



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



FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA ESPECIE
***Verbena officinalis* L.**

www.bdigital.ula.ve

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

Autora:

Diana Carolina Martínez Molina

Tutora:

Prof. Diolimar Buitrago

Mérida, Junio de 2021

DEDICATORIA

A Dios por ser mi motor y compañía en cada lugar, en momentos buenos y no tan buenos, gracias papá Dios por permitirme alcanzar este gran logro, para Ti nada es imposible.

A mi abuelita María Cristina Marquina, te me fuiste justo cuando comencé mi carrea, pero sé que desde el cielo cuida y guías mis pasos, este triunfo es para ti mi ángel.

A mi madre Magaly Molina, por enseñarme el valor de las cosas y lo que significa la humildad, a ti mis gracias infinitas, por estar conmigo cuando más lo necesito y por tu apoyo incondicional, eres la mujer que más amo y admiro tu paciencia y tolerancia. Que Dios te cuide y te proteja y te llene de mucha salud. Este también es tu logro. Te amo mami.

A mi padre Oswaldo Martínez por ser un motivo muy importante que inspira nuestro espíritu al trabajo, luchar y no decaer. Lo logre en el tiempo de Dios. Gracias por confiar en mí a pesar de nuestras diferencias. Este triunfo te lo dedico.

A mi hijo Samuel Pantoja Martínez, mi príncipe llegaste a mi vida cuando menos lo esperaba, fuiste y eres mi motor para salir adelante, quiero que siempre cuentes con mi apoyo incondicional, en las buenas y malas mami estará contigo. Soy lo que soy gracias a ti bebe. Te amo con mi vida.

A mi hermano Oswaldo Martínez, gracias por el apoyo incondicional y tus buenos deseos, eres ejemplo de lucha y constancia. Siempre serás especial. A mis sobrinas María Antonella y María Isabella, espero ser para ustedes un ejemplo a seguir. Las amo.

A la familia Molina, a todos gracias por tanto apoyo y unión, en especial a mi tía Isabel Molina, mi ángel caído del cielo, gracias por el apoyo incondicional, la comprensión, la paciencia y el ánimo de siempre para seguir con la cabeza en alto, gracias por tanto. Este triunfo se los dedico. Los amo.

AGRADECIMIENTO

A Dios por ser maravilloso, el que nos da la fuerza y fe necesaria para mostrarnos que lo imposible era posible de culminar, por mantenernos con ánimo y de pie en esta lucha, en momentos olvidados que con mucho esfuerzo todo se puede.

A mis padres, fuente de inspiración lucha y constancia, por enseñarme que nada es imposible y lo que se quiere se logra. Los amo.

A mi hijo Samuel Pantoja Martínez, por ser mi motor para salir adelante. Te amo.

A mi hermano, por el apoyo brindado, por cada palabra de aliento y por creer en mí.

A mi tutora Prof. Diolimar Buitrago, por su paciencia y colaboración en el desarrollo de esta investigación. Fueron tiempos difíciles, pero con Dios todo se puede y hoy se logró lo que un día vimos lejos. Gracias por todo.

A la Universidad de Los Andes y a nuestros profesores durante toda la carrera por su formación académica y conocimientos adquiridos en nuestro camino para alcanzar hermosa profesión como Licenciada en Bioanálisis.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por brindarnos sus instalaciones y poder llevar a cabo este trabajo de investigación. Especialmente la profesora Ysbelia Obregón e Yndra Cordero.

A todas aquellas personas que de una manera u otra han estado presentes, mis más sentidas palabras para agradecer la ayuda en esta meta cumplida.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
INDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCION	1
CAPITULO I	3
EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación e Importancia de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
CAPÍTULO II	8
MARCO TEÓRICO	8
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	15
<i>Plantas Medicinales</i>	15
<i>Principales productos de las plantas</i>	16
<i>Clasificación de los metabolitos secundarios</i>	17
<i>La familia Verbenaceae</i>	23
<i>Características botánicas de la familia Verbenaceae</i>	24
<i>Distribución mundial de la familia Verbenaceae</i>	24
<i>Especies más importantes de la familia Verbenaceae</i>	25

<i>Usos de la Familia Verbenaceae</i>	25
<i>Género Verbena</i>	26
<i>Distribución geográfica del género Verbena</i>	27
<i>Usos y aplicaciones de la Verbena</i>	28
<i>Especie Verbena officinalis L.</i>	28
<i>Características botánica del género Verbena</i>	28
<i>Fitoquímica de la especie Verbena officinalis L.</i>	29
<i>Actividad farmacológica de la Verbena officinalis L.</i>	36
<i>Toxicidad de la Verbena officinalis L.</i>	36
<i>Bacterias</i>	37
<i>Características generales de las bacterias</i>	37
<i>Bacterias Gram positivas</i>	38
<i>Bacterias Gram negativas</i>	39
<i>Clasificación de agentes antibacterianos</i>	41
<i>Resistencia bacteriana</i>	44
<i>Mecanismos de resistencia natural</i>	44
<i>Mecanismos de resistencia adquirida</i>	45
<i>Extracción de productos naturales</i>	47
<i>Técnicas para determinar la actividad antibacteriana</i>	50
<i>Técnicas para determinar la actividad antibacteriana en extractos</i>	51
Definición Operacional de Términos	53
Operacionalización de Variables	56
Hipótesis	57
CAPÍTULO III	59
MARCO METODOLÓGICO	59
Tipo de investigación	59
Diseño de la Investigación	59
Población y Muestra	60
Sistema de Variables	60

Instrumento de recolección de datos	62
Procedimiento de la investigación	62
<i>Recolección de las Plantas e Identificación del Material Vegetal</i>	62
<i>Obtención y Preparación de los Extractos</i>	62
<i>Determinación de metabolitos secundarios</i>	62
<i>Determinación de la Actividad Antibacteriana</i>	67
Diseño de Análisis	71
CAPITULO IV	72
RESULTADOS Y DISCUSIONES	72
Estudio fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de <i>Verbena officinalis</i> L.	72
Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de <i>Verbena officinalis</i> L.	76
CAPÍTULO V	80
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
Conclusiones	80
Recomendaciones	81
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	82

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Estructura química de los iridoides	19
<i>Figura 2.</i> Estructura química de algunos iridoides.	20
<i>Figura 3.</i> Estructura química de los glucósidos	23
<i>Figura 4.</i> Distribución mundial de la familia Verbenaceae.	25
<i>Figura 5.</i> Hojas e inflorescencias características de las especies del género <i>Verbena</i>	29
<i>Figura 6.</i> Estructura química de Heterósidos.	29
<i>Figura 7.</i> Estructura química de algunos componentes del aceite esencial	30
<i>Figura 8.</i> Estructura química de algunos flavonoides	30
<i>Figura 9.</i> Compuestos químicos de <i>V. officinalis</i> L.	32
<i>Figura 10.</i> Compuestos químicos de <i>V. officinalis</i> L.	33
<i>Figura 11.</i> Compuestos químicos de <i>V. officinalis</i> L.	34
<i>Figura 12.</i> Esquema del procedimiento de la investigación	68
<i>Figura 13.</i> Triterpenos, esteroides en tallo y flor	71
<i>Figura 14.</i> Alcaloides de tallo y flor	71
<i>Figura 15.</i> Taninos en flor y tallo	71
<i>Figura 16.</i> Compuestos fenólicos de hoja y flor	72

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diferencias entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios.	17
Tabla 2. Terpenos y su función para la salud humana.	18
Tabla 3. Polifenoles y su función en la salud humana.	21
Tabla 4. Taxonomía del género <i>Verbena</i>	26
Tabla 5. Especies de género <i>Verbena</i> en Venezuela	27
Tabla 6. Composición química de la <i>Verbena officinalis</i> L.	31
Tabla 7. Operacionalización de la variable dependiente	54
Tabla 8. Operacionalización de la variable independiente	55
Tabla 9. Colección de cepas bacterianas seleccionadas	64
Tabla 10. Antibióticos empleados como control positivo	66
Tabla 11. Rendimiento de recuperación de los extractos	69
Tabla 12. Estudio fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de la <i>Verbena officinalis</i> L.	70
Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de <i>Verbena officinalis</i> L.	73



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“DR. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”



FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA ESPECIE

Verbena officinalis L.

Mérida – Venezuela

Trabajo de Grado

Realizado por:

Diana Carolina Martínez Molina

Tutora: Prof. Diolimar Buitrago

RESUMEN

www.bdigital.ula.ve

Verbena es uno de los géneros más importantes de la familia Verbenaceae, de la cual se han determinado innumerables efectos terapéuticos. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antibacteriana que presentan los extractos de las diferentes partes de la planta *Verbena officinalis* L., y determinar su composición química a través del tamizaje fitoquímico. Se evidenció la presencia de triterpenos, esteroides, alcaloides y taninos en los extractos hidroalcohólicos de tallos y flores, en los extractos de hojas y flores se identificaron compuestos fenólicos. No se observó actividad antibacteriana de los extractos obtenidos frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, mediante el método de difusión en disco de Kirby Bauer. La ausencia de actividad antibacteriana observada podría atribuirse a la falta de difusión de los metabolitos secundarios desde los discos hacia el agar.

Palabras clave: *Verbena officinalis*, Verbenaceae, actividad antibacteriana, fitoquímica.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, el hombre ha recurrido principalmente a las plantas que crecen a su alrededor para mitigar sus dolores y curar sus enfermedades, transmitiendo posteriormente de generación en generación, primero de forma oral y después mediante la escritura, las observaciones y experiencias obtenidas. En sus comienzos, la medicina se desarrolló de manera empírica utilizando principalmente las plantas disponibles en cada parte del mundo y atribuyendo con frecuencia a las mismas un poder sobrenatural, suscitando de sus virtudes terapéuticas toda clase de creencias y supersticiones. Igualmente, se fueron conociendo las plantas tóxicas y narcóticas, empleando las primeras para la caza y pesca y las segundas con fines medicinales y placenteros. A medida que los tiempos fueron evolucionando, el conocimiento sobre las plantas fue aumentando considerablemente. Se dio lugar a la clasificación de las mismas, recibiendo una denominación botánica, se analizaron químicamente, en muchos casos se consiguió aislar los principios activos responsables de su actividad terapéutica, se comprobaron dichas actividades y actualmente es posible conocer el mecanismo de acción de diversos extractos de plantas y componentes aislados de los mismos (Newman, Cragg y Snader, 2000).

Es indiscutible que las drogas vegetales han constituido y siguen constituyendo la materia prima fundamental para la obtención de medicamentos. Asimismo, compuestos químicos sintetizados por las plantas ejercen mecanismos de defensa importantes contra agentes patógenos que las atacan, tales como microorganismos bacterianos, fúngicos e insectos (Ringuelet y Viña, 2013). De modo que muchas investigaciones han sido dirigidas a la obtención de estas sustancias para su aislamiento y posterior estudio de la actividad antimicrobiana que ejercen sobre diferentes especies de bacterias y hongos patógenos para el ser humano.

La *Verbena* es uno de los géneros más importantes de la familia Verbenaceae, de la gran división Angiospermae del Reino Plantae. De la cual se han determinado innumerables efectos terapéuticos (López, Aguilar, Aguilar y Xolalpa, 2017). No obstante, aún existen propiedades medicinales de la misma que faltan por estudiarse, sobre todo en el campo de la fitoterapia, específicamente para la especie *Verbena officinalis*.

Por tanto, el objetivo de este trabajo de investigación fue conocer la composición química preliminar de *Verbena officinalis* como agente antibacteriano, a partir de diferentes extractos obtenidos de la misma, con el fin de evaluar y validar su empleo fitoterapéutico.

El trabajo de investigación se estructuró en cuatro capítulos. El capítulo I. denominado El Problema, está constituido por el planteamiento del problema, la justificación de la investigación, el objetivo general y objetivos específicos, así como los alcances y limitaciones de la investigación. El capítulo II. Correspondiente al Marco Teórico, el cual reúne los trabajos previos, antecedentes históricos o epistemológicos, bases teóricas, definición de términos y operacionalización de variables de la investigación. El capítulo III. Titulado Marco Metodológico se ordenó con 6 subtítulos, diseño de investigación, tipo de investigación, población y muestra, sistema de variables, metodología de investigación y diseño de análisis. En el capítulo IV se compilan los resultados obtenidos del trabajo experimental y su discusión respecto a las bases teóricas planteadas. Por último, se plasman las conclusiones y recomendaciones a las cuales llegó el autor con respecto al análisis de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

A través de los años, los humanos han acudido a la naturaleza para tratar de satisfacer sus necesidades básicas. Las plantas han constituido la base de los sistemas de Medicina Tradicional para mantener la salud e incrementar la calidad de vida del hombre, por cientos de años (Newman y col., 2000). Sin embargo, la incidencia que los productos de origen vegetal han tenido en los procedimientos terapéuticos ha variado a lo largo del tiempo, en buena parte, en relación con los avances del conocimiento científico (Cañigual, 2002).

Paralelo al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés por parte de los investigadores en estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano (Aricapa, 2009).

Para un buen uso de las plantas medicinales es necesario conocer correctamente las especies utilizadas, la forma de preparación y dosificación, así como los cuidados que deben observarse. Muchos de los compuestos presentes en las plantas actúan de modo sinérgico, de manera que la combinación de dos o más especies es condición necesaria para obtener efectos benéficos. En este contexto, la vinculación de la medicina tradicional con la medicina científica a través de la investigación etnobotánica, el estudio de los principios activos y la validación de la actividad terapéutica de las plantas, permite disponer de recursos regionales naturales para el

tratamiento de las enfermedades que afectan comúnmente a la población (Mejía, 1990).

En efecto, la Fitoquímica es un método científico en el cual se aíslan, analizan y purifican los componentes químicos de las plantas y se especifica la estructura química y actividad biológica de las diversas sustancias producidas por los vegetales (Ringuelet y Viña, 2013). Este método se ha utilizado para estudiar las propiedades antimicrobianas de diversas plantas.

La *Verbena* perteneciente a la familia Verbenaceae es uno de los géneros que se destaca por el potencial fitoquímico que presenta y por su uso medicinal en diversas patologías. A esta planta se le han realizado diversos estudios en cuanto a su taxonomía, distribución, composición y actividad antibacteriana, donde se ha demostrado ciertas propiedades de gran utilidad para la medicina alternativa, aunque para algunas especies como *Verbena officinalis* no se ha determinado la actividad antibacteriana en todos sus componentes.

Por otra parte, la mayoría de las especies medicinales pertenecientes al género *Verbena* se emplean para padecimientos relacionados con el aparato digestivo (López, Aguilar, Aguilar y Xolalpa, 2017); así como en el tratamiento de inflamaciones de los ojos y de la garganta, artritis, cálculos renales, fiebre, heridas y llagas (Vega, 2015). Si bien es cierto, muchas de estas patologías están relacionadas con la acción bacteriana, sobre todo con géneros como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cerius*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Murray, 2009; Echeverri, Atehortúa y Robledo, 2009; Forbes, Sahm y Weissfeld, 2007).

Cabe señalar que la *Verbena* es nativa de Sudamérica (Rzedowski y Rzedowski, 2002). Esta planta vegeta en la región andina de Chile o Perú, Guayana, Venezuela, Argentina, en las regiones Sudeste y Sur de Brasil, también, puede ser encontrada eventualmente en Australia y África (Lorenzi, 2000). Por lo tanto, es una planta de fácil obtención en la región de estudio.

Por consiguiente, unificados los aspectos que dieron origen a la problemática de investigación, se formuló el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la composición química de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallos y flores de la *Verbena officinalis*, procedentes del Estado Mérida, y la actividad antibacteriana frente a las cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional?

Justificación e Importancia de la Investigación

Los problemas de salud y el elevado costo de los medicamentos sintéticos han llevado al aumento del uso de la medicina tradicional para tratar enfermedades principalmente en países en vías de desarrollo; es así, como el conocimiento de las plantas medicinales ocupa un lugar preponderante como una de las medicinas alternativas del futuro que garantiza eficacia, seguridad y bajos costos, siempre y cuando sean usadas en forma adecuada y por personal calificado (Cañigüeral, 2002).

