. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/miltonmartinezherrera/>

mediosdecultivoenunlaboratoriodemicrobiologc3ada-65635025> [Consulta: 15 de noviembre de 2019]

Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6), 519-528.

Castaños E. (2015). Los terpenos.. Recuperado: <<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/07/03/los-terpenos/>> [Consulta: 13 de octubre de 2019]

Celis, C., Rivero, P., Isaza, J., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla dulcis*, especies de la familia Verbenaceae. *Revista Scientia et technica*, 13(33), 103-105.

Chávez, B. (2018). Efecto antibacteriano In Vitro del aceite esencial de las semillas de *Coriandrum sativum* (Cilantro) en cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Perú. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

CLSI. (Estados Unidos). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 28th Edition. [Wayne, PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf> [Consulta: 15 de febrero de 2020].

Cordova, M., & Loayza, R. (2014). Protocolo de control de calidad de la eficacia antibacteriana de los discos antibióticos para pruebas de susceptibilidad. *Revista de Energía Química y Física*, 1(1), 209-240.

Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(3), 81-86.

Del Puerto, C., Iglesias, E., Morales, T., Baños, N., Dolores, M., Carnota, G., & Martinez, R. (2009). Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Revista Vaccimonitor*, 18(1), 20-24.

Espinoza, C., Soto, E., & Müller, A. (2008). THC y Carvacrol son compuestos activos de la marihuana y el orégano común, respectivamente, y tienen usos farmacéuticos y/o industriales. Universidad Tecnológica de Chile.

Farrar, S. (2018). Bacterias Grampositivas. *News medical life sciences*. Recuperado de: <[https://www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Positive-Bacteria-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Positive-Bacteria-(Spanish).aspx)> [Consulta: 04 de noviembre de 2019].

- Fernández, R., Hernández, J., Ponce, L., & Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 44-48.
- Gallegos, P., Delgadillo, L., Esparza, E., & Bañuelos, R. (2019). Actividad antibacteriana de extractos de orégano (*Origanum spp.*) En bacterias Gram negativas y positivas. Universidad Autónoma de Zacatecas Francisco Garcia Salina, México.
- Giraldo, I., & Mejía, V. (2017). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama, tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum vulgare*), clavo de olor (*Syzygium*) utilizadas en un producto cárnico madurado fermentado frente a microorganismos criterio microbiológico según la norma NTC. Universidad Católica de Manizales, Colombia.
- 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. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Henao, J., Muñoz, L., Ríos, E., Padilla, L., & Giraldo, G. (2009). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Lippia origanoides* H.B.K cultivada en el departamento del Quindío. *Revista de Investigación Universidad del Quindío*, 31(19), 159-164.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2003). *Metodología de la investigación*, (5ta Edición), México, McGraw-Hill.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación*, (6ta Edición), México, McGraw-Hill.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2004). *Metodología de la Investigación*. (3ª edición). Colombia. McGraw-Hill.
- Hernández, R., Lugo, E., Díaz, L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey. *Revista Digital Científica y Tecnológica e-Gnosis*, 3(11),1-9.
- Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Revista Scientia et technica*, 1(33), 13-14.
- Jiménez, G., Ducoing, H., & Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Kohlert, C., Schindler, G., & Marz, R. (2002). Disponibilidad sistémica y farmacocinética del timol en humanos. *Revista J Clin Pharmacol*, 42(7), 731.

- Lucana, N., & Huanca, R. (2014). Estructura bacteriana. Revista de actualización clínica investiga, 49, 2589-2593.
- Marin, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. Revista Elsilver, 21:(1), 42-55.
- Martínez, A. (2002). Esteroles. Colombia. Universidad De Antioquia. Medellín.
- Morales, F. (2010). Tipos de investigación. Recuperado: <<https://antropologiaparatodos.wordpress.com/2014/10/02/tips-de-investigacion/>> [Consultado marzo de 2019]
- Navarrete. N., Pita, E., Sánchez, R., Giraldo, S., & Bernal, M. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de Lantana camara L., Petiveria alliacea L. y Lippia dulcis T. frente a bacterias patógenas. Revista Nova, 18(33), 53-71.
- Oliveira, D., Leitão, G., Bizzo, H., Lopes, D., Alviano, D., Alviano, C., & Leitão, S. (2007) Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of Lippia organoides H.B.K. Food Chemistry, 101(1), 236-240
- Ramírez, A., & Díaz, H. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (Rumex conglomeratus). Revista Scientia et technica, 1(33), 397-398
- Ramírez, L., Isaza, J., Veloza, L., Stashenko, E., & Marín, D. (2011). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de Lippia organoides de diferentes orígenes de Colombia. Revista Ciencia ,17(4), 313-321.
- Ramírez, L., & Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et technica, 15 (42), 263-268.
- Rivas, C., Oranday, M., & Verde M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica (pp.351-410). OmniaScience.
- Rocha, S., Sepúlveda, J., & Ducoing, G. (2003). La participación de los Metabolitos Secundarios en la defensa de las Plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(3), 355-363
- Ruiz, C., Tunarosa, F., Martínez, J., & Stashenko, E. (2007) Estudio comparativo por gc-ms de metabolitos secundarios volátiles de dos quimiotipos de Lippia organoides H.B.K., obtenidos por diferentes técnicas de extracción. Revista Scientia et technica, 1(33), 325-326.

- Sabino, C. (2010). Técnicas e instrumentos de recolección de datos. Recuperado de <https://metodoinvestigacion.wordpress.com/2008/02/25/el-proceso-de-investigacion-carlos-sabino/>. [Consulta: 1 de febrero de 2020].
- Sarkar, R; Aror, P; Garg, V; Sonthalia, S; & Gokhale N. (2014) Melasma update. Revista Indian Dermatol, 5(4), 426-35.
- Schmidt, B., Ribnicky, D., Poulev, A., Logendra, S., Cefalu; & Raskin, I. (2008). Una historia natural de la terapéutica botánica. Revista Metabolismo Clinical and Experimental, 57(1). 3-9.
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en las defensas de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 21(3), 355-363
- Serrano, R., & Sugrániz, C. (2017). Fitoquímicos bioactivos, un arsenal terapéutico. Revista NutriNews, 15(4), 210-211.
- Shiva, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona. España
- Tesauro, M. (2013). Inóculo. Recuperado de <https://boletinagrario.com/ap-6,inoculo,2990.html> [Consulta: 28 de diciembre de 2019].
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007) Introducción a la microbiología. Editorial medica Panamericana (9na ed). Buenos Aires.
- Ucha, F. (2010). Definición de extracción. Definición de ABC. Recuperado de: <https://www.definicionabc.com/general/extraccion.php> . [Consulta: 12 de enero de 2020].
- Varela, G; & Grotiuz, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/FisiologiayMetabolismoBacteriano.pdf>. [Consulta: 16 de enero de 2020].
- Vargas, V., Sánchez, P., Canto, B., Gutiérrez, L., Galaz, R., & Moreno O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos: Una revisión crítica. Revista de la Sociedad Química de México, 48(1), 67-94.

- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A., & Rondón, M. (2007). Antibacterial activity of the essential of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*, 2, 85-88.
- Vélez, E; Armas, H; Jaramillo, C; Echavarría, A; & Isitua C. (2019). Fitoquímica de *Lippia Citriodora* K cultivada en Ecuador y su actividad biológica. *Revista Ciencia UNEMI*, 12(29), 9-19.

www.bdigital.ula.ve