



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Marrubium
vulgare* EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

(Trabajo presentado como requisito para optar al grado de licenciada en
Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Villarreal Bustos, Yamileth del Valle

Tutor:

Prof. Yndra Cordero de Rojas

Cotutor:

Dra. Rosa Aparicio

Mérida, Marzo 2020

DEDICATORIA

- A Dios todopoderoso y la Virgen María por el don de la vida y por permitirme cumplir una de mis metas más anheladas.
- A mis padres, pilares fundamentales de mi vida, Digna y Ricardo, llenos de virtudes, luchadores y trabajadores, que han sido siempre un ejemplo a seguir y que con amor y esmero cuidaron a mi hija, a su vez siempre intercediendo en oración ante Dios por mi bienestar. Gracias por su apoyo incondicional, hoy les digo que todo ese esfuerzo valió la pena y que este logro también es de ustedes. Los Amo!
- A mi hija Ailianny Luna, a quien tuve que dejar mucho tiempo y aunque en las mejores manos siempre la extrañe, pero todo para poder culminar mi formación académica y ofrecerle un mejor futuro. Eres la luz de mi vida y el motor que me impulsa a seguir adelante. Gracias por alimentar mi vida con tu amor. Te Amo!
- A mi novio Alexander, mil gracias por ayudarme, apoyarme, por darme aliento en los días difíciles, por creer siempre en mí, por esperarme y por los buenos y malos momentos juntos en este camino. Te Amo!
- A mi hermano Robert, mis sobrinos Rossibeth y Roleiber, aunque no compartimos mucho tiempo juntos son una parte importante en mi vida, estaré siempre para ustedes.
- A mi abuelita Melania, mis tíos, primos y amigos que creyeron en mí, espero estén orgullosos. Infinitas gracias por sus oraciones y buenos deseos en mi nombre.

A todos, Dios les bendiga siempre.

Yamileth Villarreal

AGRADECIMIENTOS

- A la ilustre Universidad de los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por los más destacados profesionales y por acogerme durante este largo camino adquiriendo las herramientas y conocimientos necesarios para mi formación académica.
- A mi tutora Prof. Yndra Cordero de Rojas, por aceptarme como su tesista y brindarme su confianza, tiempo y dedicación. Muchas gracias por compartir sus conocimientos conmigo. Fue una experiencia genial trabajar bajo su tutoría.
- Al Prof. Luis Beltrán Rojas y todo su equipo de trabajo, la Dra. Rosa Aparicio que además es mi cotutora y el Sr. Emilio Salazar por su desempeño y colaboración en mi trabajo, siempre comprometidos con ofrecer un excelente y valioso servicio en el Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”.
- A las profesoras Ysbelia Obregón y Alida Pérez, gracias por brindarme su orientación y dedicación al hacer posible la realización de esta investigación.
- A la Residencia “Fray Juan Ramos de Lora”, mi “Resi” que junto a la Licenciada Oleyda Martínez, cada uno de los compañeros que allí residen y los que ya no lo hacen, especialmente a Ayilibel, Luisana, las “moro” Yuleidy y Yugledy, Kiberly, Estefany, Margiet, Sr. Antonio y Miguel me han acogido y han me han brindado el calor de hogar. Estaré siempre agradecida de todas las experiencias vividas juntas.
- A mis amigas y futuras colegas, Luzbery Suarez, Betzabeth Guillen, Eva Quiñonez, Jessimar Manrique, Yaribay Marquez, Yessica Gil y Rosmary Castillo, quienes la vida y la Universidad las puso en mi camino para compartir tantas experiencias y conocimientos juntas.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación e Importancia de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	6
<i>Objetivo General</i>	6
<i>Objetivos Específicos</i>	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
<i>Alcances de la Investigación</i>	7
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	10
Bases Teóricas	12
<i>Familia Lamiaceae</i>	12
<i>Características Botánicas de la Familia Lamiaceae</i>	13
<i>Géneros más Importantes de la Familia Lamiaceae</i>	14
<i>Género Marrubium</i>	15
<i>Especie Vegetal Marrubium vulgare</i>	15

<i>Usos de la Especie Marrubium vulgare</i>	18
<i>Composición Química de la Especie M. vulgare</i>	19
<i>Posología recomendada de Marrubium vulgare</i>	23
<i>Extractos Vegetales</i>	24
<i>Obtención de los Extractos Vegetales</i>	25
<i>Extracción</i>	26
<i>Cromatografía de Gases</i>	27
<i>Espectrometría de Masas</i>	28
<i>Fitoquímica</i>	29
<i>Tamizaje o Screening Fitoquímico</i>	30
<i>Metabolitos Secundarios</i>	30
<i>Metabolitos Secundarios Presentes en las Plantas</i>	31
<i>Microbiología</i>	39
<i>Microorganismos</i>	39
<i>Microorganismos Patógenos</i>	40
<i>Procariotas y Eucariotas</i>	40
<i>Bacterias</i>	41
<i>Tinción de GRAM</i>	45
<i>Agentes Antimicrobianos</i>	45
<i>Métodos para evaluar la Actividad Antibacteriana</i>	46
<i>Antibióticos</i>	48
<i>Resistencia Antimicrobiana</i>	51
<i>Mecanismos de Resistencia Bacteriana</i>	52
<i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i>	52
<i>Cultivo o material de referencia</i>	53
Hipótesis	54
Operacionalización de las Variables	55
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	57
Tipo de la Investigación	57

Diseño de la Investigación	57
Población y Muestra	57
Sistema de Variables	58
Instrumento de Recolección de datos	58
Procedimiento o Metodología	58
<i>Recolección del Material Vegetal</i>	58
<i>Material Biológico</i>	59
<i>Extracción y Preparación del Extracto Vegetal</i>	59
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	61
<i>Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas</i>	63
<i>Evaluación de la Actividad Antibacteriana</i>	64
<i>Preparación del Inoculo Bacteriano</i>	65
<i>Preparación de las Placas e Inoculación</i>	65
<i>Preparación y Colocación de Discos</i>	66
<i>Preincubación e Incubación</i>	66
<i>Lectura de Pruebas</i>	66
<i>Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i>	66
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
Resultados	69
Discusión	79
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
Conclusiones	83
Recomendaciones	84
BIBLIOHEMEROGRAFÍAS	85