En este enfoque las plantas tienen una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos le sirven como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros. Atendiendo a ello el hombre, ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre (Castillo, Pascual, Cunhanune, Lorente, Cañete, 2014).

Al observar la enorme variedad de efectos terapéuticos de distintas especies de la familia Verbenaceae es lógico pensar que existan algunas propiedades medicinales que aún faltan por conocer y esto apertura el interés hacia potenciales aplicaciones que tendría la *Verbena officinalis* en el campo de la fitoterapia. Las especies del género *Verbena* brindan

propiedades medicinales que son de gran provecho para la industria farmacéutica y es por ello que en este trabajo se realizó el estudio de la composición química preliminar y actividad antibacteriana de la especie *Verbena officinalis*.

La contribución del presente estudio se justifica por la necesidad de conocer si los extractos poseen actividad antibacteriana, y discernir cual es el que tiene mejor actividad sobre microorganismos infecciosos. Pudiendo ser de provecho a nivel industrial como materia prima para la elaboración de nuevos productos a nivel farmacológico, contribuyendo en la solución de la problemática existente con los antimicrobianos de origen sintético.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de *Verbena officinalis* L., recolectada en el estado Mérida.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallos y flores de la *Verbena officinalis*.
- Determinar los metabolitos secundarios que se encuentran en la especie *Verbena officinalis* a través del tamizaje fitoquímico.
- Comprobar la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallos y flores de *Verbena officinalis*, mediante el método de difusión en disco de Kirby Bauer frente a las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Los alcances de esta investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que la investigadora pretendió obtener. Por lo tanto, este estudio permitió demostrar si existe o no actividad antibacteriana en los extracto hidroalcohólicos de las hojas, tallos y flores de *Verbena officinalis* en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, en el Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Los resultados permitieron ser la base para futuras investigaciones sobre su uso y aplicación en la elaboración de medicamentos de manera convencional y/o industrial. Asimismo, asentar fundamentos y criterios sobre su campo de acción en relación al efecto antibacteriano en las bacterias seleccionadas.

Por otra parte, se tuvo como principal limitación los recursos económicos para realizar los estudios experimentales, además de los problemas de electricidad, internet, transporte, etc.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que data desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Estrada, 2010).

Mekonnen, Negussie, Tigist y Getnet, (2019) basaron su investigación en la actividad antibacteriana *in vitro* de plantas medicinales con uso en medicina tradicional etíope. Los investigadores probaron extractos de las hojas de *Verbena officinalis* (Vo-80ME), *Myrtus communis* (Mc-80ME) y *Melilotus elegans* (Me-80ME) contra 6 aislados bacterianos utilizando la técnica de difusión de pozos de agar. En cada extracto fueron probadas 3 concentraciones de 10, 20 y 40 mg/pocillo para cada bacteria. La concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) fueron determinadas. El extracto hidrometanólico de las hojas de *V. officinalis* exhibió una actividad antibacteriana prometedora contra *Staphylococcus aureus*, la zona de inhibición fue de 18,67 mm a una concentración de 40 mg/pocillo. Con respecto a las bacterias gramnegativas, Vo80ME exhibió una actividad apreciable contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Sin embargo, se registró una escasa actividad contra

Pseudomonas aeruginosa. Los valores de CIM de Vo-80ME oscilaron entre 0,16 y 4,00 mg/mL. Este extracto de planta también posee metabolitos secundarios que tienen actividad antibacteriana contra una amplia gama de patógenos gramnegativos.

Silverio (2019), evaluó la fitoquímica de la *Verbena litoralis* para determinar flavonoides y glúcidos. Esto lo realizó por el método gravimétrico y técnicas: Prensado, tamizaje fitoquímico, extracción líquido-líquido (extractos: hexánico, metanólico e hidrometanólico). Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico se evidenció presencia de flavonoides y glúcidos, azúcares reductores (Fehling); no se evidenció presencia de glucósidos cianogénicos en *Verbena litoralis* de Costa y Sierra.

Ravines (2019) realizó estudios sobre el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis*, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El estudio se hizo en base a concentraciones de 900, 800, 700 y 600 mg/mL de los extractos para cada una de las plantas, sobre el crecimiento de tres cepas distintas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104). El Método de Difusión en Agar (Método de Kirby Bauer) fue el elegido para realizar las pruebas de susceptibilidad. Los resultados demostraron que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* tuvo efecto inhibitorio tanto en las cepas de *Staphylococcus aureus* como en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, generando halos de inhibición con promedios de hasta 14,2 mm en la máxima concentración. *Curcuma longa* inhibió el crecimiento de todas las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* estudiadas, generando promedios de los halos de inhibición de hasta 7,2 mm. En *Plantago major* el efecto inhibitorio fue reducido, generando promedios máximos de hasta 5,7 mm en *Staphylococcus aureus*. Resultados similares se dieron con el extracto etanólico de *Verbena officinalis*, en dónde el efecto inhibitorio máximo se evidenció en *S. aureus*, con un promedio máximo de

7,22 mm. Con el presente estudio se concluye que los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* tienen efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Abebe, Abebe y Mekonnen (2017), evaluaron la actividad antioxidante y antibacteriana de extractos crudos de la raíz de la *Verbena officinalis* Linn o Atuch. Los investigadores encontraron que los extractos de la raíz en metanol de *V. officinalis* exhibieron actividad antibacteriana prominente contra algunas especies bacterianas. La fracción de metanol mostró máxima actividad antibacteriana contra *S. aureus* (ATCC 25923) con diámetro de $26,5 \pm 0,05$ mm a concentración de 128 mg/mL. No hubo gran diferencia en la zona de inhibición observada en los extractos de raíz de metanol contra bacterias grampositivas como *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*. Pero los extractos de metanol de la raíz de *V. officinalis* no mostraron ninguna actividad contra las bacterias gramnegativas *E. coli* y *K. pneumoniae*. Se encontró que los extractos exhibían marcada inhibición del crecimiento bacteriano en una dosis dependiente. Entre las bacterias, las grampositivas han demostrado mayor sensibilidad hacia los extractos en comparación con las bacterias gramnegativas. Algunas inhibiciones causadas por metanol eran más débiles que las fracciones del antibiótico estándar, pero algunos de los extractos de raíz mostraron actividad más fuerte que el control usado. La fracción de metanol de la planta contra bacterias probadas mostró un buen valor de CIM de 4 mg/mL, 8 mg/mL y 8 mg/mL contra *S. aureus*, *S. pyogen* y *S. pneumoniae*, respectivamente. Mientras que las bacterias gramnegativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) fueron resistentes incluso a 64 mg/mL. En general, el resultado de este estudio demostró que algunas de las bacterias aisladas eran susceptibles al extracto metanólico de raíz de *V. officinalis* en el ensayo de difusión de pozos de agar. Así la planta de *V. officinalis* podría proporcionar formas efectivas de controlar la infección microbiana causada

especialmente por aquellas bacterias grampositivas patógenas resistentes a múltiples fármacos.

Fentahun, Ayele, Amsalu, Alemayehu, y Amsalu, (2017), trabajaron en la evaluación antibacteriana y en el análisis fitoquímico de plantas medicinales contra algunas bacterias entéricas patógenas en Gozamin Distrito, Etiopía. Los investigadores estudiaron los extractos crudos de trece especies de plantas medicinales que se seleccionaron en base a información etnobotánica sobre el uso tradicional aprobado para el tratamiento de enfermedad entérica en el distrito de Gozamin. Todas estas plantas se extrajeron siguiendo métodos estándar de extracción, la actividad se realizó por el método de difusión en pozo de agar, para detectar la posible sustancia antimicrobiana. Todos los extractos crudos de esas plantas medicinales se probaron frente a cepas de referencia estándar que incluyen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhi murium*. La mayor actividad antibacteriana (17 mm) se observó a partir de extracto clorofórmico de las hojas de *Eucalyptus globules* contra *E. coli* y extracto de hojas de *Verbena officinalis* (13,6 mm) contra *Shigella sonnei*, seguido del extracto metanólico de la hoja de *Cordia africana* (12,8 mm) contra *E. coli*. La *Verbena officinalis* fue positiva para todos los compuestos bioactivos probados excepto los alcaloides. En general el extracto de *Verbena officinalis* mostró la mayor potencia contra *Shigella sonnei*. Por lo tanto, este estudio confirmó las fuentes alternativas de medicina para las bacterias entéricas patógenas probadas.

Sun, Wang, Cai, Zhang y Wang (2017), trabajaron en la identificación de la composición química del extracto de *Verbena officinalis* L. por cromatografía líquida de alto rendimiento con matriz de fotodiodos y espectrometría de masas de alta resolución (HPLC-PDA-HRMS), en la cual se detectaron un total de 21 compuestos en el extracto de *Verbena*, utilizando técnicas de separación cromatográfica, datos de espectrometría de masas de barrido completo primario y de etapas múltiples de compuestos detectados mediante

análisis exhaustivo. Se detectaron cicloheximida, flavonoides, triterpenoides, glucósidos, feniletanoides y diterpenoides en extractos de *Verbena*. Los componentes analizados e identificados corresponden al ácido carnósico, carnosol, rosmanol, iso-rosmanol, ácido rosmarínico y acacetina 7 - O rutinosido. Los autores estiman que el método es simple, rápido y preciso, con alta selectividad y fuerte capacidad de discriminación estructural, con alta velocidad, alta eficiencia de detección y buena precisión.

Silverio (2016), evaluó la actividad antimicrobiana de *Verbena litoralis* de Costa y Sierra ante *E. coli*, mediante el método de dilución de extractos (hexánico, metanólico e hidrometanólico), técnica de dilución en agar, donde sí se manifestó crecimiento bacteriano de *E. coli*. Los resultados obtenidos indican que el extracto hexánico de *Verbena* procedentes de la Sierra (1) y Costa (2) presentan mayor actividad antimicrobiana, inhibiendo su crecimiento en las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000; seguido del extracto metanólico de *Verbena* (1) que presentó actividad antimicrobiana en las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000; finalmente el extracto hidrometanólico de *Verbena* (2) presentó mayor actividad en las dos primeras diluciones (1/10 y 1/100), lo que indica que el extracto de *Verbena litoralis* si posee acción antibacteriana.

Mengiste, Mohammed y Getachew (2014), realizaron sus trabajos sobre la actividad antibacteriana *in vitro* y análisis fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de *Verbena officinalis*. El extracto crudo se probó según su actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus* y *E. coli* utilizando el método de difusión en disco. El ensayo antibacteriano se realizó con concentraciones de extracto de 250 mg/mL, 500 mg/mL y 1000 mg/mL. El extracto mostró una zona de inhibición dependiente de la concentración contra las bacterias de prueba. La actividad más fuerte (zona de inhibición más grande 20,38 mm) se obtuvo a una concentración de 1000 mg/mL contra *S. aureus*. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de *V. officinalis* contra *S. aureus* y *E. coli* se determinaron en 0,019 mg/mL y 0,313 mg/mL respectivamente. El

análisis fitoquímico también se realizó con extracto de las hojas de la planta. Se detectaron siete metabolitos secundarios que incluyen cromóforos, polifenoles, saponina, fitosteroles, flavonoides, glucósidos cardíacos y taninos de esta planta medicinal. La actividad antibacteriana observada podría atribuirse a la presencia de estos metabolitos secundarios que se han asociado con diversos grados de actividades antibacterianas. En conclusión, se descubrió que la planta exhibía un nivel significativo de actividad antibacteriana. Se deben realizar estudios *in vivo* para respaldar estos hallazgos y para determinar la seguridad y otros perfiles farmacocinéticos.

Antecedentes Históricos

Sin duda el reino vegetal ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en concreto a aquellas producidas por microorganismos (Domingo y López, 2003).

Esto ha ocurrido desde tiempo inmemorial y numerosas culturas han dejado testimonio de ello al transmitirlos de forma oral, de generación en generación. En otros casos, el conocimiento se transmitió a través de documentos tan antiguos como, por ejemplo, el papiro de Ebers, descubierto por George Ebers en Egipto en 1873; se cree que data de 1502 AC y contiene el registro de la medicina de ese país. En sus inmortales poemas Homero (siglo IX AC) legó los nombres de muchas plantas útiles, como el del meconio (extracto de la “adormidera” o *Papaver somniferum*) con el cual apaciguaban los dolores: hasta la fecha se sigue empleando la morfina, uno de los alcaloides extraído de esta planta, entre otros tantos que se utilizan. Hipócrates (460-377 AC) dejó en sus escritos la descripción de 234 vegetales.

El gran filósofo Aristóteles (384-323 AC) también escribió sobre las plantas que se conocían en su época y el uso que se les daba. Uno de sus discípulos, Teofrasto (al que algunos consideran el padre de la botánica y

que vivió entre los años 372-287 AC), legó seis libros de dicha materia. Sólo por citar uno más se menciona a Pedaneo Dioscórides o Dioscúrides, el cual, en el siglo I, fue médico de las legiones romanas y escribió material médico que estuvo en vigor más de medio siglo, donde enumeró 600 plantas; algunas se utilizan en la actualidad (Waizel y Waizel, 2005).

Por otra parte, en el África Central y América, desde antes del descubrimiento del Nuevo Mundo, se ha podido constatar que todas las poblaciones indígenas también utilizaban plantas como alimentos y para sus variados padecimientos de salud y ritos a sus deidades, entre otros usos (Debs, 1997; Vlietnick, 1987). Actualmente se siguen empleando plantas nativas para propósitos similares (Niering, 1979; Craig, 1999).

No fue hasta el Siglo XIX que la idea primitiva de poder obtener compuestos puros a partir de las sustancias naturales se hizo realidad, cuando el hombre comenzó a aislar los principios activos de las plantas medicinales. Un acontecimiento particular y sobresaliente ocurrió cuando los científicos franceses Caventou y Pelletier descubrieron la quinina a partir de la corteza del árbol de Cinchona (Phillipson, 1995). Este descubrimiento despertó el interés por las plantas del nuevo mundo y se desarrollaron múltiples expediciones hacia sus casi impenetrables junglas y bosques, en la búsqueda de nuevos medicamentos. Desde aquella idea de compuestos puros como medicamentos, finalmente aislados de plantas comúnmente empleadas tales como la estricnina, atropina, colchicina y morfina a principios del Siglo XIX (Newman y col., 2000).

La *Verbena*, junto a otro grupo de plantas entre las que se destaca la *betónica*, estuvo muy relacionada con la brujería y la magia por los pueblos antiguos celtas y germanos de Europa. Ya los romanos y griegos la conocían con los nombres de *herba sacra* y *herbaveneris*, creyendo que tenerla en la casa era señal de buen augurio. En la Edad Media solía ser común bañarse en aguas que contenían ejemplares de *verbena* en la creencia que con ese acto podía vislumbrar el futuro o cumplir sus deseos. Asimismo, formó parte

de varias pociones amorosas y de otras que protegían contra los malos espíritus (Maysa, 2006). Los antiguos médicos le atribuyeron todo tipo de virtudes medicinales; los soldados romanos llevaban habitualmente en sus alforjas tallos de *Verbena* como remedio contra las heridas (Vega, 2015).

La *Verbena officinalis* L. es conocida por diversos nombres como hierba de Santa Isabel, verbena macho, verbena de San Juan, hierba de la ictericia, y también el nombre de “curalotodo”. Tiene propiedades astringentes (por los taninos) que ayudan a la sanación de heridas, también posee efectos antiinflamatorios (por los mucílagos), por lo que resulta ideal para una gran variedad de lesiones. Provoca la circulación de sangre en forma local, lo cual tiene efectos benéficos en las heridas (Condori y Tunque, 2018).

Desde la antigüedad la *Verbena* fue comúnmente usada en Centro y Sur América contra diarrea, fiebre, desordenes gastrointestinales y algunas enfermedades de transmisión sexual, esta especie es una hierba popularmente utilizada como desintoxicante del organismo, además de eso, recientemente han sido publicados trabajos sobre actividad antimicrobiana, antioxidante y sobre la actividad activadora del factor de crecimiento neural presentada por compuestos encontrados en esa planta (Quispe y Rojas, 2013).

Bases Teóricas

Plantas Medicinales

Una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de *droga vegetal*, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, elixir, infusión, jarabe, tintura, ungüento, etc. (Cañigüeral y col., 2003).

En términos generales los productos naturales de las plantas actúan de la misma manera que los fármacos convencionales, o sea, por los principios activos presentes en su composición química. A través de su utilización adecuada se puede lograr una profunda transformación de la salud, con un menor peligro derivado de los efectos colaterales inherentes a los medicamentos farmacológicos (García y Pérez, 2009).

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial como estructuras privilegiadas usando el concepto de farmacología para aquellos productos que son capaces de interactuar con diversas proteínas y realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos. Sin lugar a dudas los productos naturales son estructuras biológicamente validadas a través de la co-evolución con el resto de los seres vivos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Principales productos de las plantas

Las plantas producen muchas sustancias, producto de su metabolismo (fotosíntesis) crean su propio alimento y como producto brindan compuestos de diversa naturaleza, estos compuestos se denominan metabolitos. Existen dos tipos de metabolitos: primarios y secundarios (Tabla 1); los metabolitos primarios no cumplen una función prioritaria en la supervivencia de la planta, se encuentran en grandes cantidades: como aminoácidos que ayudan a formar proteínas, nucleótidos, azúcares y acilglicéridos, son de fácil extracción y colaboran con la formación de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios, también conocidos como fitoquímicos se encuentran en plantas de diversas especies, son sustancias con actividad biológica y son

importantes por sus aplicaciones para elaborar desde medicamentos, insecticidas hasta perfumes, etc. La función básica de los fitoquímicos es ayudar a la planta a protegerse de radicales libres, insectos, parásitos, virus y de los daños que pueda sufrir a lo largo de su vida (Ávalos, Pérez y Carril, 2009).

Tabla 1.

Diferencias entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios

Metabolitos Primarios	Metabolitos Secundarios
Productos del metabolismo general	Productos del metabolismo especial.
Se encuentran distribuidos en plantas y microorganismos	Se biosintetizan a partir del metabolismo primario.
Indispensables para la vida.	No indispensables para la vida
Distribución restringida a ciertas plantas, microorganismos	Distribución taxonómica restringida (a veces característico de un género dado o de una especie).
Aminoácidos de proteínas, monosacáridos, lípidos, ácidos derivados del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, glucósidos, etc.	Alcaloides, terpenos, flavonoides, esteroides, cumarinas, etc.

Fuente: (Ávalos y col. 2009).

Clasificación de los metabolitos secundarios

La clasificación de los fitoquímicos se realiza basándose en su estructura química, así como en la actividad biológica que presenta. Según López, (2017), dentro de los principales compuestos considerados hasta hoy como fitoquímicos se encuentran los terpenos (carotenoides y saponinas), polifenoles (Flavonoides), los fitoestrógenos (isoflavones y lignanos), los compuestos azufrados (glucosinolatos), polisacáridos (glucanos) y los fitoesteroides.

1. Terpenos

Con el nombre de terpenos se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos mas difundidos.

Estos compuestos tienen un origen biosintético común y aunque poseen estructuras químicas distintas. Sin embargo proceden de la condensación de isopreno (2-metil-1,3 butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Los terpenos se los encuentra en alimentos de color verde, productos derivados de soja y cereales. La condensación, mediante unión “cabeza-cola” de los dos últimos precursores de terpenos, origina el geranil-pirofosfato (GPP), que es precursor de un gran número de principios activos vegetales (monoterpenos, iridoides, algunos alcaloides etc.). Así se forman los sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30) (López, Miguel y Aleixandre, 2012).

Entre ellos agrupamos a: Iridoides, saponinas y carotenoides (Tabla 2).

Tabla 2.

Terpenos y su función para la salud humana

FITOQUIMICOS	PROPIEDADES
IRIDOIDES	Amebicida Antiinflamatorio Antimicrobiano
SAPONINAS	Anticancerígeno Antiinflamatoria Hipocolesteromiente
CAROTENOIDES	Antioxidante Prevención de degeneración macular Prevención de enfermedades cardiovasculares

Fuente: (López y col., 2012)

1.1 Iridoides:

Según Silverio (2016), los define como:

Compuestos monoterpénicos bicíclicos (C10), su nombre proviene de unas hormigas australianas (*Iridomirmex* sp) a partir de las cuales se aisló el

iridodial, el compuesto más sencillo de este grupo. Se suelen encontrar en los vegetales en forma de heterósidos, en las familias Gencianáceas y Valerianáceas. Los iridoides pueden encontrarse como estructuras abiertas (secoiridoides), o cerradas (iridoides propiamente dichos) (Figura 1), y generalmente aparecen en forma de heterósidos, mayoritariamente como glucósidos. Estos compuestos presentan propiedades beneficiosas sobre la función hepática y biliar. También han mostrado actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral, y se han utilizado como antídoto en el envenenamiento producido por hongos venenosos del género *Amanita*. Los iridoides son derivados biosintéticos del monoterpene geraniol que presenta como estructura básica común un esqueleto de átomos de carbono, el 1-isopropil-2,3 -dimetilciclopentano, denominado iridano. El núcleo iridano se encuentra frecuentemente fusionado con un heterociclo formado por seis átomos, de los cuales uno es oxígeno, y a este conjunto se le denomina Iridoide (Figura 2).

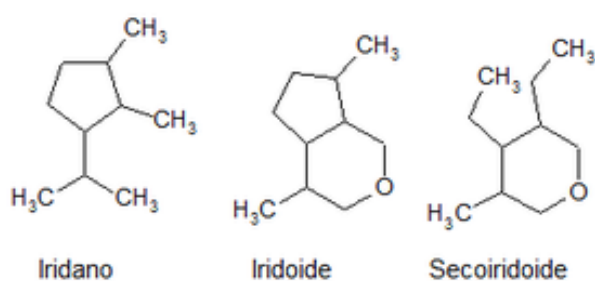


Figura 1. Estructura química de los Iridoides

1.2. Saponinas:

Los saponósidos, conocidos como saponinas, son heterósidos formados por una parte glucídica (con uno o más azúcares) y una genina (parte no glucídica) denominada sapogenina, que puede ser de naturaleza esteroide o triterpénica, de carácter poco polar. Los azúcares más frecuentes constituyentes de los dos tipos de saponósidos son: glucosa, arabinosa,

ramnosa, galactosa y xilosa, y en los saponósidos triterpénicos es frecuente el ácido glucurónico (López, 2001).

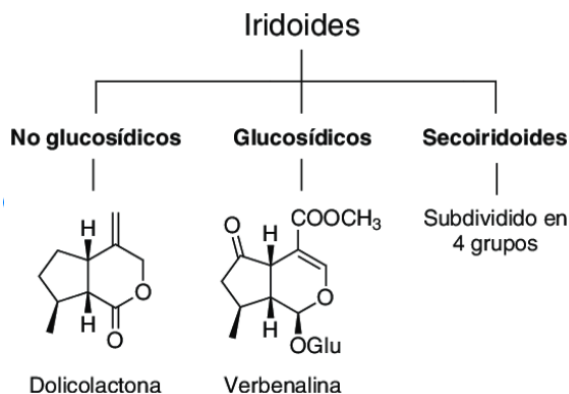


Figura 2. Estructura química de algunos iridoides.

Los saponósidos se caracterizan por su capacidad de producir espuma cuando se agita cualquier solución acuosa que los contenga. La espuma que se forma disminuye la tensión superficial del agua, son tensioactivos naturales. Esta propiedad detergente de las plantas con saponósidos fue explotada por el hombre. Los saponósidos tienen elevado peso molecular y se hidrolizan mediante ácidos (como todos los heterósidos) o, mediante enzimas, obteniendo genina. Su aislamiento en estado puro es difícil. Se extraen con alcoholes o soluciones hidroalcohólicas, luego de una deslipidación previa. Encontrar la concentración de las soluciones se dificulta por la tendencia que tienen para formar espuma (López, 2001).

2. Polifenoles

Son sustancias que tienen un núcleo bencénico que soporta un grupo hidroxilo. Se suelen unir a azúcares para formar heterósidos pero también se pueden encontrar libres. Van desde sustancias muy simples, hasta muy complejas como las ligninas y taninos. Los metabolitos más importantes de

este grupo son los ácidos fenólicos o fenoles, las cumarinas, los flavonoides, los lignanos, los taninos y las quinonas (Tabla 3) (López y col., 2012).

Tabla 3.

Polifenoles y su función en la salud humana

Polifenol	Función
Isoflavonas	Hipocolesterolemizante, Prevención de enfermedades cardiovasculares.
Lignanos	Anticancerígena, Prevención de enfermedades cardiovasculares
Flavonoides	Anticancerígena, Antioxidante, Prevención de enfermedades cardiovasculares
Antocianinas	Antioxidante
Catequinas	Antiagregantes, Antiinflamatorias, Antiulcericas, Antivirales.
Taninos	Antioxidante

Fuente: (López y col., 2012)

2.1 Flavonoides

Son un gran grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien les denominó como "Vitamina P". El Dr. Szent-Gyorgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Los flavonoides son llamados también "fitoprotectores" se concentran en la piel y se encuentran mayormente en frutas maduras y cítricos; derivado de la fenil-benzo y pirona o fenil cromona. Son pigmentos que confieren el color amarillo a las frutas y verduras, se encuentran en las partes más jóvenes y más expuestas al sol porque la luz solar favorece su síntesis. Los alimentos ricos en flavonoides son: soya, espinacas, lechuga, col, verduras y brócoli (Angulo, 1999).

Para los químicos los flavonoides poseen estructura química precisa. De forma general son moléculas con dos anillos bencénicos (aromáticos, para

químicos orgánicos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, algunos autores lo denominan compuestos $C_6-C_3-C_6$. Uno de los flavonoides más comunes: La quercetina (Gross y col., 1990).

Los flavonoides reaccionan con numerosas enzimas y tienen un efecto protector contra:

a) el cáncer modificando la actividad de algunas enzimas, perturbarían la actividad de los cancerígenos y facilitan su eliminación, pueden impedir el crecimiento de las células cancerígenas.

b) las enfermedades cardiovasculares: Neutralizando radicales libres y aumentando la resistencia de LDL-Colesterol al oxidarse.

c) en la circulación sanguínea aumenta la resistencia de los vasos sanguíneos y actúa sobre las plaquetas y la fluidez de la sangre (Angulo, 1999).

3. Glucósidos

Se los puede definir como productos de condensación de azúcares, la porción no azucarada se denomina aglicona o genina. Desde el punto de vista estructural los glucósidos se pueden considerar como acetales internos (Silverio, 2016). La unión entre el aglicón y el azúcar se realiza entre el grupo funcional OH del azúcar y el grupo funcional OH y/o fenólico del aglicón (enlace glicosídico), se forma por la deshidratación del azúcar y de la aglicona. Un grupo hidroxilo de la aglicona se condensa con el hidroxilo del hemiacetal del azúcar, formándose así un acetal interno (Figura 3). Si el grupo O R de la aglicona se encuentra en el mismo sentido estérico que el grupo CH_2OH del carbono 5, la configuración se designa beta; si está en sentido estérico opuesto, se designa alfa (Arraíza, 2018).

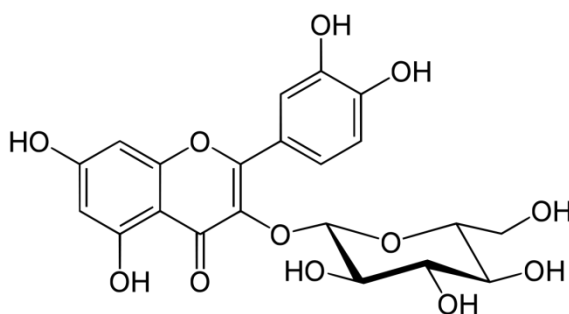


Figura 3. Estructura química de los glucósidos

Es por ello que reciben el nombre de *O*-heterósidos, sin embargo pueden estar presentes los enlaces con nitrógeno (*N*-heterósidos), con azufre (*S* heterósidos) y menos comunes los heterósidos. Pueden existir los alfa y beta glicósidos (Arraíza, 2008). Una de las particularidades de los glucósidos es la susceptibilidad a la hidrólisis, por ende se desdoblan en porciones de azúcar y no azúcar, pudiéndose de tal manera determinar la composición de los glucósidos por medio de los productos en descomposición hidrolítica. Ellos son considerados por su papel importante en la defensa de la planta, pero las investigaciones recientes demuestran roles adicionales como compuestos de almacenamiento de nitrógeno reducido y el azúcar, que pueden ser movilizados cuando son exigidos para su uso en metabolismo primario (Silverio, 2016).

La familia Verbenaceae

La familia Verbenaceae comprende aproximadamente 100 géneros de distribución tropical y subtropical (Joly, 1979), con más de 1000 especies distribuidas en regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios, mayormente en América. Los géneros *Aegiphila*, *Citharexylum* y *Verbena* son los géneros más ricos en especies. Numerosas plantas medicinales

pertenecen a la familia Verbenaceae, además de ser importantes también como plantas ornamentales (López, 1979).

Las especies son hierbas erectas o decumbentes, a veces rastreras, con yemas de renuevo cerca del nivel del suelo. Las flores son hermafroditas, generalmente pequeñas, menores de 10–12 mm. El género *Verbena* es de origen americano (López, 1975).

Características botánicas de la familia Verbenaceae

Planta anual, bienal o perenne, caracterizada por tener una altura oscilante entre 35 y 80 cm (López, 1977).

- Raíz: Fusiforme, blanquecina y ramificada.
- Tallos: El tallo es erecto, rígido, cuadrangular y ramificado en la parte superior
- Hojas: opuestas, escasas, pecioladas y lanceoladas de hasta seis (6) cm de largo, de un color verde apagado y oblongo ovadas. Están divididas profundamente en tres (3) lóbulos. Presentan la superficie arrugada y tomentosa.
- Flores: pequeñas, en espiga alargada y delgada, color lila, apareciendo desde el verano hasta finales del otoño en países de cuatro estaciones.

Distribución mundial de la familia Verbenaceae

Con respecto a su distribución es una familia casi completamente tropical y subtropical con pocas especies de regiones templadas (Heywood, 1985). Rzedowski y Rzedowski (2002) informaron sobre 1000 especies pertenecientes a la familia Verbenáceas, que se presenta en las regiones tropicales de todo el mundo, principalmente en el continente americano. Actualmente se extiende por América tropical y templada, norte de África,

Asia, Europa y en Australia (Figura 4); crece desde el nivel del mar hasta 4000 m.s.n.m. en la región andina de Ecuador, Bolivia y Perú.

En Venezuela se distribuye ampliamente en zonas casi completamente tropical y subtropical con pocas especies en regiones templadas (Heywood, 1985). Sus especies varían desde hierbas, arbustos, trepadoras y árboles de pequeñas hasta grandes dimensiones. Para México se reconocen 26 géneros y alrededor de 286 especies (Willmann, Schmidt, Heinrich y Rimpler, 2000). Verbenaceae es reconocida en el Perú por presentar 23 géneros y 201 especies (López, 1977) entre arbustos, árboles y hierbas, además de lianas y bejucos.



Figura 4. Distribución mundial de la familia Verbenaceae (Heywood, 1985).

Especies más importantes de la familia Verbenaceae

Entre los géneros de Verbenaceae que se destacan por el potencial fitoquímico y por su uso medicinal están *Lippia* y *Lantana* (Pinto, Amorozo y Furlan, 2006), con cerca de 120 y 100 especies respectivamente. Ambos pertenecen a la tribu Lantaneae, donde se incluyen nueve géneros y 275 especies. Desde el punto de vista fitoquímico, Lantaneae es el grupo más importante de Verbenaceae, pues es sólo en él que se encuadran las especies productoras de aceites esenciales (Atkins, 2004).