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Planta de <i>Marrubium vulgare</i>	17
Figura 2.	Partes de la planta de <i>Marrubium vulgare</i>	17
Figura 3	Estructura química de la apigenina	20
Figura 4.	Estructura química de la luteolina	20
Figura 5.	Estructura química de la quercetina	20
Figura 6.	Estructura química de la vitexina	21
Figura 7.	Estructura química del flavanol	21
Figura 8.	Estructura química de la marrubiina	21
Figura 9.	Estructura química del marrubiol	22
Figura 10.	Estructura química del vulgarol	22
Figura 11.	Estructura química del ácido clorogénico	22
Figura 12.	Estructura química del ácido cafeico	23
Figura 13.	Estructura química del ácido acteósido	23
Figura 14.	Ciclo de la extracción	25
Figura 15.	Estructura química del escualeno y sus derivados triterpenos cíclicos estigmasterol y sitosterol	33
Figura 16.	Estructura química del germacranólido	34
Figura 17.	Estructura química del fenol	35
Figura 18.	Estructura química del psolareno	35
Figura 19.	Estructura química de la galactoquina	36
Figura 20.	Estructura química de antocianina y antocianidina	36
Figura 21.	Estructura química de la digitoxina	37
Figura 22.	Estructura química de la digitonina	38
Figura 23.	Estructura química de la isoquinolina	39
Figura 24.	Pared celular de las Bacterias Gram positivas	43
Figura 25.	Pared celular de las Bacterias Gram negativas	44
Figura 26.	Pesado del material vegetal previamente molido	60

Figura 27.	Filtración luego de la maceración	60
Figura 28.	Concentración de los extractos en el rotavapor	61
Figura 29.	Cromatógrafo de gases modelo 6890 equipado con detector de masas marca Hewlett Packard Modelo 5973.	64
Figura 30.	Identificación de Terpenos y/o Esteroles	70
Figura 31.	Identificación de Fenoles	71
Figura 32.	Identificación de Quinonas o Antraquinonas	71
Figura 33.	Identificación de Flavonoides	72
Figura 34.	Identificación de Sesquiterpenlactonas	72
Figura 35.	Identificación de Alcaloides	73
Figura 36.	Identificación de Cumarinas	73
Figura 37.	Identificación de Saponinas	74
Figura 38.	Cromatograma general del extracto de hexano de <i>Marrubium vulgare</i>	75
Figura 39.	Estructura química de la marrubiina y tetracosano	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Taxonomía de la especie <i>Marrubium vulgare</i>	18
Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente	55
Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente	56
Tabla 4. Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Marrubium vulgare</i>	70
Tabla 5. Componentes identificados en el extracto de hexano de las hojas de <i>Marrubim vulgare</i>	76
Tabla 6. Halos de inhibición del extracto hexanólico expresados en mm (milímetros) del ensayo difusión en agar con disco Kirby- Bauer	77
Tabla 7. Halos de inhibición del extracto etanólico expresados en mm (milímetros) del ensayo difusión en agar con disco Kirby- Bauer	78

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1. Procedimiento empleado para la investigación	67

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: PRODUCTOS NATURALES



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Marrubium vulgare* EN CEPAS
DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Trabajo de Grado

Autor:

Villarreal Bustos, Yamileth del Valle
C.I. V-21.367.588

Tutor:

Prof. Yndra Cordero de Rojas

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación que existe entre la composición química de los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional en el Laboratorio de Análisis Biológico de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Los componentes químicos presentes en los extractos que fueron obtenidos mediante maceración con disolventes orgánicos como hexano y etanol, fueron caracterizados por medio del tamizaje fitoquímico, logrando la identificación de compuestos como esteroides, fenoles, taninos y alcaloides; al extracto de hexano se le realizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, encontrando como componentes mayoritarios al Hexatriacontano, Tetracosano, Marrubiina y Tetratetracontano. El análisis de la actividad antibacteriana y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) realizada mediante el método de difusión en agar con disco (Kirby - Bauer) a los dos extractos permitió conocer, que el extracto hexanólico fue activo frente a las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* (15,62 µg/mL), *Escherichia coli* (15,62 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (15,62 µg/mL), y *Klebsiella pneumoniae* (7,8 µg/mL), mientras que el extracto etanólico presentó actividad solo en *Staphylococcus aureus* (7,8 µg/mL), *Escherichia coli* (15,62 µg/mL) y *Klebsiella pneumoniae* (7,8 µg/mL); resaltando que *Enterococcus faecalis* presentó resistencia a los mismos. Se atribuyó actividad antibacteriana a ambos extractos, y por esta razón pueden considerarse como una nueva fuente de tratamiento terapéutico y de control contra dichos microorganismos.

Palabras clave: *Marrubium vulgare*, actividad antibacteriana, tamizaje fitoquímico,

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional como parte importante de la cultura de los pueblos, ha sido durante siglos, el único sistema utilizado en la restauración de la salud de generaciones pasadas, donde las plantas medicinales han cumplido un rol fundamental como medio para curar enfermedades en personas (De las Casas, 1995). Nadie sabe exactamente donde se utilizó plantas medicinales por primera vez, aunque se ha estudiado que los conocimientos antes del nacimiento de la escritura se realizaban oralmente y el primer texto escrito sobre el uso de plantas medicinales tiene unos 4000 años de antigüedad; seguramente la búsqueda de algún remedio fue algo que se dio en todas las culturas a la vez, fruto del deseo de los hombres de sanar por cuestiones mágicas religiosas o de algún preparado que le proporcionase una mayor felicidad temporal, la mayoría de las veces los descubrimientos fueron simplemente resultados de la búsqueda de nuevos alimentos (Martínez y Rojas, 2019).

Los seres humanos han venido utilizando las propiedades medicinales de las plantas desde épocas antiguas y en la actualidad aproximadamente un 30% de la materia prima de la industria farmacéutica proviene de especies vegetales (Hertz, 1996). Asimismo, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (2002), más de dos tercios de la población mundial utilizan tratamientos tradicionales basados en plantas medicinales para solucionar sus problemas de salud.

Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009). Dentro de los compuestos producidos por las plantas con mayor relevancia médica por sus múltiples funciones (antibacteriana, antifúngica, antiviral, entre otras) se encuentran los extractos, los cuales son un concentrado

obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes como agua, etanol o éter, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruíz y Susunaga, 2000).

La importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en los efectos farmacológicos o quimioterapéuticos que los extractos y aceites vegetales pudieran poseer, sino también en la posibilidad que representan para el desarrollo de nuevas drogas y la cura de diversas enfermedades (Roger, 2006).

La metodología de esta investigación estuvo conformada por la recolección de las hojas de *Marrubium vulgare* para la preparación de los extractos de etanol y hexano, siguiendo el protocolo estandarizado en el Laboratorio de Análisis Biológico de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes para hacer un análisis y estudiar su posible actividad antibacteriana.