Usos de la Familia Verbenaceae

Muchas especies de Verbenaceae se utilizan como importantes remedios populares para el tratamiento de varios trastornos de la salud humana, como algunos tipos de cáncer e hipertensión (Ghisalberti, 2000).

Debido a la importancia medicinal o los efectos tóxicos de varias especies de Verbenaceae, se han hecho esfuerzos para desarrollar marcadores que permitan distinguir entre las especies. Algunos de estos esfuerzos se han centrado en estudios anatómicos (Calzada y col., 2014).

Género *Verbena*

Verbena comprende casi 45 especies; el género es mayoritariamente americano con unas pocas especies de distribución mundial. *Verbena* es una hierba perenne, cultivada y comercializada en los mercados locales de Iquitos, usada en la medicina tradicional para muchas afecciones y presenta un alto potencial antioxidante. Según el sistema de clasificación de Adolf Engler, modificado por Hans Melchior (1964). Su clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 4 (Quispe y Rojas, 2013).

Tabla 4.

*Taxonomía del género *Verbena**

Reino	Plantae
División	Angiospermae
Subdivisión	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Verbena</i>

Fuente: (Quispe y Rojas., 2013).

La mayoría de las especies medicinales pertenecientes al género *Verbena*, se emplean para padecimientos relacionados con el aparato digestivo. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de las especies de *Verbena* también se reconocen en este grupo I, otras como *Verbena* sp., *V. menthifolia* y *V. officinalis*, actúan sobre otros sistemas o aparatos, por lo que el género se encuentra distribuido en los diferentes conjuntos formados en el fenograma (López y col., 2017).

Distribución geográfica del género Verbena

Probablemente es nativa de Sudamérica (Rzedowski y Rzedowski 2002). Dentro de este género *Verbena*, existen aproximadamente 250 especies distribuidas preferentemente en las regiones tropicales de América. Esta planta vegeta se encuentra en la región andina de Chile o Perú, Guainas, Venezuela, Argentina, en las regiones Sudeste y Sur de Brasil, también, puede ser encontrada eventualmente en Australia y África (Lorenzi, 2000).

En Venezuela, las especies del género *Verbena* se encuentran distribuidas de la siguiente manera, según López (1977) (Tabla 5):

Tabla 5.

Especies de género Verbena en Venezuela

ESPECIE	NOMBRE COMUN	UBICACIÓN
<i>V. híbrida</i> VossI	Verbena de Jardín	En casi todo el país
<i>V. litoralis</i> HBK	Verbena, Verbena Blanca	Llanos orientales
<i>V. officinalis</i> L.	Hierba Sagrada	Costas de Venezuela
<i>V. trifida</i> HBK	Cinamono, Triana	Llanos orientales
<i>V. valerianoides</i> HBK	Verbena negra	Costas de Venezuela

Fuente: (López, 1977)

Usos y aplicaciones de la Verbena

Actúa benéficamente en el tratamiento de la excitación nerviosa, convulsiones, inflamaciones de los ojos y de la garganta, ciática, lumbago, neuralgia, reumatismo, artritis, gota, fiebre, anemia, cálculos hepáticos y renales, heridas y llagas. En los animales es usado como garrapaticida, según la tradición popular (Mahabir, Gupta y Calderón, 2010).

Sedante, expectorante, antiespasmódico, útil en cefaleas y migrañas, digestivo, estomacal, útil en dolores gástricos, depurativo, excelente estimulante de los intercambios metabólicos y afecciones dérmicas, astringente (Vega, 2015).

Especie *Verbena officinalis* L.

Características botánicas de la especie *Verbena officinalis* L.

Planta perenne, con tallos de 30-60 cm, erectos, de sección cuadrangular y acostillados longitudinalmente, escábridos en los ángulos y laxamente ramificados. Las hojas, opuestas, son más o menos rómbicas, las inferiores de 4-6 x 2-4 cm, peciolados, profundamente incisas, de liradas a 1-2 pinnatífidas. Las inferiores más pequeñas, sésiles y de subenteras a enteras. Las flores se disponen en espigas bracteadas, largamente pedunculadas, de 10-25 cm, solitarias o en panículas muy laxas (Figura 5) (Tobyn, Denham y Whitelegg, 2011). Las brácteas son ovadas acuminadas, ciliadas. El cáliz es tubular y está formado por 4 sépalos soldados en su mayor parte, y la corola, hipocrateriforme, de color rosa pálido, el doble de larga que el cáliz, con forma de embudo que se abre por 5 lóbulos redondeados que forman 2 pequeños labios. El androceo consta de 4 estambres con anteras veras y carentes de filamentos, inclusos, y el gineceo tiene un ovario con 4 cavidades que emite un corto estilo. El fruto es una nuez que se divide en 4 núculas de

1,5-2 mm, de color pardo rojizo y con 4 o 5 costillas longitudinales en el dorso. Florece de junio a septiembre (Vera, 2009).



Figura 5. Hojas características de las especies del género *Verbena* (Vega, 2015).

Fitoquímica de la Especie *Verbena officinalis* L.

Está compuesta por heterósidos, fenilpropanoides, aceites, flavonoides y otros como carbohidratos, carotenos, saponinas, alcaloides, ácidos y taninos (Maysa, 2006).

- a) Heterósidos (Iridoides) (0,2-0,5 %): *hastatósido* (0,08 %), *verbenalósido* (*verbenalina*) (0,15 %), *dihidroverbenalina* (0,01 %) y *acubósido* (Figura 6).
- b) Fenilpropanoides heterosídicos: *verbascósido* (0,8 %), *eukuvósido*, el primero derivado del ácido cafeíco.

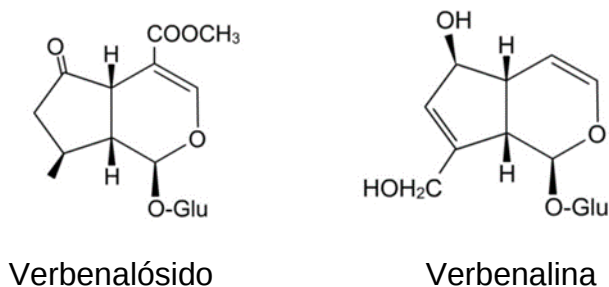


Figura 6. Estructura química de Heterósidos.

- c) Aceite esencial (0,3 %) compuesto principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, como limoneno (7,5 %), 1,8-cineol (7,5 %), arcurcumeno (6,0 %) epoxicariofileno (7,5 %), espatulenol (10,8 %), citral, geraniol y verbeneno (Figura 7).

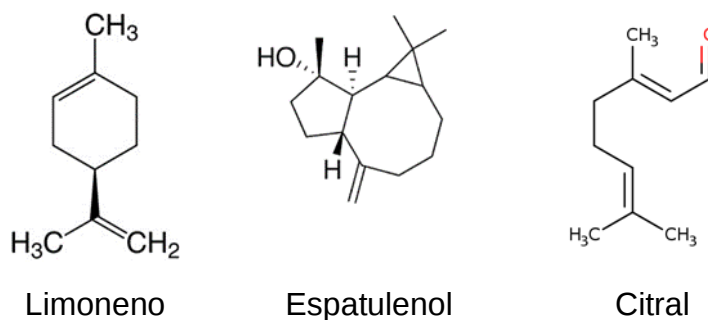


Figura 7. Estructura química de algunos componentes del aceite esencial

- d) Flavonoides, aglicones: artemitina, sorbifolina, pedalitina, nepetina como heterósidos (7-O- β -D-glucuronopiranosil-apigenina) (Figura 8).

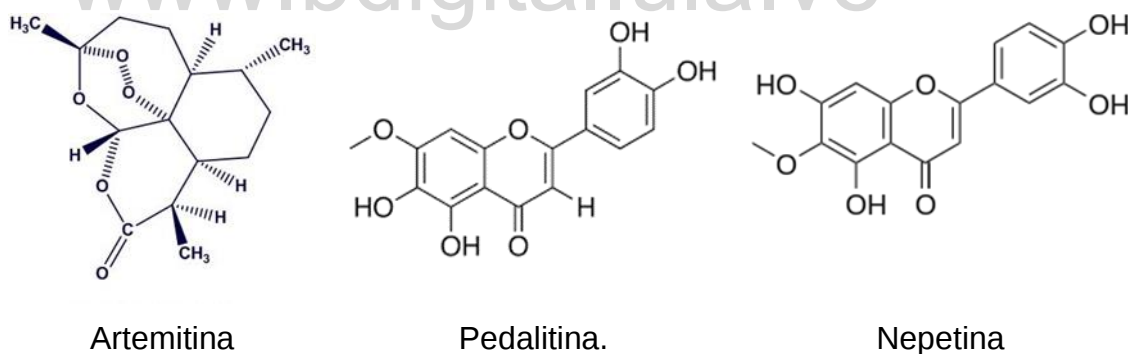


Figura 8. Estructura química de algunos flavonoides

- e) Otros constituyentes: carbohidratos (mucílagos), β -caroteno, saponinas, taninos, ácidos y alcaloides (vincamina) (Maysa, 2006).

En la Tabla 6 y en las figuras 9,10 y 11 se muestran los compuestos de la composición química del extracto de *Verbena officinalis* L. identificados por Sun y col. (2017).

Tabla 6.
Composición química de la Verbena officinalis

N°	Compuesto	Formula	Fitoquímico
1	Hastatosido	$C_{17}H_{24}O_{11}$	Glucósido Iridoides
2	Verbenalina	$C_{17}H_{24}O_{10}$	
3	Quercetina-3-O-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{12}$	Glucósido Flavonoide
4	Verbascosido	$C_{29}H_{36}O_{15}$	Glucosido feniletanoide (de rizoma)
5	Luteolina-7-O-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{11}$	Glucósido Flavonoide
6	Isoverbascósido	$C_{29}H_{36}O_{15}$	Glucosido feniletanoide
7	Pediaitina-6-O-glucósido	$C_{22}H_{22}O_{12}$	Glucósido Flavonoide
8	Ácido rosmarínico	$C_{18}H_{16}O_8$	Diterpeno fenólico
9	Apigenina-7-O-glucósido	$C_{21}H_{20}O_{10}$	Glucósido Flavonoide
10	4'-hidroxilwogonosido (4'-hidroxianarina)	$C_{22}H_{22}O_{11}$	Glucósido Flavonoide
11	Acacetina-7-O-rutinósido (Antocianina)	$C_{28}H_{32}O_{14}$	Glucósido Flavonoide
12	Luteolina	$C_{15}H_{10}O_6$	Aglicona flavonoide
13	Isorosmanol	$C_{20}H_{26}O_5$	Diterpeno fenólico
14	Rosmanol	$C_{20}H_{26}O_5$	Diterpeno fenólico
15	4'-hidroxilwogonina (4'-hidroxianol baicalina)	$C_{16}H_{12}O_6$	Aglicona flavonoide
16	Apigenina	$C_{15}H_{10}O_5$	Aglicona flavonoide
17	Carnosol	$C_{20}H_{26}O_4$	Diterpeno fenólico
18	Ácido barbinervico	$C_{30}H_{48}O_5$	Triterpenoides
19	Ácido carnósico	$C_{20}H_{28}O_4$	Diterpeno fenólico
20	Ácido ursólico	$C_{30}H_{48}O_3$	Triterpenoides
21	Ácido oleanólico	$C_{30}H_{48}O_3$	Triterpenoides

Fuente: Sun y col. (2017)

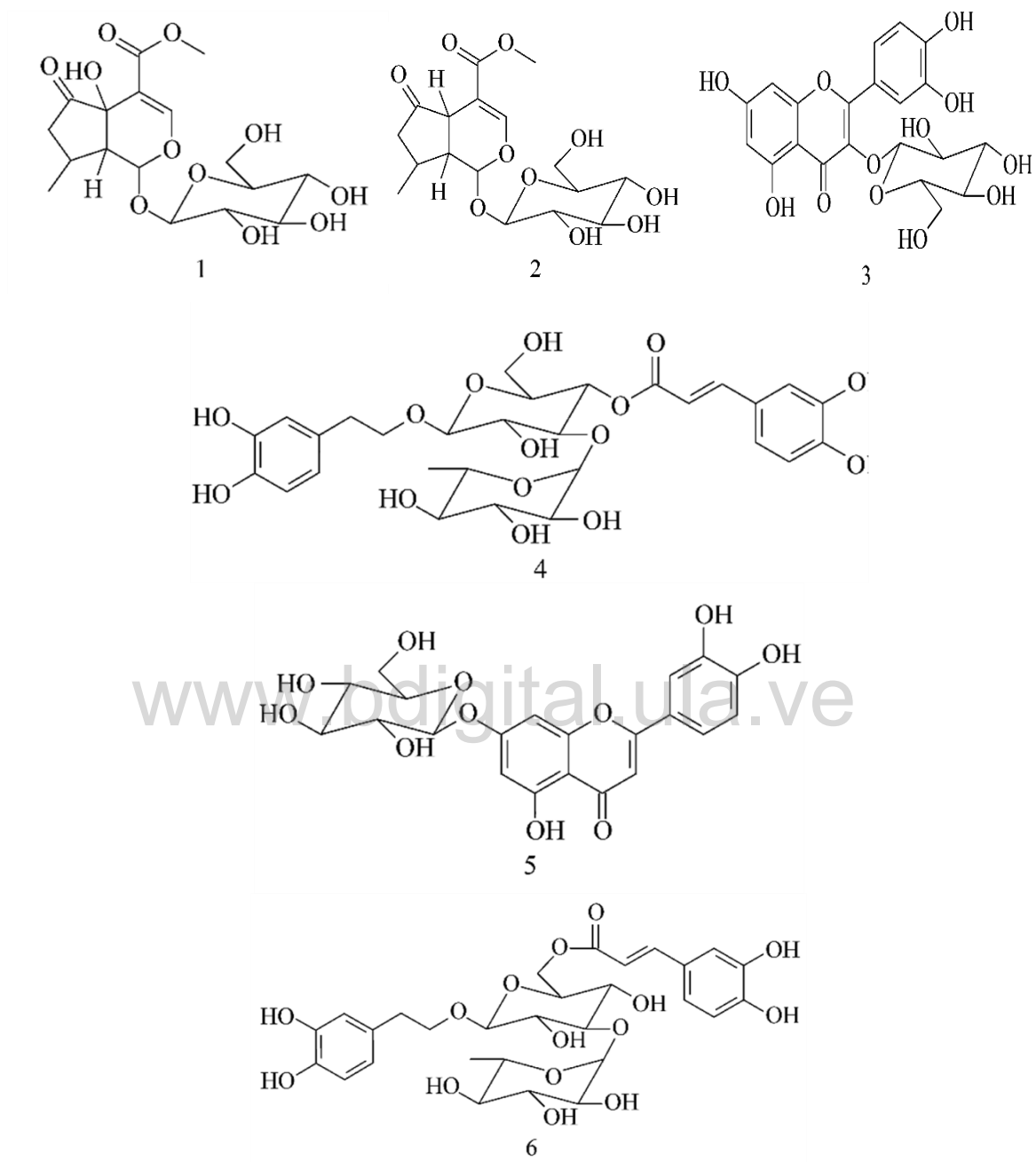


Figura 9. Compuestos químicos de *V. officinalis*. 1. Hastatosido; 2. Verbenalina; 3. Quercetina-3-O-glucósido; 4. Verbascosido; 5. Luteolina-7-O-glucósido; 6. Isoverbascósido.