Este trabajo final de la Tesis de Grado se realizó con la finalidad de analizar la correspondencia de la actividad antibacteriana de los extractos de la especie *Marrubium vulgare* con cepas de bacterias de referencia internacional en el laboratorio de Análisis Biológico de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y ha sido estructurado en V capítulos. El capítulo I, denominado “El Problema”, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas y Operacionalización de las Variables. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de datos y Procedimientos o Metodología. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión, y finalmente, el Capítulo V que aborda: Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2013), la medicina tradicional es una parte importante y con frecuencia subestimada de los servicios de salud. En algunos países, la medicina tradicional o medicina no convencional suele denominarse medicina complementaria. Históricamente, la medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, prevenir y tratar enfermedades, en particular enfermedades crónicas.

La atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones. En los países ricos, muchas personas recurren a diversos tipos de remedios naturales porque consideran que «natural» es sinónimo de inocuo. Sin embargo, a medida que aumenta el uso de las medicinas tradicionales o alternativas, también aumenta el número de informes sobre reacciones adversas (OMS, 2013).

Existe una creciente preocupación de la sociedad venezolana sobre la situación de la salud en nuestro país. Y no puede sino serlo: la salud es la angustia existencial primordial del ser humano. Tanto es así que numerosos reportajes, entrevistas y comunicados dan cuenta del aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas que en el pasado habían sido reducidas a niveles internacionalmente aceptables (Krivoy, 2008).

El problema se ha agravado con la escasez de incentivos económicos para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos, sobre todo, en países de escaso desarrollo y los en vía de desarrollo; pero también preocupante en los países altamente desarrollados donde existen recursos y capital y, sin embargo, no se utilizan en esta importante tarea (Serra, 2017).

Sumado a esto se conoce que la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Un creciente número de infecciones son cada vez más difíciles y, a veces, imposibles de tratar, a medida que los antimicrobianos van perdiendo eficacia (OMS, 2018).

El incremento de la resistencia microbiana por la presión selectiva que representa la utilización de antibióticos a gran escala, ha permitido cepas con mecanismos de resistencia que, en muchas ocasiones, nos dejan prácticamente sin alternativas para el tratamiento de las infecciones; reduce las posibilidades de tratamiento eficaz de enfermedades, prolonga el tiempo de agonía de los enfermos y los obliga a utilizar medicamentos costosos, además de alargar el tiempo de hospitalización y aumentar el riesgo de mortalidad (Fariña, 2016).

En tal sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018), define que los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven resistentes a los antibióticos.

Una información accesible y de fácil comprensión es fundamental para orientar a los consumidores, además lograr que la población disponga de fitofármacos rigurosamente estudiados. Por lo tanto, se decidió probar en este trabajo la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de la especie *Marrubium vulgare*, frente a cepas de bacterias causantes de diversas

patologías en el hombre, con la finalidad de generar nuevas sustancias que contribuyan con su posible eliminación.

Justificación e Importancia de la Investigación

Fue necesario realizar la investigación sobre las propiedades antibacterianas de *Marrubium vulgare* ya que con el paso del tiempo y el advenimiento de la medicina moderna, el conocimiento de las plantas medicinales vino a ser devaluado por profesionales de la salud que han estado trabajando con énfasis en medicamentos industrializados introducidos gradualmente en la vida cotidiana de la sociedad. Sin embargo, en la actualidad, las políticas de ciencia y salud están tratando de restablecer el uso de las plantas medicinales en la salud ya que esto corresponde a bajos costos financieros, fácil acceso y los efectos secundarios menores en comparación a los medicamentos industrializados (Heisler, Budó, Schimith, Badke, Ceolin y Heck, 2015). Además porque aunque los conocimientos bacteriológicos que se disponen en la actualidad son muy amplios queda mucho por conocer y la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (OMS, 2018).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, aunque el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales está acelerando el proceso. Cada vez es mayor el número de infecciones, cuyo tratamiento se vuelve más difícil debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos (OMS, 2018).

La importancia de realizar este trabajo radicó en el reconocimiento tradicional, cultural y medicinal de *Marrubium vulgare* por sus sustancias antibacterianas que podrían hacer posible la eliminación de bacterias patógenas y así aportar elementos para el aprovechamiento de este recurso. Dadas las condiciones de la cobertura de salud, la medicina tradicional es

una alternativa viable que representa al mismo tiempo una herramienta para el equipo de salud y para los usuarios. Así mismo aportar mayor información sobre la especie, ya que existen pocos estudios sobre la misma.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

- Confirmar la relación que existe entre la composición química de los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Marrubium vulgare* mediante la técnica de extracción por maceración.
- Realizar el screening fitoquímico de los extractos obtenidos previamente de *Marrubium vulgare*.
- Identificar los metabolitos secundarios del extracto de hexano mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Evaluar la actividad antibacteriana por el método de Kirby-Bauer de los extractos de hexano y etanol frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos obtenidos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La profundidad del logro fue analizar la correspondencia de la actividad antibacteriana producida en bacterias patógenas y el criterio de análisis. Específicamente, el criterio de análisis estuvo representado por el extracto natural de *Marrubium vulgare*. Por tal razón, durante la investigación se describieron las propiedades y características fitoquímicas de los extractos de hexano y etanol de la planta, y se determinó la presencia de actividad antibacteriana de sus componentes.

Limitaciones de la Investigación

Para esta investigación, estuvieron disponibles las destrezas técnicas y la instrumentación del material en el laboratorio. Sin embargo, las limitaciones para adquirir reactivos y agares para evaluar la propiedad antimicótica, permitió solo establecer la actividad antibacteriana. En cuanto al contexto teórico, se encontraron pocos artículos originales disponibles en Latinoamérica y en Venezuela sobre la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

En la revista Natural Product Research, se publicó un estudio realizado por Tlili y cols. (2019), titulado: Perfil polifenólico, actividad antibacteriana y toxicidad de extractos de hojas de seis especies espontáneas tunecinas contra camarones salinos, donde indagaron el perfil polifenólico y las propiedades biológicas de los extractos acetónicos de hojas de seis plantas espontáneas tunecinas como *Marrubium vulgare* L, *Rhus tripartita* (Ucria) DC, *Hernaria fontanesii* J. Gay subsp. *fontanesii*, *Ziziphus lotus* L, *Plantago ovata* Forsk, *Thymelaea hirsuta* (L) Endl. Utilizaron procedimientos guiados por bioensayos y cromatografía líquida de alta resolución, fotodiodos, ionización por electropulverización, espectrometría de masas (HPLC-PDA-ESI-MS), obteniendo como resultado que *Marrubium vulgare* tenía 619.3 µg/g de compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encuentra: Ácido neoclorogénico, Ácido cafeico, Ácido p-cumarico, Rutina, Luteolin-7-O-glucósido, Quercetina-3-O-galactósido, Naringin, Quercetina-3-ramnosida, Apigenina-7-O-glucósido, Quercetina y Kaempferol. En cuanto a la actividad antimicrobiana mostró eficacia contra *Staphylococcus aureus* (CMI= 500 µg/mL) y *Staphylococcus epidermidis*, (CMI= 500 µg/mL) y por otro lado no se detectó actividad contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Además *Marrubium vulgare* resultó medio toxico

contra *Artemia salina* Leachz. Esta investigación coincide con el trabajo realizado ya que en ambos se obtienen extractos de la especie *Marrubium vulgare* y se demuestra que poseen actividad antibacteriana en diferentes concentraciones de los mismos.