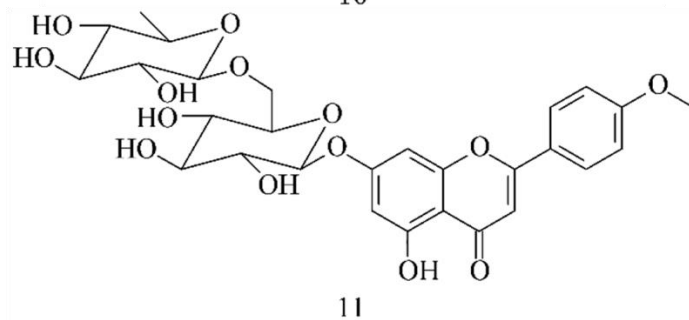
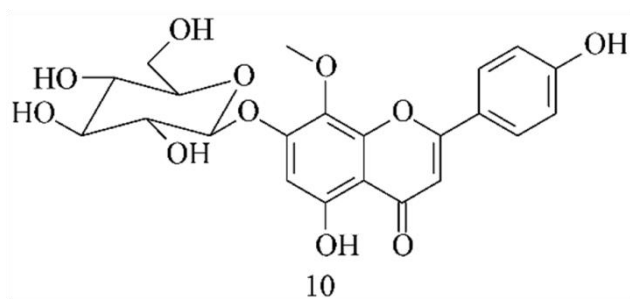
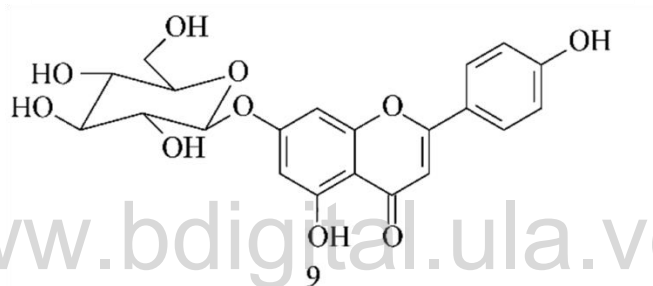
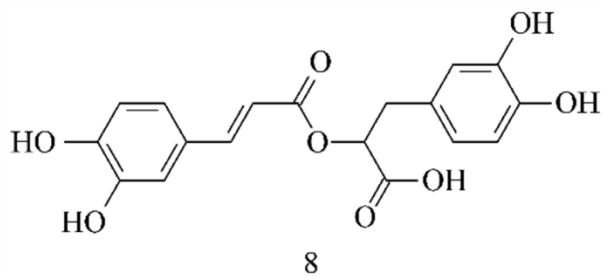
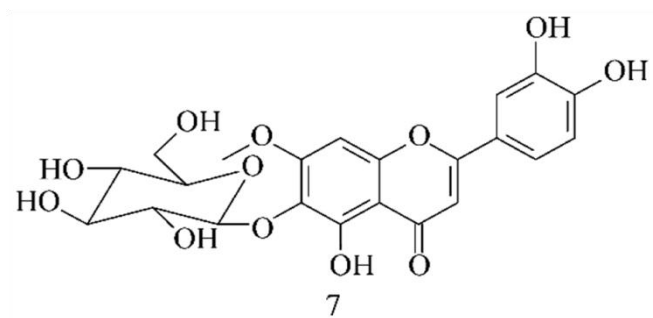


Figura 10. Compuestos químicos de *V. officinalis*. 7. Pediculetina-6-O-glucósido; 8. Ácido rosmarínico; 9. Apigenina-7-O-glucósido; 10. 4'-hidroxil wogonosido; 11. Acacetina-7-O-rutinósido

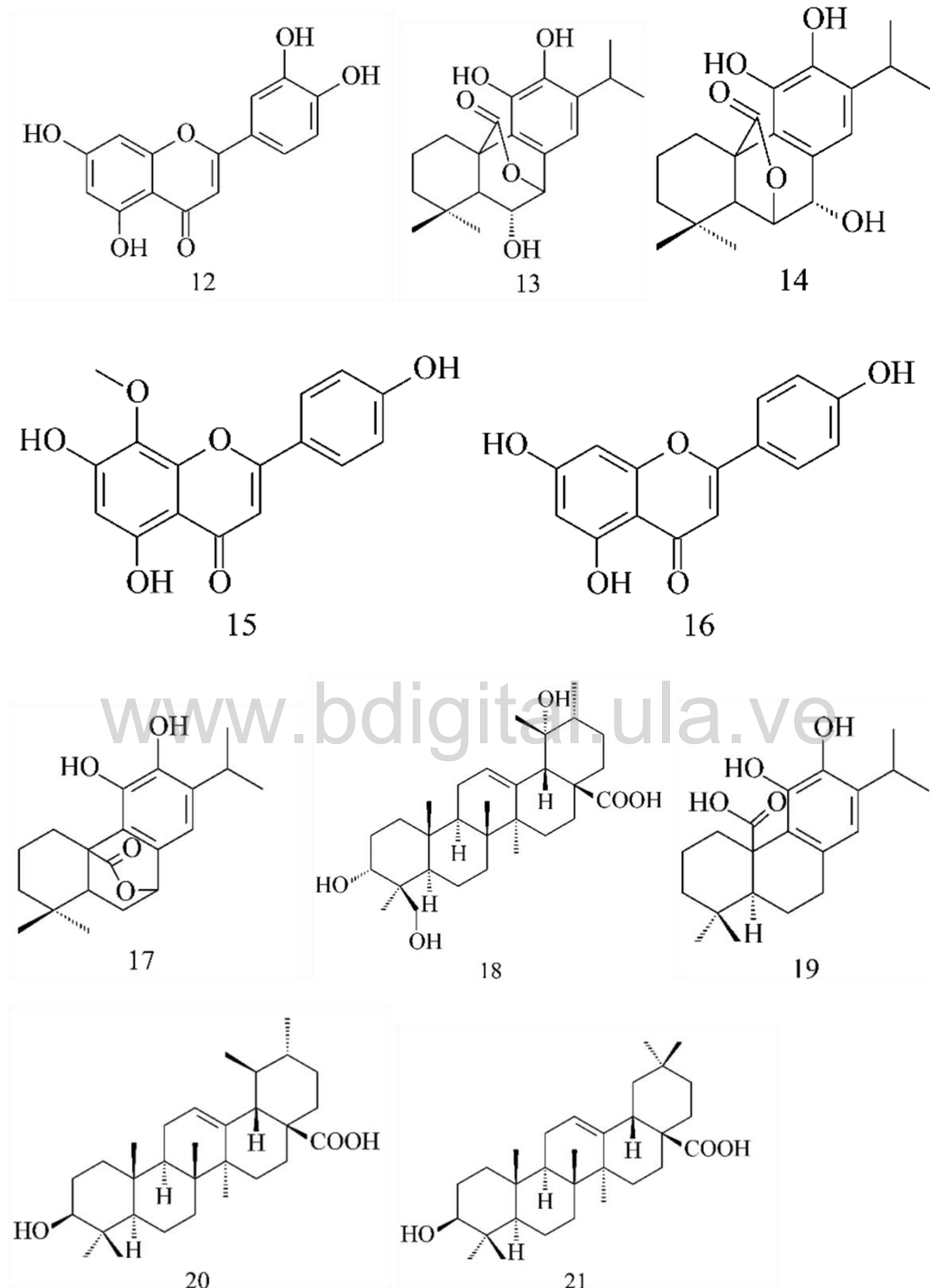


Figura 11. Compuestos químicos de la *V. officinalis*. 12. Luteolina; 13. Isorosmanol; 14. Rosmanol; 15. 4'-hidroxil wogonina; 16. Apigenina; 17. Carnosol; 18. Ácido barbinervico; 19. Ácido carnósico; 20. Ácido ursólico; 21. Ácido oleanólico

Actividad farmacológica de Verbena officinalis

El aceite esencial obtenido de la parte aérea posee actividad antioxidante, antibacteriana y proapoptótica. Además, se ha comprobado que el extracto metanólico de las hojas presenta efecto antifúngico, mientras que el extracto acuoso de la planta muestra actividad neuroprotectora (Fahmi, 2013). Se menciona que el extracto hidroalcohólico refuerza la actividad anticoagulante de la warfarina (Argento y col., 2000). Un estudio realizado en el Valle de Tafi (Tucumán-Argentina) muestra que los flavonoides mono y dihidroxilados de la *Verbena* tienen acción antibacteriana sobre grampositivos y gramnegativos (Hernández y col., 2000).

Toxicidad de la Verbena officinalis.

Los extractos de *Verbena officinalis* pueden presentar una cierta acción hipotiroidea (disminuyen la actividad del tiroides) por lo que pueden bloquear la acción de determinadas hormonas. Está prohibido su uso en mujeres embarazadas porque el verbenalósido (heterósido irioideo que se hidroliza en verbenalol) puede causar un efecto uterotónico y dificultar las contracciones características del parto. Dosis elevadas de verbenalina provocan la parálisis del sistema nervioso central, lo que causa la aparición de estupor y convulsiones (Díaz y Vargas, 2017).

Bacterias

Características generales de las bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las

bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Araque y col., 1999).

Por la necesidad, o no, que tienen de oxígeno también se distinguen entre: Aerobias estrictas, cuando dependen del oxígeno. Anaerobias estrictas, cuando se desarrollan en ausencia total de oxígeno. Anaerobias facultativas, pueden desarrollarse con o sin oxígeno. Microaerófilas, cuando solo pueden desarrollarse en bajas tensiones de oxígeno y altas de dióxido de carbono (Castro, 2012).

Las bacterias, según la coloración que adopten (de acuerdo a la técnica de tinción de Gram), se agrupan en dos categorías, grampositivas (se observan de color morado) y gramnegativas (adoptan un color rojo a rosado). Para comprender esta diferencia en coloración, se debe explicar la composición química de cada grupo de bacterias (Volk, 1996).

Las grampositivas poseen una pared gruesa compuesta por 90 % de peptidoglicanos y el resto de polisacáridos, tales como ácidos teicóicos y ácidos teicurónicos. Los ácidos teicóicos son polímeros de polifosfato unidos por enlaces tipo éster (fosfodiéster, glicerolfosfato o ribitolfosfato). Por su parte los ácidos teicurónicos, son polisacáridos del tipo ácido urónico, los cuales son responsables de la clasificación serológica, la asimilación selectiva de cationes, reserva de fosfatos, adhesión de bacteriófagos y el control de la actividad autocatalítica de la bacteria. Estas bacterias tienen la particularidad de no poseer membrana externa y son capaces de retener el colorante específico. Por otro lado, las bacterias gramnegativas presentan una pared celular compleja, la cual presenta dos capas, la externa y la interna. La capa externa está compuesta por lipopolisacáridos y un 10 % de peptidoglicanos mientras la capa interna está formada por fosfolípidos,

lipoproteínas (también llamadas muerinas y se encargan de unir la capa de fosfolípidos con los péptidoglicanos), porinas (permiten la difusión de solutos neutros y cargados con pesos moleculares menores a 600 Dalton (D) y otro grupo de proteínas, las cuales facilitan el transporte de moléculas mayores a 600 D, a través de la membrana externa. Debido a que la capa de peptidoglicano es delgada no es capaz de retener el colorante de allí su diferencia con las grampositivas (Volk, 1996).

1. Bacterias Gram positivas

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus* está formado por cocos grampositivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre) (García, García, y Salazar, 2014). Está implicada con el síndrome de piel escaldada (descamación diseminada del epitelio, generalmente en lactantes), shock tóxico (intoxicación multisistémica), impétigo, foliculitis, forúnculos, carbuncos, bacteriemia, endocarditis, neumonía, osteomielitis, artritis séptica, entre otras (Murray, 2009).

Enterococcus faecalis

Son bacterias grampositivas, bajo el microscopio pueden observarse en cadenas o parejas cortas, no tienen cápsula ni forman esporas y son anaerobios facultativos (pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno). Forman parte de la microbiota gastrointestinal del ser humano y animales, esencialmente en yeyuno e íleon. Tienen la capacidad de causar infecciones

dentro y fuera de sitios hospitalarios. Evidentemente, las infecciones nosocomiales son las más comunes, por lo que los pacientes que están sometidos a procedimientos intrahospitalarios (diálisis, hemodiálisis, cirugías), así como a largas estancias hospitalarias, son los más afectados (Arredondo y col., 2018).

2. Bacterias Gram negativas

Klebsiella pneumoniae

Esta especie, está provista de una cápsula prominente que le confiere el aspecto mucoso a las colonias aisladas y mayor virulencia *in vitro*. Se encuentra implicada de forma poco frecuente en patologías respiratorias como neumonía lobular primaria, donde la bacteria destruye y necrosa los espacios alveolares provocando la formación de cavidades y producción de esputo hemoptísicos y en algunos casos en infecciones del tracto urinario, heridas y tejidos blandos (Asensio, 2000).

Desempeña un importante papel como causa de enfermedades infecciosas oportunistas. Está implicada principalmente en infecciones nosocomiales como infección del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas. Son especialmente susceptibles los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos y neonatos (Echeverri y col., 2009).

Escherichia coli

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Vilariño, 1988).

Morfológicamente, las colibacterias son bacilos rectos generalmente flagelados peritricos y, por tanto, móviles. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos. Catabolizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden utilizar urea ni citratos (Castro, 2012).

Su identificación en el laboratorio se realiza en base a la coloración de Gram, y su prueba principal para diferenciarla es la oxidasa siendo negativa ya que la bacteria no produce la enzima citocromo oxidasa como la mayoría de las enterobacterias. Para identificarla se hacen pruebas bioquímicas como la fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa), producción de gas y motilidad. Es causante de las infecciones urinarias, sepsis, gastroenteritis e insuficiencia renal. Resistente a múltiples antibióticos (Forbes y col., 2007).

Pseudomonas aeruginosa

Es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm in diámetro y de 1,5-5 μm de largo. Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones. Este patógeno ubicuo en el medio ambiente puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos. Puede crecer entre 20 y 43 °C, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Se caracteriza por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Paz y col., 2019).

P. aeruginosa produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como β -lactamasas de amplio espectro, metalo- β -lactamasas (MBL), alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación de ADN-girasas y bombas de expulsión activa (Ochoa y col., 2013). Tanto las capacidades para persistir en condiciones medio ambientales adversas como los mecanismos de patogenicidad que posee, han convertido a *P. aeruginosa* en un principal microorganismo relacionado con las infecciones nosocomiales, responsable aproximadamente de 10 a 15 % de las infecciones nosocomiales mundiales. Se le considera la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis. Este patógeno afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos como en el caso de pacientes quemados o que tienen fibrosis quística (Paz y col., 2019).

Clasificación de agentes antibacterianos

Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Calvo y Martínez, 2009).

1. Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna. La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano; el transporte a través de la membrana citoplásmica, y la organización final de la estructura del peptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared. Este grupo de inhibidores son: β -Lactámicos, Penicilinas, combinación de β -Lactámico / inhibidor de β -Lactamasas, Cefalosporinas, Carbapenemos, Monobactámicos y Glucopéptidos (Calvo y Martínez, 2009).

2. Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antibióticos que actúan en esta estructura son los Polipéptidos (Calvo y Martínez, 2009).

3. Inhibidores de la síntesis de proteínas

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antibacterianos, y su inhibición selectiva es

posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y diversas proteínas llamadas S (small o pequeña, en la subunidad 30S) o L (large o grande, en la subunidad 50S). En esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antibacterianos. A este grupo pertenecen: Aminoglucósidos, Macrólidos y Tetraciclinas (Calvo y Martínez, 2009).

4. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. Dentro de este grupo incluimos las rifamicinas y las quinolonas que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, y los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN, dañándolo (Calvo y Martínez, 2009).

Resistencia bacteriana

La resistencia que ejercen las bacterias a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes, es un problema de salud pública que se creía superado. Desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, los microorganismos

han sido capaces de evadir su acción, durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares) desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos.

Otros factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia son: medidas ineficientes para el control de infecciones en los centros hospitalarios, la falta de campañas educativas en el uso y manejo de los medicamentos, severidad de las enfermedades y el manejo de pacientes, colonización previa por microorganismos con resistencias múltiples, procedimientos invasivos como cateterización y diálisis, entre otros. En la actualidad se ha obtenido un avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos o transposones (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

1. Mecanismos de resistencia natural

Según Cabrera y cols. (2007), las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante el transporte de genes de resistencia a través de varios mecanismos como:

- *Transducción*: transferencia de cualquier parte de un genoma bacteriano, cuando un fago atemperado (genoma del virus que se encuentra inserto en el ADN bacteriano) durante su fase de ensamblaje, encapsula este material. Si el fragmento de ADN que queda envuelto es totalmente bacteriano se denomina transducción generalizada y si sólo se encapsula parte del genoma bacteriano pero se conserva el genoma viral se habla de transducción especializada.