En el año 2018, Limaymanta, en su trabajo titulado: Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de un gel preparado con extracto etanólico de *Marrubium vulgare* L., investigó la actividad antibacteriana *in vitro* de un gel preparado con extracto etanólico del tallo y de las hojas del *Marrubium vulgare* L., realizando dos etapas: evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar y determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633; así mismo se preparó un gel a base de carbomer al que se le agregó el extracto seco y luego se determinó la actividad antibacteriana del mismo mediante el método de difusión en agar. El extracto seco del tallo presentó actividad antibacteriana a una concentración de 100 mg/mL frente a *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* por el método de difusión en agar, mientras que en el caso del extracto de las hojas presento acción frente a todas las bacterias en estudio, excepto para *Escherichia coli*; cuando se utilizó el método de microdilución para el extracto seco, las hojas presentaron una importante reacción frente a *Staphylococcus aureus* (CMI= $666,67 \pm 243,98 \mu\text{g/mL}$), *Staphylococcus epidermidis* (CMI= $633,33 \pm 228,87 \mu\text{g/mL}$) y *Bacillus subtilis* (CMI= $300 \pm 103,51 \mu\text{g/mL}$), y en el caso del tallo se observó un CMI de $733,33 \pm 238,2 \mu\text{g/mL}$ para el *Bacillus subtilis*. La preparación del gel se realizó en base a la consistencia y estabilidad, al cual se les incorporaron los extractos a las concentraciones 1%, 2% y 4%, para resultar mayor acción sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* al 2% y 4% tanto en tallo como en hojas respectivamente. La relación existente con

el trabajo de investigación realizado fue que se obtuvo un extracto etanólico de la especie *Marrubium vulgare* para luego evidenciar las posibles propiedades sobre cepas ATCC de bacterias Gram positivas y Gram negativas y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Amri y cols. (2017), realizaron un trabajo de investigación titulado: *Marrubium vulgare* L. Extracto de hojas: composición fitoquímica, propiedades antioxidantes y cicatrizantes. El objetivo fue estudiar el potencial de *Marrubium vulgare* L. (Horehound Lamiaceae) en el proceso de curación de heridas. Utilizaron las hojas de *Marrubium vulgare* L, preparando un extracto hidroalcohólico a través de la aplicación de una Extracción por Solvente Asistido por Microondas, una metodología adecuada para preparar extractos bioactivos de valores altos. El contenido de fenoles y flavonoides se evaluó mediante análisis colorimétrico y la cantidad de marrubina determinada por resonancia magnética nuclear cuantitativa. Además, su perfil fitoquímico se realizó mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alto rendimiento. Los autores pudieron determinar la presencia de polifenoles, flavonoides y naftoquinonas, mientras que no se detectaron cumarinas, alcaloides y saponinas; además un contenido de marrubina de 6,62% p / p. Este trabajo guardó relación con la investigación ya que los autores investigaron el perfil fitoquímico de la especie *Marrubium vulgare* mediante técnicas colorimétricas y de cromatografía para evaluar la presencia de metabolitos secundarios.

Antecedentes Históricos

La historia del hombre está estrechamente ligada con las plantas medicinales y aromáticas. Antes de conocer el fuego y domesticar los animales su subsistencia dependía en gran parte de las hierbas, los frutos, la miel y los jugos que extraía de las plantas. En el periodo neolítico el hombre

se vuelve sedentario y aparece la agricultura, se cultivan granos y plantas como el hinojo, el cilantro que utilizan como condimento (Méndez, 2008).

Los griegos usaban hierbas y plantas aromáticas para su medicina y la incorporaron a su mitología, tejiendo leyendas como la de Dafne convertida en Laurel y la de la hechicera Medea y sus encantamientos a base de hierbas aromáticas. Homero menciona en su Odisea, jardines aromáticos compuestos de plantas aromáticas (Méndez, 2008).

El padre de la medicina, Hipócrates recomendaba tratamientos curativos basados en canela, tomillo, hierbabuena y mejorana, sugería tener mucho cuidado en su recolección, secado y preparación. Crateabas, famoso herborista, contemporáneo de Hipócrates, escribió un Manual en el que detallaba cuatrocientas plantas con sus aplicaciones que sirvieron a la humanidad (Méndez, 2008).

El siglo XVII marcó el apogeo de las plantas aromáticas y medicinales, que hasta entonces se emplearon de manera limitada en medicina, y su propagación y multiplicación había aumentado, pues aparecieron otras como la manigueta de guinea y anís estrellado de la china. Al final del siglo XVII su utilidad y valor principal era el curativo (Méndez, 2008).

A principios del siglo XIX, fue un punto de inflexión en el conocimiento y uso de las plantas medicinales, el descubrimiento y aislamiento de los alcaloides de la amapola, ipecacuana, quinina, granada y de otras plantas marcaron el inicio de la investigación científica farmacéutica. Con la mejora de métodos químicos, otras sustancias activas obtenidas de plantas medicinales también se descubrieron tales como: taninos, saponinas, vitaminas y hormonas (Petrovska, 2012).

Ha tenido que transcurrir mucho tiempo y algunos acontecimientos para que la medicina tradicional sea valorada. En 1997 la OMS hizo conocer su propuesta política “Salud para todos en el año 2000” que fue impulsada en la conferencia de Alma ata. La OMS ha sido la principal impulsadora del reconocimiento del potencial de la medicina tradicional y de la utilización de

las plantas medicinales en la salud pública a través de decisivas reducciones (Ponz, 2005).

Bases Teóricas

Familia Lamiaceae

Lamiaceae es una familia muy diversa, incluye 236 géneros y 7.173 especies (Harley y cols., 2004). Pertenece al orden Lamiales y está relacionada con Verbenaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae, Gesneriaceae, Lentibulariaceae, Buddlejaceae y Bignoniaceae, sin que las relaciones entre ellas se hayan resuelto totalmente (Savolainen y cols., 2000; Soltis y cols., 2000).

En algunos casos aislados es difícil distinguir Lamiaceae de Verbenaceae; tradicionalmente, la primera se reconocía por tener un ovario claramente tetralobado por la presencia de un estilo ginobásico; mientras que la segunda tiene estilo terminal y en consecuencia el ovario no se separa; sin embargo, los estudios filogenéticos han dado como resultado la inclusión en la familia de algunos géneros con estilo terminal, ubicados anteriormente en Verbenaceae (Takhtajan, 2009), lo cual no es aceptado por todos quienes trabajan estas familias.