- *Conjugación*: transferencia de material genético contenido en plásmidos de una bacteria a otra a través de una hebra sexual; estos plásmidos usualmente contienen genes que le confieren resistencia a drogas, antisépticos y desinfectantes.
- *Transformación*: transferencia de genes desde un ADN desnudo de una bacteria previamente lisada a otra que lo recibe y lo incorpora a su genoma.
- *Transposición*: movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes casete unidos en equipo para expresión de un promotor en particular.

2. Mecanismos de resistencia adquirida

Existen cuatro mecanismos de resistencia adquirida. Las bacterias pueden utilizar más de un mecanismo (Cabrera y col. 2007):

- *Modificación enzimática o destrucción del antibiótico*: Es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas, son los aminoglicósidos. Se sabe que hay tres tipos de modificaciones catalizadas por O-fosfotransferasas (OPH), O-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT) que inactivan estos medicamentos.
- *Impermeabilidad al antibiótico*: existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial en la cantidad del peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas. Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la

estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el número de las ya existentes, influyen en la permeabilidad a los antibióticos, por lo cual se presentan diversos tipos de resistencia a través de la membrana.

- *Alteración o producción de nuevos sitios blanco:* los cambios en el sitio blanco del antibiótico son uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos, pues evitan el efecto bactericida/bacteriostático que estimula la resistencia. Por ejemplo, el mecanismo más común de resistencia implica la modificación del sitio blanco en el ribosoma, efectos debidos a la mutación que afectan los sitios blanco (ADNgirasa y topoisomerasa) del medicamento, alteración de las proteínas que unen penicilina y evita así la acción del antibiótico. Muchas clases de antibióticos, por ejemplo betalactámicos, glicopéptidos y quinolonas, pueden disminuir su eficacia debido a cambios o producción de nuevos sitios blanco.
- *Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico:* El mecanismo de eflujo para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de bacterias grampositivas y gramnegativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas. Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. El diseño de eflujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos.

Extracción de productos naturales

Las plantas aportan un sinnúmero de compuestos químicos con actividad antimicrobiana, muchas veces comparable con otros antimicrobianos utilizados en clínica. A lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado

diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas. El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear (caracteres organolépticos), de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas (Estrada, 2010).

Extracción con solventes

El material a extraer es picado o molido, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente, luego se deja en maceración a temperatura ambiente con el solvente y en agitación constante. El proceso puede ejecutarse por lotes (forma discontinua) o en forma continua (percolación, lixiviación, extracción tipo Soxhlet). Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo; no se usan solventes clorados ni derivados del benceno por su alto grado de toxicidad. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. Adicionalmente, los solventes extraen otros componentes de la planta como colorantes, gomas, mucílagos, ceras, grasas, proteínas y carbohidratos. En la etapa de recuperación del solvente (a presión atmosférica o al vacío), se debe disponer de una unidad de enfriamiento adicional al condensador, con el fin de recuperar la mayor cantidad de solvente posible (Sánchez, 2006).

Según González (2004), los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

Extracción con agua

Infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.

- *Infusión y Decocción:* tanto la infusión como la decocción son procesos simples de extracción con agua, en el primer caso se agrega

agua caliente o fría al material molido y luego se filtra; en el segundo el material se hierve por espacio de 15 minutos con el agua.

Extracción con solventes orgánicos

Maceración, lixiviación o percolación, extracción de Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico.

- *Maceración:* Es un proceso de extracción sólido-líquido que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, hexano, etanol o metanol), en este caso se prefieren los solventes orgánicos puesto que, a largo tiempo de la extracción, el agua puede provocar la fermentación o la formación de mohos hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se coloca el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un periodo de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto. El principio consiste en que el material vegetal, con el grado de finura adecuado, se pone en contacto con el solvente, se debe realizar agitaciones frecuentes a lo largo de varios días, tratando de influenciar al gradiente de concentración. Al principio de la extracción este gradiente está en el punto máximo, con el correr de los días, a pesar de la agitación, éste disminuye.
- *Extracción de Soxhlet:* Es un método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas.
- *Digestión:* Es el proceso donde se agrega solvente caliente (con temperaturas no mayores a los 50°C) al material vegetal molido

colocado en un material de vidrio de boca pequeña, la temperatura del solvente permite una mayor extracción de compuestos ya que la solubilidad de la mayoría de las especies aumenta con la temperatura.

- *Percolación o lixiviación*: Es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente.
- *Extracción de fluidos supercríticos*: Es el proceso que aprovecha el poder disolvente de fluidos a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos.
- *Destilación al vacío*: Es un montaje muy parecido a los otros procesos de destilación con la salvedad de que el conjunto se conecta a una bomba de vacío o trompa de agua, en lugar de plato poroso se puede adaptar un capilar de vidrio u otro dispositivo semejante que mantenga la ebullición homogénea, que permite destilar líquidos a temperaturas más bajas que en la extracción de fluidos supercríticos debido que la presión es menor que la atmosférica con lo que se evita en muchos casos la descomposición térmica de los materiales que se manipulan (Estrada, 2010).

Técnicas para determinar la actividad antibacteriana

Para la valoración y evaluación de actividad antimicrobiana de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen por diversos factores: técnicas de ensayo, el medio de cultivo y el material biológico o vegetal. La apropiada selección y uso de un agente

antimicrobiano están basados en las características del organismo etiológico y en el patrón de susceptibilidad, el huésped y el fármaco.

Los antibiogramas son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos y están indicados para cultivos bacterianos clínicamente relevantes (por ejemplo: fluidos normalmente estériles o sitios clínicamente infectados) cuando la susceptibilidad no puede ser predicha.

La concentración inhibidora mínima (CIM) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. El método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica para medir la actividad bacteriana es el método por difusión en agar según Kirby-Bauer.

Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente) (Araque y col., 1999).

- Sensible: si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- Resistente: si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuera el tipo de tratamiento.
- Intermedia: cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana, no sólo para hallar la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos (López, García, y Rojas, 2005).

Técnicas para determinar la actividad antibacteriana en extractos

Para la evaluación y valoración de la actividad antimicrobiana de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales se rigen de acuerdo a las técnicas de ensayo, el método de cultivo, material biológico y vegetal (Janssen, Scheffer y Baerheim, 1987). Las técnicas más utilizadas son:

Método de difusión en agar según Kirby-Bauer

Es un método muy utilizado para el estudio de la sensibilidad de las bacterias, se basa principalmente en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido. La bacteria es sembrada en una superficie con un medio de cultivo, sobre el que se depositan unos discos de papel cargados con cierto antibiótico que difunde instantáneamente por el agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del agar, cuando el microorganismo crece se forman unos halos de inhibición, que luego son comparados con valores de referencia y se evalúa la sensibilidad (Araque y col., 1999).

Método de difusión con pozos

Emplea placas de Petri estériles con agar Müller Hinton solidificado; a cada placa se le perforan pozos, de acuerdo al número de muestras, de 4 mm. de diámetro cada uno. Luego se inoculan las placas perforadas con 10 mL del extracto. Luego de un período de incubación determinado se realiza la lectura, donde un resultado positivo (+) está dado por la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo, en caso contrario se considera negativo (-) o resistente (Vilariño, 1988).

Método de dilución en medio líquido

La dilución en medio líquido es una técnica en la que se prueba una suspensión de bacterias de una concentración predeterminada, óptima y apropiada frente a varias concentraciones de un agente antimicrobiano (normalmente mediante diluciones seriadas dobles) en un medio líquido de formulación documentada y predeterminada. El método se puede realizar tanto en tubos con un contenido mínimo de 2 mL (macrodilución) como en volúmenes más pequeños, utilizando placas de microtitulación (microdilución) (Castro, 2012).

Método dilución en medio sólido

La dilución en medio sólido implica la incorporación de concentraciones variadas de agentes antimicrobianos, en un medio solidificado con agar, utilizando generalmente diluciones seriadas dobles y la aplicación de un inóculo bacteriano definido a la superficie de la placa que contiene el agar. A menudo, los resultados derivados de estos ensayos se consideran como los más fiables para la determinación del valor CIM para una determinada combinación bacteria/antimicrobiano en una prueba concreta (Castro, 2012).

Método de E-Test

Consiste en aplicar sobre un medio de cultivo, donde se encuentra ya el microorganismo de referencia sembrado o inoculado, unas tiras plásticas que llevan incluidas un gradiente de concentración de un determinado antibiótico determinando en el mismo estudio la concentración mínima inhibitoria (CIM), luego se incuba por 24 horas a temperatura de 37 °C, donde se evidenciara el halo de inhibición en forma de n elipse llegando hasta el marcador de la concentración del antibiótico (García, 2000).

Definición de Términos

Antibióticos

Sustancia química producida por un microorganismo, que desarrolla una actividad antimicrobiana. Su origen puede ser: *Natural o biológico*, que se obtienen de cultivos de microorganismos que pueden ser hongos o bacterias; *Semisintético*: a partir de un núcleo básico de un agente obtenido de forma natural, se modifican algunas de sus características químicas, para mejorar sus propiedades, por ejemplo, aumentar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos indeseables (Paredes y Roca, 2004).

Extracción

Es la técnica más empleada para proceder a la separación y purificación de los componentes de una mezcla o para aislar un compuesto orgánico de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente orgánico (inmiscible con el agua) en contacto con una fase acuosa. Lo que en realidad se realiza en una extracción es la transferencia de una sustancia de una fase a otra, normalmente de una fase acuosa a una orgánica (Valcárcel y Gómez, 1988).

Solvente

Un solvente o disolvente es una sustancia que permite la dispersión de otra sustancia en esta a nivel molecular o iónico. Es el medio dispersante de la solución (Cova, 2018).

Fitoquímica

Significa sustancias químicas de las plantas que aunque no se consideran esenciales para nuestro metabolismo, sin embargo son beneficiosas a largo plazo para nuestra salud. Se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales, de los cuales se considera que los Terpenos, los Fenoles y los Tioles, son los más estudiados. Constituye la evolución más reciente de alimentos funcionales y enfatiza las fuentes vegetales de la mayoría de los compuestos preventivos de enfermedades (Chasquibol y col., 2003).

Tinción de Gram

La tinción o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para referirse a la morfología celular bacteriana como para realizar una aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacteria Gram positiva aquella que se visualiza de color morada, mientras que las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella se les conoce como bacterias Gram negativas (Araque y col.,1999).

Principio Activo

Son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica. En el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos (Arraíza, 2008).

Extracto

Los principios activos de las plantas medicinales se obtienen también por un tipo de extracción llamada “sólido-líquido” (Arraiza, 2008).

Operacionalización de Variables

Según Palella y Martins (2010), la operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan a las variables de una investigación. Esta definición asigna significado a una variable, describiéndola en términos observables y comparables para poder identificarla. Para establecer el sistema de variables es necesaria la definición conceptual y la operacionalización de las mismas, es decir, de las dimensiones y los indicadores de cada una. Por lo tanto, las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos, con el fin de medirlos a través de un instrumento. En la tabla 7 y 8, se muestran las variables asumidas en la presente investigación y sus indicadores.

Tabla 7.

Operacionalización de la variable dependiente

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual
Actividad Antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de <i>Verbena officinalis</i>	Dependiente	La actividad antibacteriana es la capacidad de producir un efecto que inhiba a los microorganismos mediante una serie de sucesos que resultan de la interacción de los microorganismos con los componentes químicos relacionados (Casellas, 2011)
Definición Operacional	Dimensiones	Indicador
Método Difusión en Disco (Kirby Bauer)	Sensible Sensibilidad Intermedia Resistencia	Halo de inhibición en mm

Fuente: Martínez y Buitrago, (2021)

Tabla 8.*Operacionalización de la variable independiente*

Variable	Tipo de Variable	Definición Conceptual
Metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de <i>Verbena officinalis</i> ,	Independiente	<i>Compuestos secundarios</i> que cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo (Marcano y Hasegawa, 2002).
Definición Operacional	Dimensiones	Indicadores
Medición por pruebas de tamizaje fitoquímico	Presente Ausente Abundante No determinado	Viraje de color según la prueba de identificación, formación de precipitado y/o espuma.

Fuente: Martínez y Buitrago, (2021)

www.bdigital.ula.ve Hipótesis

La especie *Verbena officinalis* ha sido usada para tratar diferentes patologías en diversos países a nivel mundial. Estudios realizados a esta especie, han reportado el aislamiento de metabolitos secundarios tales como flavonoides, triterpenos, alcaloides, quinolonas, entre otros, que han presentado gran variedad de actividades biológicas, por lo tanto, se presume que los extractos de hojas, tallos y flores de la *Verbena officinalis* presenten metabolitos secundarios similares a los reportados por otros autores, y que los mismos sean activos frente a las bacterias ATCC: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El tipo de investigación es determinada de acuerdo con la naturaleza del problema planteado, los objetivos a lograr y la disponibilidad de recursos, constituyéndose en las directrices ejecutorias de la misma (Tamayo y Tamayo, 2004).

Considerando lo expuesto, la presente investigación se consideró de tipo confirmatoria, ya que implica formulación de hipótesis y control de variables externas, mediante verificación empírica, la cual consiste en verificar la veracidad de la hipótesis derivada de una teoría, a partir de la experiencia directa (Hurtado, 2015).

Diseño de la Investigación

Sobre el diseño de la investigación Arias (2015), asevera que “cada investigación posee un diseño propio, concreto; en función del tipo de datos a ser recogidos para llevar a cabo la investigación que se desee aplicar y para ello se establecen dos tipos básicos: diseños bibliográficos y diseños de campo”, entre los cuales se encuentran los diseños experimentales presentes en esta investigación, debido a que hay un análisis de variables y niveles de variables implicados en la evaluación de la fitoquímica y la

actividad antibacteriana de la especie *Verbena officinalis*, como agente antibacteriano.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

El término “población es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación. Ésta queda delimitada por el problema y por los objetivos del estudio” (Arias, 2015). Para la presente investigación, la población objeto de estudio estuvo conformada por la especie vegetal *Verbena officinalis* L.

Selección del Tamaño Muestral

De la población señalada se tomó una muestra no probabilística, la cual, según Hernández y col. (2007), corresponde al tipo de muestra cuya selección no depende de que todas tengan la misma probabilidad de ser elegidas, sino la decisión de elección queda sujeta a la del investigador. Esta muestra estuvo integrada por la recolección de hojas, tallos y flores, de la especie *V. officinalis* L.

Sistema de Variables

En toda investigación es importante plantear variables, ya que éstas permiten relacionar algunos conceptos y hacen referencia a las características que el investigador va a estudiar (Hurtado, 2015). De este modo, las variables son los elementos o eventos que se van medir, controlar y estudiar dentro del problema formulado, de allí que se requiera la posibilidad real y cierta de que se puedan cuantificar. Por lo tanto, es una

propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse (Hernandez y col., 2007). Así pues, el efecto antibacteriano producido por los extractos obtenidos de las diferentes partes de la *Verbena officinalis* L. se consideró como variable dependiente, ya que según Arias (2015), es aquella que se modifica por la acción de la variable independiente. Por lo tanto, los metabolitos secundarios presentes en los extractos hidroalcohólicos de *Verbena officinalis* L. fueron considerados las causas que generan y explican los cambios de la variable dependiente, conocidas estas como variable independiente.

Instrumento de recolección de datos

Las técnicas en una investigación, implican el conjunto de procedimientos para el aprovechamiento de los elementos que rodean los fenómenos sobre los cuales se investiga. Las técnicas representan los medios, a través de los cuales el investigador recolecta, organiza y transmite el conjunto de datos (Balestrini, 2006). Para recopilar la información del interés sobre las variables, se consideró pertinente aplicar la técnica de observación, definida como aquella que permite la observación directa, para la percepción de hechos o fenómenos de interés en la investigación, valiéndose de instrumentos para tales fines (Tamayo y Tamayo, 2004), ya que, se visualizó la presencia o ausencia de los diferentes compuestos químicos presentes en extractos de la planta a través de reacciones químicas cualitativas. Además de describir, la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos en estudio frente a las concentraciones de extractos obtenidos de *V. officinalis*, mediante la medición de los halos de inhibición.

En todo estudio cuantitativo se utilizan instrumentos que midan las variables de interés, estos deben guardar relación con las técnicas a utilizar. Estos se definen como recurso que utiliza el investigador para registrar información o datos sobre las variables que tienen en mente, en tal sentido,

consiste en cualquier recurso, dispositivo o formato (papel o digital) que se utiliza para obtener, registrar o almacenar información (Hernández y col., 2007 y Arias, 2015). Los instrumentos usados fueron tablas de registro de datos y fotografías.

Procedimiento de la Investigación

1. Recolección de la Planta e Identificación del Material Vegetal

Las hojas, tallos y flores de la especie *Verbena officinalis* se recolectaron en el municipio Campo Elías, de la Urbanización San Rafael, Ejido estado Mérida. Esta actividad se realizó de forma manual, verificando el estado de las plantas, que estuvieran sanas y vigorosas, en una cantidad de 500 g de materia vegetal, para luego separar cada una de las partes. La identificación botánica la realizó el Ing. Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. El Voucher (01) fue depositado en el Herbario MERF Dr. Luis E. Ruiz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

2. Obtención y Preparación de los Extractos

Preparación de Extractos

Para este estudio se tomó aproximadamente 180 g de hojas, 150 g de tallos y 50 g de flores, se procedió a secar y moler en una estufa a 40 °C por 48 horas para eliminar el exceso de humedad. La materia vegetal fue triturada por separado (hojas, tallos y flores) de forma manual. Luego se tomaron 100 g de hojas, 100 g de tallos y 40 g de flores secos y molidos, se colocaron en un Erlenmeyer y se agregó un volumen de 200 mL del solvente

alcohol isopropílico al 75 %, la extracción se llevó a cabo a través de la técnica de maceración a temperatura ambiente. Este proceso se repitió 3 veces para cada uno de los extractos, posteriormente se filtró, concentró hasta sequedad a presión reducida en un rotaevaporador a 40 °C con el fin de agilizar la evaporación y evitar contaminación. Cada extracto obtenido fue pesado.

3. Determinación de metabolitos secundarios

Se realizaron pruebas fitoquímicas con el fin de determinar los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos de hojas, tallos y flores de *Verbena officinalis* L.

3.1. Alcaloides

Ensayo de Dragendorff y Wagner

Técnica: se tomó 50 mg de cada uno de los extractos en 3 tubos de ensayo separados y se agregó 5 mL de HCl al 10 % a cada tubo, se mezcló y se llevó a baño de María por 10 minutos, se filtró y cada uno de los filtrados se dividieron en 2 tubos para realizar el ensayo de Dragendorff y Wagner, se adicionaron gotas de cada uno de los reactivos. La presencia de alcaloides forma precipitados característicos de color rojo o anaranjado (Marcano y Hasegawa, 2002).

3.2. Triterpenos y esteroides

Ensayo de Liberman-Burchard

Técnica: se disolvieron los tres extractos en 0,5 mL de diclorometano

anhidro, se añadió 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno, luego se le adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. La reacción es positiva para esteroides si aparece una coloración azul verdoso y color rojo, rosado o púrpura para triterpenos (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

3.3. Flavonoides

Ensayo de Shinoda

Técnica: se tomó 1 mL de solución de cada extracto por separado. Se añadieron algunas virutas de Mg, se sujetó el tubo con una pinza, se añadió cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta, se considera una prueba positiva (Marcano y Hasegawa, 2002).

www.bdigital.ula.ve

3.4. Compuestos Fenólicos

Prueba con $FeCl_3$

Técnica: se añadió 1 mL de solución alcohólica de cada una de los extractos, se agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. La formación de color azul o verde indicó la presencia de fenoles. Esta respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Coy y cols., 2014; Domínguez, 1973).

3.5. Saponinas

Ensayo de la espuma

Técnica: se colocó en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos y se le adicionó 1 mL de agua. Se agito vigorosamente durante un minuto. La prevalencia de la espuma durante más de 5 minutos indico la positividad de la prueba (Marcano y Hasegawa, 2002).

3.6. Taninos

Prueba de la gelatina

Técnica: las fracciones alcohólicas secas se disolvieron en agua por separado, aparte se preparó una solución al 10 % de gelatina y se puso en contacto con el extracto acuoso. La desnaturalización de la proteína que se evidencia con la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, se considera positiva la prueba (Marcano y Hasegawa, 2002). Las sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Coy y cols., 2014; Domínguez, 1973).

3.7. Quinonas

Prueba del H_2SO_4

Técnica: En una cápsula de porcelana se colocó una porción del extracto y se adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado. La formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

3.7.1. Antraquinonas

Prueba del NH_4OH

Técnica: Los extractos previamente disueltos se les añadieron 3 gotas de hidróxido de amonio concentrado. La presencia de una coloración roja en los primeros dos minutos, indica la presencia de antraquinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).

3.8. Cumarinas

Prueba luz UV

Técnica: disolver el extracto en su propio solvente (0,5 mL). Adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo luz UV (Bruneton, 2001).

4. Determinación de la Actividad Antibacteriana

4.1. Cepas Bacterianas utilizadas

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias grampositivas y tres pertenecientes a las bacteria gramnegativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 9).

Tabla 9.

Cepas de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Bacterias Gram positivas	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
Bacterias Gram negativas	
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853

4.2. Evaluación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols (método de Kirby-Bauer). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

4.3. Preparación de Placas

En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo, colocándose aproximadamente 10 mL de agar Müller Hinton (Merck®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

4.4. Preparación de pre-inóculos bacterianos

Las cepas ensayadas se incubaron en agar Müller Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento,

específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003). Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa en aro estéril, tomándose de ésta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,85 % previamente estéril, hasta alcanzar la turbidez del patrón de MacFarland N° 0,5 equivalentes a 10^{6-8} UFC/mL.

4.5. Preparación de los inóculos bacterianos

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa esteril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85% hasta que alcanzo una turbidez equivalente al patrón Mac Farland (10^{6-8} UFC/mL).

4.6. Inoculación de las placas

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos previamente preparados en solución de NaCl al 0,85 % (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

4.7. Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizarón con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL de la muestra en estudio a una concentración comprendida 1000 ppm. También se utilizaron

discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 10) y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO).

4.8. Colocación de los discos impregnados

En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de cada una de la dilución de 1000 ppm de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo correspondiente a cada de las cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada.

Tabla 10. Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.

Bacterias (ATCC).	Antibióticos comerciales		
	E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32 mm	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	32 mm	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	27 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	27 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	27 mm

Leyenda: E: Eritromicina ®. AMP: Ampicilina ®. PIP: Piperacilina ®. mm: milímetros.

4.9. Colocación de los discos impregnados

En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de cada una de la dilución de 1000 ppm de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo correspondiente a cada de las cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada.

4.10. Pre-incubación e incubación de las placas

Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inóculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

4.11. Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 h estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm).

En la Figura 12, se muestra un esquema del procedimiento seguido en base a los ensayos requeridos para obtener los resultados buscados. El procedimiento se dividió en cuatro pasos generales, los cuales se describen a continuación:



Figura 12. Esquema del procedimiento de la investigación.

Diseño de Análisis

En una investigación del tipo y diseño de la presente, para el análisis de los datos obtenidos, fue imprescindible la aplicación de un enfoque cualitativo y cuantitativo según las características observadas durante el desarrollo de las pruebas ejecutadas, mediante criterios de comparación y discriminación estructurada de acuerdo a los fundamentos establecidos para cada una de los ensayos realizados.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Estudio fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de *Verbena officinalis*

El estudio preliminar de los extractos estuvo enmarcado desde la obtención de los extractos hidroalcohólicos de la *Verbena officinalis* hasta la determinación de la actividad antibacteriana de los mismos extractos. El rendimiento de recuperación se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. *Rendimiento de recuperación de los extractos*

Parte de la planta	g de muestra recolectada	g de muestra seca	g de extracto obtenido	% de rendimiento
Hoja	180	100	1,7	1,7
Tallo	150	100	2,4	2,4
Flores	50	40	0,9	2,25

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de varios metabolitos secundarios de interés biológico y a su vez se evidenció la variabilidad de compuestos presentes tanto en hojas, tallos y flores de *Verbena officinalis*; donde se observó alcaloides, triterpenos/esteroles, compuestos fenólicos y taninos en los extractos hidroalcohólicos de tallos y flores, mientras que en el extracto hidroalcohólico de las hojas solo se detectaron compuestos fenólicos (Tabla 12).

Tabla 12.

Estudio fitoquímico de los extractos hidroalcohólicos de la Verbena officinalis

PRUEBA QUIMICA	TIPO DE METABOLITOS	EXTRACTO DE HOJAS	EXTRACTO DE TALLOS	EXTRACTO DE FLORES
Liebermann-Burchard	Triterpenos Esteroles	+ Verde	++ Lig Rojo ++ Verde	++ Verde
Tricloruro férrico (FeCl₃)	Compuestos fenólicos	++ Verde	-	++ Verde
Shinoda	Flavonoides	-	-	-
Hidróxido de Amonio (NH₄OH)	Cumarinas	--	-	--
Ácido sulfúrico (H₂SO₄)	Quinonas	-	-	-
Hidróxido de Amonio (NH₄OH)	Antraquinonas	-	-	-
Dragendorff Wagner Mayer	Alcaloides	- - ND	++ Anaranjado ++ Anaranjado ND	++ Rojo ladrillo ++ Rojo ladrillo ND
Espuma	Saponinas	-	-	-
Gelatina	Taninos	++	--	+

Leyenda: (-): Ausente, (+): Escaso, (++) : Moderado, (+++): Abundante, ND: No determinado.

Las pruebas fitoquímicas realizadas con el fin de determinar la presencia de los diferentes grupos de metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Verbena officinalis*, permitieron determinar triterpenos/esteroles, alcaloides y taninos en los extractos de tallos y flores (Figura 13, 14 y 15). Asimismo, se evidenció la presencia de compuestos fenólicos en cantidad

abundante en los extractos de hojas y flores (Figura 16). En las pruebas realizadas se constató que el extracto de hojas solo presento positividad para compuestos fenólicos.

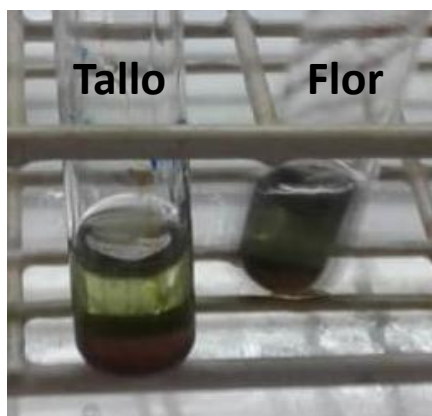


Figura 13. Triterpenos y esteroides en tallos y flores.



Figura 14. Alcaloides de tallos y flores.

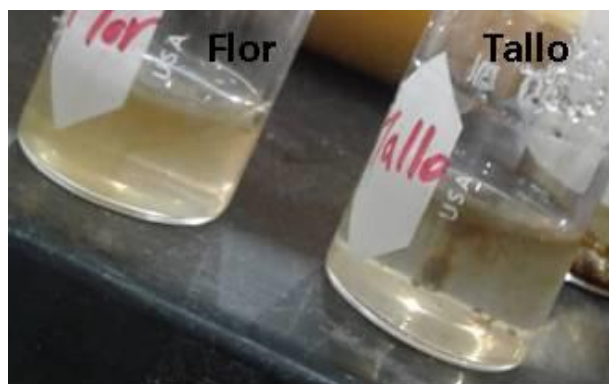


Figura 15. Taninos en flores y tallos.

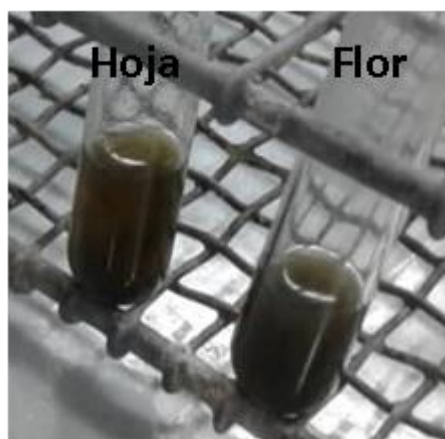


Figura 16. Compuestos fenólicos de hojas y flores.

Cabe resaltar que la ausencia de flavonoides en los tres extractos se contrapone significativamente con los resultados obtenidos por otros investigadores. Según Mekonnen y col. (2019), en el estudio fitoquímico realizado a los extractos de las hojas de *V. officinalis*, solo se detectaron flavonoides y terpenoides. El análisis fitoquímico que realizaron Abebe y col. (2017), de los extractos metanólicos de hojas y raíces de la misma planta reveló la presencia de varios grupos fitoquímicos como glucósidos, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y terpenoides, los investigadores no observaron alcaloides en ninguno de los extractos. El contenido de flavonoides fue mayor al 90 % ($73,32 \pm 0,002$ mg QE/100 g de peso seco), y se descubrió que la raíces exhibían más contenido de flavonoides que las hojas.

En la investigación fitoquímica de las hojas de *Verbena officinalis*, realizada por Mengiste y cols. (2014), se detectaron siete metabolitos secundarios que incluyen cromóforos, polifenoles, saponinas, fitosteroles, flavonoides, glucósidos cardíacos y taninos. Estos metabolitos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con varias actividades biológicas. Según el referido autor, los componentes principales de *Verbena officinalis* son iridoides, fenilpropanoides, flavonoides y terpenoides. Entre los hallazgos detectados se puede considerar una variabilidad significativa en cuanto a la ausencia de los flavonoides en el tamizaje fitoquímico realizado

en esta investigación, dado que los demás autores señalan un alto contenido de estos metabolitos en las diferentes partes de la planta. Los resultados obtenidos concuerdan con los mencionados autores con la presencia de terpenoides, compuestos fenólicos y taninos en los extractos de *Verbena officinalis*

Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de *Verbena officinalis*

En la Tabla 13, se presentan los resultados de la actividad antibacteriana obtenida de los extractos hidroalcohólicos de la *Verbena officinalis*, a una concentración de 1000 ppm, frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 13.

Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de Verbena officinalis

MICROORGANISMO	EXTRACTO DE HOJA	EXTRACTO DE TALLO	EXTRACTO DE FLOR	CONTROL POSITIVO
		Halo de Inhibición en mm		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente	56
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ausente	Ausente	Ausente	44
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente	38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	Ausente	22
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ausente	Ausente	Ausente	29

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de los extractos de *Verbena officinalis*, demostraron que no hubo inhibición bacteriana contra ninguna de las cepas estudiadas. Lo cual no se correlaciona con los reportados por diversos autores, quienes han afirmado actividad antibacteriana frente a diversos patógenos tanto en grampositivos como también en gramnegativos.

Tal es el caso de Mekonnen y col. (2019), los cuales afirman que el

extracto hidrometanólico de las hojas de *V. officinalis* ha mostrado un nivel relativamente moderado de actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Sus resultados arrojaron un diámetro de inhibición de 18,67 mm para dicho microorganismo y de 22,83 mm para *E. coli*. Del mismo modo, Megisten y col. (2014), reportaron actividad inhibitoria de los extractos metanólicos de las hojas de *Verbena officinalis* contra cepas de *S. aureus* y *E. coli* con diámetros de 20,38 y 18,00 mm, respectivamente. Ambos estudios emplearon el método de difusión en pozos de agar.