Presenta distribución subcosmopolita aunque otros autores la definen como cosmopolita y es muy diversa en zonas templadas, particularmente en el Mediterráneo y la región central de Asia. Otras áreas ricas en especies son China, África y Sudamérica. En Sudamérica la familia está dominada por dos géneros cosmopolitas, *Hyptis* y *Salvia*, que comprenden alrededor del 60% del número total de especies (Martínez, Fragoso, García y Montiel, 2013). La familia Lamiaceae en Venezuela está representada por un pequeño componente autóctono, principalmente del género *Hyptis*, y una gran

cantidad de especies introducidas que se han naturalizado y ya forman parte importante de nuestra flora (Orsini y Velázquez, 1996).

Características botánicas de la familia Lamiaceae

La familia es conocida botánicamente con los nombres latinos de Labiatae (por la presencia de labios en sus flores) o Lamiaceae (por el nombre del género tipo de la familia, *Lamium*). Las labiadas son una familia de plantas aromáticas constituida principalmente por hierbas o arbustos (rara vez árboles como en *Hyptidendron* o *Lepechinia*), provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (que son muy variados en esta familia) (Fernández y Rivera, 2006).

Los tallos son cuadrangulares y las hojas siempre opuestas; las inflorescencias son terminales o laterales, de aspecto racemoso (espigas o panículas), constituidas por agrupaciones de flores de tipo cimoso (verticilastros), que se ubican en cada par de brácteas. Las flores presentan cáliz bilabiado o regular de cinco piezas parcialmente soldadas, que a veces crece rodeando el fruto, y la corola tiene los pétalos unidos, simetría dorsiventral, con una parte cilíndrica (tubo) y otra rasgada que consta de cinco lóbulos parcialmente soldados y orientados formando dos labios; el superior frecuentemente recto y en forma de casco (gálea), suele proteger a los estambres y el inferior trilobado y más extendido, sirve como plataforma a los insectos en el proceso de polinización. Los estambres son siempre menos de cinco, generalmente cuatro (dos pares) o a veces sólo dos, como ocurre en *Salvia* y en *Rosmarinus*. El ovario, que es súpero y de dos carpelos, desarrolla un nuevo tabique transversal asociado a la presencia de un estilo ginobásico (que se conecta al ovario por su base), dando lugar a un fruto característico de cuatro nueces libres (tetranúcula). Este es uno de los caracteres más distintivos de esta familia, que la diferencia de otras

cercanas, como las verbenáceas, acantáceas o escrofulariáceas (Fernández y Rivera, 2006).

Géneros más importantes de la familia Lamiaceae

La familia Labiatae tiene importancia económica mundial, ya que básicamente en todos los continentes y culturas el hombre ha utilizado numerosas especies de labiadas, bien como medicina, como condimento o, más raramente, como alimento. También han sido usadas en numerosos casos como plantas ornamentales muy apreciadas por su aroma o por sus flores. Sólo por citar algunas de las labiadas más comúnmente usadas en nuestro medio, diremos que en la cocina o en el jardín medicinal nunca suelen faltar plantas como la albahaca (*Ocimum*), alegrías (*Scutellaria*), Marrubio (*Marrubium*), hierbabuena, menta y poleo clásico (*Mentha*), orégano clásico y mejorana (*Origanum*), orégano orejón (*Plectranthus*), orégano andino (*Mintostachys*), ajedrea y poleo americano (*Satureja*), salvia (*Salvia* y *Lepechinia*), mastranto (especies de *Hyptis* y *Salvia*), tomillo (*Satureja*, *Thymus*), toronjil (*Melissa*) y romero (*Rosmarinus*) (Fernández y Rivera, 2006).

Por otra parte, algunas labiadas son tradicionalmente utilizadas en los ritos mágicos religiosos de algunas comunidades, como es el caso de varias especies de los géneros *Scutellaria* y *Ocimum*, principalmente en las comunidades afrocolombianas e indígenas del litoral pacífico. Son también frecuentes en nuestros parques y jardines algunas especies ornamentales introducidas, de los géneros *Ajuga*, *Leonotis*, *Mentha*, *Ocimum*, *Plectranthus*, *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* y *Teucrium*, y algunas especies nativas del género *Salvia* (Fernández y Rivera, 2006).

Son muy conocidos los híbridos que se originan entre especies de los géneros *Mentha*, *Thymus*, *Salvia*, *Origanum* y *Sideritis*. Esta característica ha

propiciado la selección diferentes variedades útiles como plantas ornamentales o medicinales, principalmente (Fernández y Rivera, 2006).

Los aceites esenciales son especialmente importantes en géneros como *Hissopus*, *Lavandula*, *Salvia*, *Thymus*, *Plectranthus* y *Rosmarinus*. Son muy apreciados en la industria de perfumes, cosméticos, refrescos y medicinas, por la diversidad de aromas que se presentan en las diferentes especies (Fernández y Rivera, 2006).

Género *Marrubium*

Plantas perennes, sufruticasas, algo leñosas en la base. Tallos de sección redondeada o cuadrangular, con indumento denso, de grisáceo a blanquecino, formado por pelos simples y compuestos. Hojas pecioladas, ovadas, orbiculares, subtriangulares o flabeladas, de dentadas a lobuladas, con nervadura marcada e indumento denso, tomentoso. Inflorescencia en verticilastros separados, globosos. Cáliz tubular, con 5-10 dientes, rectos o uncinados, espinescentes. Corola bilabiada, con labio superior bífido, erecto, e inferior trilobulado. Estambres incluidos en el tubo de la corola, los inferiores másosas y pelosas largas, con filamentos muy cortos. Estigma bífido, también incluido en el tubo. Núculas elipsoides o trígonoas, a veces granulosas y pelosas en la parte dorsal, negruzcas (Mostacero, Mejía y Gamarra, 2002). Contiene aceite esencial compuesto por pineno, limoneno y canpeno; alcoholes diterpénicos (marrubiol), esteroides, saponina, vitamina C y lacotan amarga (Brack, 1999).

Especie vegetal *Marrubium vulgare*

El Marrubio blanco, Marrubio común o Manrubio, entre otros nombres vulgares, “Horehound” en inglés, es una planta herbácea con la base leñosa, perenne, originaria de Europa, norte de África, y Asia Occidental, pero

naturalizada prácticamente en todo el mundo. Crece en suelos nitrófilos, terrenos sin cultivar, bordes de caminos, cerca de las paredes de las viviendas, etc. (Carretero y Ortega, 2018).

Se conocen alrededor de 40 especies del género *Marrubium* (Carretero y Ortega, 2018), la especie que nos ocupa (Figura 1) posee características taxonómicas importantes (tabla 1) y las siguientes partes (Figura 2):

- **Tamaño:** Hasta de 1 m de alto (Vibrans, 2009).
- **Tallo:** Blanco-lanoso, con pelos simples y estrellados, erectos o ascendentes, pero por lo general mucho más corto (Vibrans, 2009).
- **Hojas:** Con pecíolos lanosos, de 0,5 a 3,5 cm de largo, subsésiles las de la parte superior, limbo anchamente ovado u orbicular, de 1,5 a 5 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, ápice obtuso o redondeado, borde crenado, pubescencia lanosa, principalmente en el envés (Vibrans, 2009).
- **Inflorescencia:** En forma de densos verticilastros axilares, subglobosos, de más o menos 1,5 cm de diámetro, con muchas flores, bractéolas más cortas que el cáliz, con el ápice recurvado (Vibrans, 2009).
- **Flores:** Tubulosas; corola blanca, de 5 a 8 mm de largo, tubo incluso en el cáliz, este es tubular, 10 dentado, de 3 a 7 mm de largo, dientes terminados en espinas ganchudas; filamentos subulados, anteras divergentes; estilo de 3 a 6 mm de largo (Vibrans, 2009).
- **Frutos y semillas:** Nuececilla de contorno oblongo a obovado de 1,8 a 2,3 mm de largo y 0,8 a 1,3 mm de ancho, color café, café grisáceo o café negruzco. Mericarpios ovoides, pardos, de más o menos 2,5 mm de largo, finamente granulados (Vibrans, 2009).
- **Plántulas:** Hipocótilo cilíndrico, de 4 a 8 mm de largo, piloso. Cotiledones de lámina ovada, de 3,5 a 4,5 mm de largo y 3 a 4 mm de ancho, de borde entero. Sin epicótilo. Hojas opuestas, vellosas en el haz y en el envés (Vibrans, 2009).

- **Características especiales:** Planta olorosa y de sabor amargo (Vibrans, 2009).

Figura 1. Planta de *Marrubium vulgare*



Fuente: Ministerio de la Protección Social de la Republica de Colombia, (2008).

Figura 2.Partes de la planta de *Marrubium vulgare*



Fuente: Carretero y Ortega, 2018.

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Marrubium vulgare*

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semillas)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae

Fuente: Vibrans, 2009.

Usos de la Especie *Marrubium vulgare*

www.bdigital.ula.ve

La Farmacopea europea define el Marrubio como “sumidades floridas desecadas, enteras o fragmentadas de *Marrubium vulgare* L.”. En algunos lugares se emplean también las raíces (Carretero y Ortega, 2018).

Las partes aéreas de la planta se emplean como tónico digestivo, diaforético, antitusígeno, aperitivo, carminativo y expectorante. Externamente se usan en el tratamiento de heridas, úlceras y lesiones cutáneas (Ministerio de la Protección Social de la Republica de Colombia, 2008).

Se conoce el empleo del Marrubio blanco desde la antigüedad, los antiguos egipcios y posteriormente Dioscórides (siglo I), ya lo recomendaban para combatir la tos. En medicina tradicional en el área mediterránea se utiliza la droga para tratar diversas enfermedades, entre ellas, problemas respiratorios (tos no productiva, bronquitis aguda, catarros), dispepsias, afecciones hepáticas y uterinas o en casos de hipertensión o diabetes. Se usa también como tónico amargo y estimulante del apetito. La medicina

Ayurvédica lo emplea en casos de bronquitis aguda o crónica y en la tosferina (Carretero y Ortega, 2018).

Mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* se han comprobado entre otras sus propiedades antiespasmódicas, hipoglucemiantes, antihipertensivas, vasorrelajantes, antiinflamatorias, analgésicas, gastroprotectoras, hepatoprotectoras, antioxidantes, etc. De la mayor parte de estas actividades se responsabiliza a marrubiina, aunque otros diterpenos y otros principios activos presentes en la droga, participan de forma importante en algunas de las actividades (Carretero y Ortega, 2018).

Composición Química de la Especie Marrubium vulgare

Contiene flavonoides (apigenina (Figura 3), luteolina (Figura 4), quercetina (Figura 5), vitexina (Figura 6), etc. y sus derivados; flavanos, flavanoles (Figura 7)); diterpenos (marrubiina (Figura 8), marrubiol (Figura 9), vulgarol (Figura 10), etc.), la farmacopea exige un contenido mínimo de 0,7% de marrubiina en relación con la planta desecada, aunque en ocasiones puede llegar a encontrarse hasta un 2%; ácidos fenólicos hidroxicinámicos (clorogénico (Figura 11), cafeico (Figura 12), acteósido (Figura 13), etc.); esteroides; taninos; aceite esencial (0,05-0,06%) de composición muy variable dependiendo de su origen (existen diversos quimiotipos), constituido por mono y sesquiterpenos (canfeno, alfa-pineo, sabineno, beta-cariofileno, triciclono, germacreno D, eudesmol, etc.) y sales potásicas. La marrubiina es una lactona diterpénica labdano-furánica que se forma a partir de la premarrubiina (compuesto que se encuentra en la planta fresca) y se considera el principal responsable de sus propiedades y también de su sabor amargo (Carretero y Ortega, 2018).