A su vez, Ravines (2019) obtuvo halos de inhibición de los extractos etanólicos de las hojas de *V. officinalis* menores a los reportados anteriormente frente a cepas de *S. aureus*, en los cuales solo alcanzaron un máximo de 7,22 mm de diámetro, usando el método de Difusión en Agar.

Asimismo, Abebe y col. (2017), hallaron similitud en dicha actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de raíces y hojas contra *S. aureus*, en este caso los autores reportaron un diámetro de inhibición máximo de 26,5 mm. Sin embargo, no se demostró actividad antibacteriana contra ningún microorganismo gramnegativo.

En correspondencia, Megisten y col. (2014), resaltaron que *V. officinalis* tiene buena actividad antibacteriana solo contra bacterias grampositivas, y las posibles discrepancias podrían deberse a cambios en el contenido fitoquímico de la planta que crece en ubicaciones geográficamente diversas. Sin embargo, la diferencia en la actividad antibacteriana de *Verbena officinalis* contra diferentes cepas de bacterias es atribuible, posiblemente, a la variación en la calidad y cantidad de metabolitos secundarios bioactivos en los extractos según la morfología de la parte estudiada.

Además, algunos autores afirmaron que la eficacia de los extractos de plantas como agentes antibacterianos depende del disolvente de la extracción. Aunque el tipo de solvente no es el único factor que debe tenerse en cuenta durante la extracción de los componentes de la planta, las

especies de plantas, así como los microorganismos de prueba juegan un papel importante en la eficacia antimicrobiana (Fentahun y col. ,2017).

Por otra parte, el método de detección de actividad antibacteriana también influye en la determinación de la misma. Por lo tanto pudo existir una relación entre los resultados y el método de elección. Actualmente el método de difusión en disco es recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos.

No obstante, la técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatmann, el cual se compone de celulosa (uniones β -(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica (Grant, Jordan y Andrew, 1999), interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo, registrada por diversos autores, como en el caso de Mekonnen y col. (2019).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, triterpenos/esteroles, compuestos fenólicos y taninos en los extractos hidroalcohólicos de los tallos y flores de *Verbena officinalis* y compuestos fenólicos en el extracto hidroalcohólico de las hojas.

Los extractos hidroalcohólicos de las hojas, tallos y flores de *Verbena officinalis* no mostraron actividad frente a ninguna de las cepas bacterianas evaluadas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ya que no se produjo halo de inhibición alguno a las concentraciones de 1000 ppm.

La ausencia de actividad antibacteriana observada podría atribuirse a la falta de difusión de los metabolitos secundarios, que posiblemente quedaron atrapados en el papel filtro Whatmann, lo cual se ha asociado con algunas de las desventajas del método.

Recomendaciones

La presente investigación deja una pauta de partida para investigaciones futuras dentro del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. En base a los resultados obtenidos se recomienda:

Realizar estudios de la actividad antibacteriana de *Verbena officinalis* mediante otros métodos de detección de inhibición bacteriana, como difusión en pozo.

Se recomienda hacer este estudio bajo otras condiciones experimentales.

Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de los extractos a los que se les ha comprobado actividad antibacteriana.

Tomar en cuenta el tipo de solvente como un factor importante en la extracción de los componentes de la planta.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

Abebe, M., Abebe, A. y Mekonnen, A. (2017). Assessment of antioxidant and antibacterial activities of crude extracts of *Verbena officinalis* Linn root or Atuch (Amharic). *Chemistry International*; 3(2):172-184.

Álvarez, W. (2008). *La Naturaleza de la Investigación*. Caracas: BIOSFERA.

Angulo, M. (1999). Curso Regional Plantas Medicinales en Atención Primaria de Salud, Agroindustria, Fitoquímica y Ecoturismo: Perspectivas de Desarrollo en la Región Los Libertadores Wari Ayacucho. Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura. (IICA). Perú.

Anon, (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*; 9 (8): 9-14.

Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K. y Velasco, E. (1999). *Manual Práctico de Bacteriología*. Velasco, J., (Coordinadora). Mérida-Venezuela: Publicaciones Vicerrectorado Académico – CODEPRE.

Argento, A., Tiraferri, E. y Marzaloni, M. (2000). Oral anticoagulants and medicinal plants. *Annali italiani di medicina interna*; 15(2):139-143

Arias, G. (2015). *El proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología científica*. 5ta edición. Caracas–Venezuela: Editorial Episteme.

Aricapa, D. (2009). Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos (Tesis de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. Bogotá.

Arraíza, M. (2008). *Principios activos en plantas medicinales y aromáticas*. Recuperado el 2016, de: http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/industrialutilizationofmedicinalandaromaticplants/contenidos/temario/Unit-4/principios_activos.pdf.

Arredondo, J., Echeguren, A., Arzate, P. y Medina, J. (2018). Susceptibilidad antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* y *faecium* en un hospital de tercer nivel. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*; 31(2): 56-61.

Asensio, J. (2000). *Guía de antimicrobianos y control de infecciones*. 2ª edición. Madrid-España: Editorial Díaz de Santos.

Atkins, S. (2004). Verbenaceae. In: J.W. Kadereit. *The families and genera of flowering plants*. Berlin-Germany: Springer-Verlag.

Ávalos, A., Pérez, E. y Carril, U. (2009). Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. Recuperado el 2016, de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/2265>.

Balestrini, M. (2006). *Como se elabora un Proyecto de Investigación*. 7ma edición. Venezuela: Editorial BL. Consultores Asociados.

Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*; 45, 493-496.

- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, *Plantas Medicinales* (2ª edición). Zaragoza: Acribia.
- Cabrera, C., Gómez, R. y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*; 38(2): 149-158.
- Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 27(1): 44-52.
- Calzada, S., Aguilar, S., López, M. y Aguilar, A.(2014). Anatomía de hoja y tallo de Verbenaceae medicinales empleadas en México. *Botanical Sciences*; 92(4): 469-480. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.170>.
- Cañigüeral, S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*; 2(1): 101-121.
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E. y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*; 22(3): 265-278.
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública*; 30(6): 519-528.
- Castillo, A., Pascual, Y., Cunhanune, N., Lorente, C., Cañete, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y

semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; 19(1): 374-382.

Castro, G. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas y flores de Iso (*Dalea mutisii*) (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

Chasquibol, N., Lengua, L., Delmá, L., Rivera, D., Bazan, D., Aguirre, R. y Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de Ingeniería Química*; 5(2): 9-20.

Condori, Y. y Tunque, M. (2018). Plantas medicinales usadas durante el puerperio en las comunidades del distrito de Palca a 3650 m.s.n.m. Huancavelica-2017 (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica, Perú.

Cova, V. (2018). Físico-química biológica. Programa de Ingreso. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

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 Fundación Dialnet*; 4(4), 31-39.

Craig, W. (1999). Heath-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*; 70(3): 491-499.

Debs, S. (1997). Ethnotherapeutics and modern drug development: The potential of Ayurveda. *Current Science*; 73(1): 909-928.

Díaz, J. y Vargas, H. (2017). Efecto cicatrizante del gel elaborado a base de la tintura de *Verbena officinalis* “verbena” en *Rattus rattus* variedad albinus. (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias de la Salud “Dr. Wilman Ruíz Vigo” Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica. Perú.

Domingo, D. y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*; 16(4): 385-393.

Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México. Editorial Limusa. 69-76.

Echeverri, L., Atehortúa, S. y Robledo, J. (2009). *K. pneumoniae* y betalactamasas. Un problema creciente. *Medicina U.P.B*; 28(2): 135-141.

www.bdigital.ula.ve

Estrada, S. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.

Fahmi, T. (2013). Estudio de la actividad sobre el Sistema Nervioso Central de especies vegetales procedentes de la flora egipcia (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

Fentahun, M., Ayele, Y., Amsalu, N., Alemayehu, A. y Amsalu, G. (2017). Antibacterial Evaluation and Phytochemical Analysis of Selected Medicinal Plants against Some Pathogenic Enteric Bacteria in Gozamin District, Ethiopia. *Journal of Pharmacovigilance*; 5(5):244-250

- Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2007). *Diagnostico microbiológico*. 12^a edición. Madrid-España: Editorial medica panamericana.
- García, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. *Serie Fisiología Vegetal*; 2(3): 119-145.
- García, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*; 61 (1): 28-40.
- García, M. (2000). *Legislación en Iberoamérica sobre Fármacos y productos Naturales*. San José, Editor Armando Cáceres, CYTED.
- Ghisalberti, E. (2000). *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia*; 71(5): 467-486. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00202-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00202-1)
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- Grant, E., Jordan, M. y Andrew, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *Biotechnology*; 70(1-3): 27-35.
- Gross, E., Pomilio A., Seldes A. y Burton G. (1990). Introducción al estudio de los productos naturales. Buenos Aires-Argentina: Ecosur.
- Gutiérrez, A y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*; 103 (2): 409-419.

- Hernández, N., Tereschuk, M. y Abdala, L. (2000). Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*; 73(1-2):317-322
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2007). *Metodología de la Investigación*. 4ta edición. México: Editorial Mc Graw Hill.
- Heywood, A. (1985). *Guía de Consultas Botánica II*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) ASTERIDAE-Lamiales-Verbenaceae.
- Hurtado, J. (2015). *El proyecto de Investigación: Comprensión Holística de la metodología y la investigación*. 8va edición. Caracas: Ediciones Quirón.
- Janssen, A., Scheffer, J. y Baerheim, A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils. *Planta Médica*; 53(5): 395-398.
- Joly, A. (1979). "*Botánica: introdução à taxonomia vegetal*", 5ta. Edición. São Paulo: Editora Nacional.
- López, N. (2017). Efectos de un extracto de *Fraxinus excelsior* L. en ratas espontáneamente hipertensas. (Tesis Doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- López, M., Aguilar, A., Aguilar, S. y Xolalpa, S. (2017). Las Verbenaceae empleadas como recurso herbolario en México: una revisión etnobotánica-médica. *Polibotánica*; 44(14): 195-216

- López, A., García, A. y Rojas J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe De Plantas Medicinales y Aromáticas*; 4(2): 28-32
- López, N., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Recuperado el 2016, de Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/101431/1/terpenos%20iridoides.pdf>.
- López, M. (2001). Saponósidos. *Offarm*; 20(6): 124-129
- López, S. (1975). Introducción a las Verbenaceae para la flora de Venezuela. *Rev. Fac. Farm. ULA*; 15(1): 9-126.
- López, S. (1977). *Verbenaceae. Flora de Venezuela*. Mérida-Venezuela: Universidad de los Andes
- López, S. (1979). Lista de Verbenaceae de los países de la Gran Colombia. *Rev. Fac. Farm. ULA*; 20(1): 9-40.
- Lorenzi, H. (2000) *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*, 3ra edición. Instituto Plantarum de estudos da flora-São Paulo: Nova Odessa
- Mahabir, P. Gupta, A. y Calderón, A. (2006). Estado del arte sobre utilización industrial de plantas medicinales en la Región Andina. Primera conferencia regional: el futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. Lima-Perú. Centro de

Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN). Facultad de Farmacia. Universidad de Panamá.

Marcano, D. y Hasegawa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.

Maysa, C. (2006). Determinación de la actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago Major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Calendula officinalis* (caléndula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari khari) por el método de difusión de disco (Tesis de pregrado). Universidad Mayor de San Andrés. La Paz Bolivia.

Mejía, C. (1990). *Aproximación a la etnobotánica de los mercados de Iquitos*. IV Congreso Internacional de Botánica. La Habana. Cuba.

Mekonnen, S., Negussie, B., Tigist, G. y Getnet, M. (2019). Investigating *in vitro* antibacterial activities of medicinal plants having folkloric repute in ethiopian traditional medicine. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*; 24(1):1-9.

Mengiste, B., Mohammed, J., y Getachew, B. (2014). *In-vitro* antibacterial activity and phytochemical analysis of leaf extract of *Verbena officinalis*. *International Journal of Pharmacognosy*; 12(1):774-779.

Murray, P. (2009). *Microbiología Médica*. 5ta edición. Madrid-España: Editorial Elsevier Mosby

Newman, D., Cragg G. y Snader K. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Products Report*; 17(1): 215-234.

Niering, W. y Olmstead, N. (1979). *The Audubon Society field guide to North American wildflowers, eastern region*. New York: Alfred A. Knopf.

Ochoa, S., López, F., Escalona, G., Cruz, A., Dávila, L., López, B., Jiménez, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández, R. y Xicohtencatl, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 70(2):138-150.

Palella, S. y Martins, F. (2010). *Metodología de investigación cuantitativa*. Caracas-Venezuela: Fedeupel.

Paredes, F. y Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. *Revista de la Oficina de Farmacia*; 23(3): 116-124.

Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S. y Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev. chil. infectol.*; 36(2): 180-189

Phillipson, J. (1995). A matter of some sensitivity. *Phytochemistry*; 38(1): 1319-1343.

Pinto, E., Amorozo, M. y Furlan, A. (2006). Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*; 20(4): 751-762.

Quispe, M. y Rojas, A.(2013). Actividad antioxidante del extracto alcohólico de hojas de *Verbena littoralis* Kunth (Verbena) en Iquitos, Loreto,

Perú. (Tesis de pregrado). Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

Ramírez, L. y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de Compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*; 15(42): 263-268

Ravines, C. (2019). Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis*, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de Ciencias Biológicas. Lambayeque, Perú.

Ringuelet, J. y Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. Buenos Aires-Argentina: Edulp

Rzedowski, J., y de Rzedowski, C. (2002). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 100 Verbenaceae*. Pátzcuaro, Michoacán, México: Instituto de Ecología Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Sánchez, F. (2006). Extracción de aceites esenciales. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

Silverio, C. (2016). Determinación de flavonoides y glucósidos en *Verbena litoralis*. (Tesis de Maestría). Ecuador: Universidad de Guayaquil

- Silverio, C. (2019). *Verbena litoralis* en costa y sierra de Ecuador como portadora de flavonoides y glucósidos. *Dom Cien*; 5(1):667-691
- Sun, Y., Wang, Y., Cai, R., Zhang, H. y Wang Y. (2017). Identification of the chemical compositions of *Verbena officinalis* L. extract by high performance liquid chromatography-photodiode array-high resolution mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*; 35(9): 987-994
- Tamayo, M. y Tamayo, M. (2004). *El proceso de la investigación científica*. 4ta edición. México: Limusa
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*; 15(3): 322-347.
- Tobyn, G., Denham, A. y Whitelegg, M. (2011). *Verbena officinalis*, vervain. *Medical Herbs*; 31(1): 327-336
- Valcárcel, M. y Gómez, A. (1988). *Técnicas de separación*. Barcelona-España: Reverte.
- Vega, M. (2015). Cultivo de plantas medicinales: verbena, jengibre y piripri en la granja demostrativa de Ieda, período de preparación de terreno, siembra, mantenimiento y seguimiento. (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca. Ecuador.

- Velázquez, M. y Ordorica, M. (2009). Ácidos, Bases, pH y Soluciones Reguladora. [En línea]. Disponible en: <https://pdf4pro.com/cdn/193-cidos-bases-ph-y-soluciones-reguladoras-21a49c.pdf>
- Vera, M. (2009). Plantas medicinales de tres áreas silvestres protegidas y su zona de influencia en el sureste de Paraguay. 1ra edición. Asunción – Paraguay: Fundación Moisés Bertoni.
- Vilariño, R. (1988). *Prontuario Microbiológico*. Madrid-España: Disinlimed.
- Vlietnick, A. (1987). En: *Biologically Active Natural Products* (Ed. HostettmannK. y Lea P.J.), Clarendon Press, Oxford,
- Volk, W. (1996). *Microbiología básica*. 7ma edición. México: Harla, S.A.
- Waizel, J. y Waizel, S. (2005). Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Parte I. *AN ORLMEX*; 50(4): 76-87.
- Willmann, D., Schmidt, M. Heinrich, C. y Rimpler, D. (2000). *Verbenaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. México, DF: Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.