Figura 3. Estructura química de la apigenina

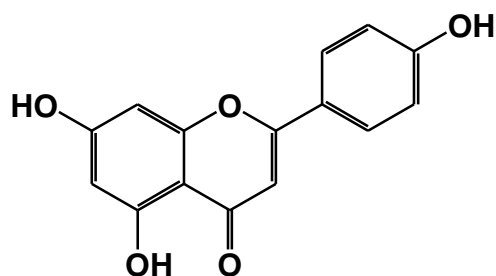


Figura 4. Estructura química de la luteolina

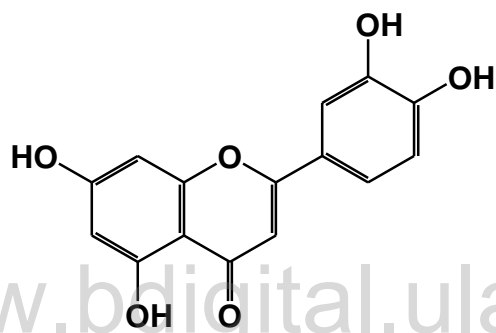


Figura 5. Estructura química de la quercetina

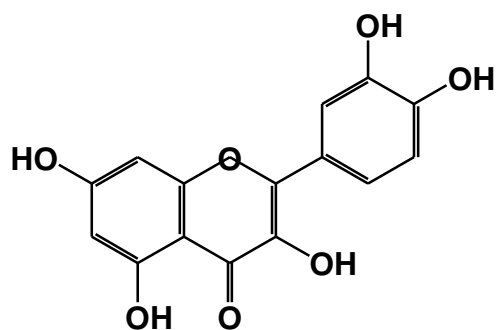


Figura 6. Estructura química de la vitexina

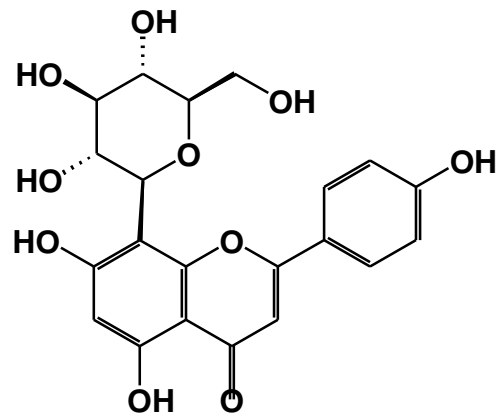


Figura 7. Estructura química del flavanol

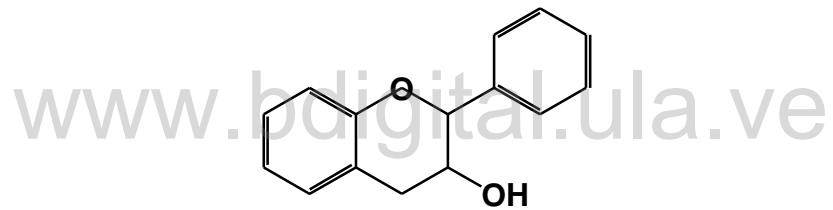


Figura 8. Estructura química de la marrubiina

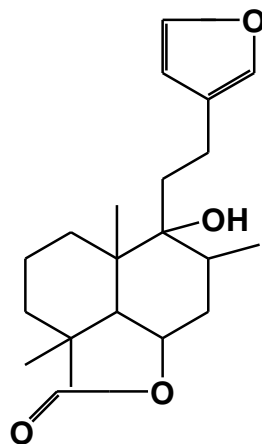


Figura 9. Estructura química del marrubiol

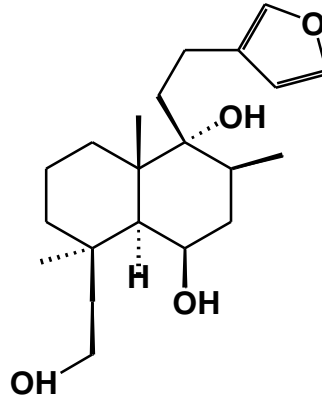


Figura 10. Estructura química del vulgarol

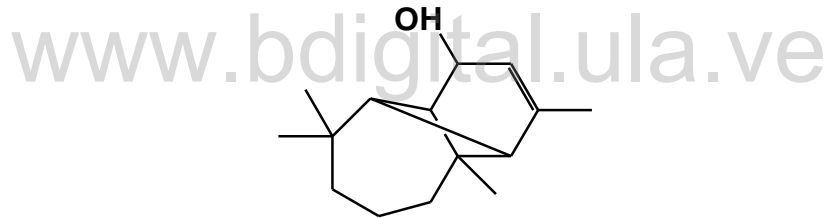


Figura 11. Estructura química del ácido clorogénico

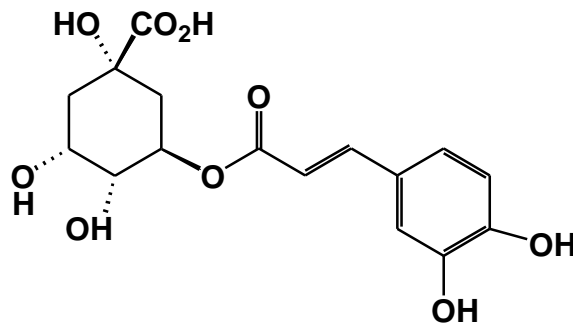


Figura 12. Estructura química del ácido cafeico

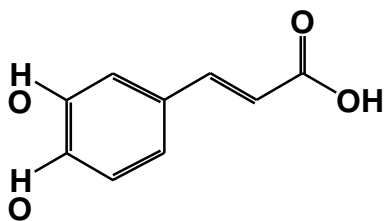
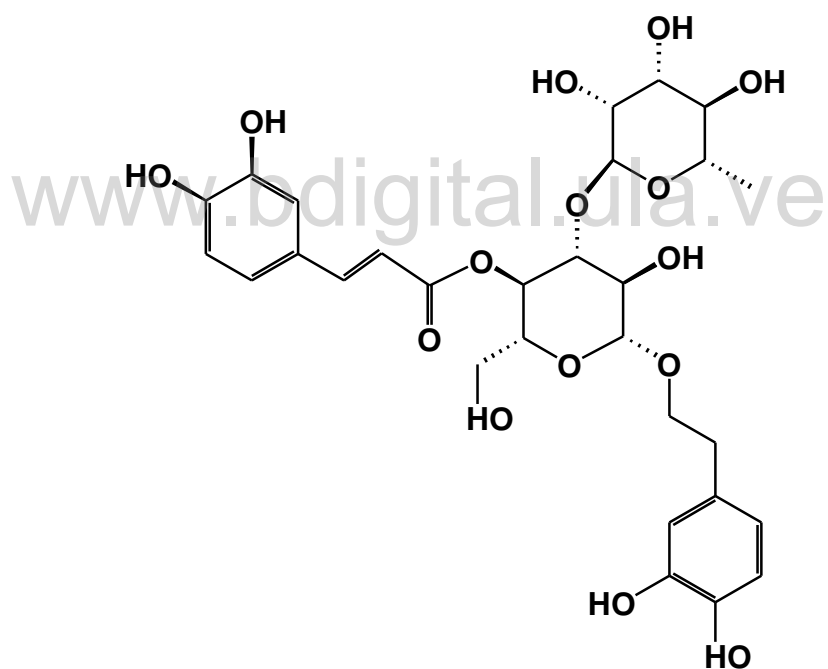


Figura 13. Estructura química del ácido acteósido



Posología recomendada de Marrubium vulgare

Según la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), (2013) a partir de los 12 años y para cualquiera de las tres indicaciones es la siguiente:

- **Infusión:** 1-2 g de droga triturada en 250 mL de agua, 3 veces/día.
- **Droga pulverizada:** 225-450 mg, 3 veces/día.
- **Jugo exprimido** (1:0,70-0,90): 10-20 mL, 3 veces/día.
- **Extracto fluido** (1:0,9-1,1; etanol 20-30%): 1,5-4 mL, 3 veces/día.

No se recomienda su empleo en menores de 12 años de edad. Se considera una droga bastante segura, los estudios de toxicidad aguda y subaguda en rata han sido negativos. Sin embargo, muy recientemente se ha publicado un estudio que evalúa la posible toxicidad de un extracto hidroalcohólico de Marrubio, a dosis elevadas, en ratas gestantes. Se han valorado los parámetros hematológicos y si se producen o no cambios en la morfología e histología del útero y el feto. El tratamiento a estos animales con dosis altas del extracto durante 19 días, disminuye los parámetros hematológicos y disminuye también la media de implantaciones del feto y su tamaño. Además, el estudio histológico del útero muestra la presencia de tejido embrionario y placentario lisado. En ratas no gestantes, no se observan variaciones macroscópicas ni histológicas en el útero. De estos resultados los autores del ensayo concluyen que dosis elevadas de Marrubio pueden ser abortivas (Carretero y Ortega, 2018).

Puede originar reacciones de hipersensibilidad a la propia planta o a otras especies de la misma familia. No utilizar la droga en casos de obstrucción biliar, íleo o enfermedad hepática y tener precaución en casos de úlcera gástrica (Carretero y Ortega, 2018).

Extractos Vegetales

Se definen como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta

fresca o seca (Ruíz y Susunaga, 2000). De una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener una diferente gama de sustancias. Por ejemplo, de la naranja amarga es posible obtener: violaxantina, limoneno, α -pineno, linalol, decanol, eriocitrina, narirutina, naringina, hesperidina, neohesperidina, poncirina, rutina, roifolina, diosmina, sinensetina, nobiletina o taringetina. Dependerá del solvente y la técnica, el extracto será rico en unas u otras sustancias (Santamaria, González y Astorga, 2015).

Los principios activos pueden ser diferentes compuestos, con estructuras químicas casi idénticas, por lo que un extracto puede tener una actividad mayor que el principio activo aislado y purificado. Además el extracto, como compuesto, suele presentar mayor estabilidad, actividad y tolerancia, careciendo, en la mayoría de los casos de efectos adversos o de generación de residuos (Santamaria, González y Astorga, 2015).

www.bdigitalula.ve

Obtención de los Extractos Vegetales

Como regla básica diremos que las fases para realizar extractos serían las que se reflejan en la Figura 14.

Figura 14.Ciclo de la extracción



Fuente: Santamaría, González y Astorga, (2015).

Hay que tener en cuenta que la concentración de las sustancias activas puede variar según la región donde se cultive la planta o la época del año en la que sea cosechada, por tanto, una vez obtenido el extracto, el siguiente paso es su estandarización (Santamaria, González y Astorga, 2015).

Extracción

Según Csáky y Martínez (1998), la extracción es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede irse como la separación de una sustancia de una mezcla por medio de un disolvente. Los dos tipos de separaciones por extracción más empleadas son:

- **Extracción líquido-líquido:** un compuesto orgánico se extrae de una fase acuosa por medio de un disolvente inmiscible con el agua (ya que la mayor parte de los compuestos orgánicos neutros son más solubles en un disolvente orgánico que en agua). Las distintas sustancias presentes se distribuyen entre las fases acuosa y orgánica de acuerdo con sus solubilidades relativas (Csáky y Martínez, 1998).
- **Extracción sólido-líquido:** consiste en tratar un sólido que está formado por dos o más sustancias con un disolvente que disuelve preferentemente una de ellas (ejemplo: mediante maceración) (Csáky y Martínez, 1998).

- **Extracción mediante Maceración:** El material vegetal previamente debe ser molido, picado y macerado; donde la maceración es una extracción que consiste en remojar dicho material debidamente fragmentado, en un disolvente permitiendo mayor área de contacto del sólido y el disolvente hasta que este penetre y disuelva las porciones

solubles. El proceso ha de buscar que el sólido y el líquido estén en movimientos continuos mediante agitación, para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambiente, se puede utilizar cualquier recipiente; en éste se coloca el sólido con el disolvente y se deja en reposo por un período de 72 horas. Para este método los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos (pentano, hexano), hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno) y menos frecuente los hidrocarburos halogenados. Al final del proceso se filtra el líquido obtenido, se exprime el residuo, y los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados (Bruneton, 1991).

La composición química de los extractos puede establecerse cualitativamente mediante el tamizaje fitoquímico, el cual consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Bruneton, 2001).

Cromatografía de Gases

La cromatografía es un método físico de separación en el cual los componentes se distribuyen en dos fases, una constituye la fase estacionaria y la otra es un fluido que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria. La fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido súper crítico que se usa como portador de la mezcla, y la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido dispuesto sobre un sólido que actúa como soporte, de gran área superficial (Harris, 2003).

En la cromatografía de gases se hace pasar el analito (componente de interés analítico de una muestra que se separa de la matriz) en forma gaseosa a través de una columna, arrastrado por una fase móvil gaseosa,

llamado gas portador. La fase estacionaria es un líquido no volátil que recubre la pared interior de la columna, que es un soporte sólido; en la cromatografía gas-sólido de absorción, el componente se absorbe directamente sobre las partículas sólidas de la fase estacionaria. La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta a través de un septo, en un inyector caliente, donde en el interior se evapora rápidamente. El vapor es arrastrado a través de la columna por el gas portador, puede ser Helio, Nitrógeno, Hidrogeno y los elementos de interés después de separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de una computadora; la columna debe de estar suficientemente caliente para que los analitos alcancen la presión adecuada y eluyan en un tiempo razonable, el detector se mantiene en una temperatura más elevada que la columna, de forma que los componentes se encuentren en forma gaseosa (Harris, 2003).

Los resultados pueden ser derivados a una impresora, obteniéndose un gráfico llamado cromatograma, con varios picos que corresponden cada uno a los componentes de la muestra. En dicho cromatograma, según el tiempo de retención y el área bajo el pico, se determina la naturaleza y concentración del analito por medio de una biblioteca almacenada en el equipo (Skoog, West y Holler, 2003).

Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (EM) es una técnica analítica que proporciona información tanto cualitativa (estructura) como cuantitativa (masa molecular o concentración), de las moléculas analizadas previamente convertidas en iones. Las moléculas de interés forman parte de una mezcla heterogénea que no requiere necesariamente una separación previa. Las mezclas se someten a una fuente de ionización, en donde se ionizan adquiriendo carga negativa o positiva, utilizando el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación

masa-carga. Los instrumentos usados en estos estudios se llaman espectrofotómetros de masas y se basan en el principio de que los iones pueden ser desviados a campos magnéticos, los cuales brindan información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales orgánicos e inorgánicos (Cocho, 2007).

Fitoquímica

En concordancia con (Shing, 2011) citado por (Flores, Castañeda, Montiel y Hernández, 2014), por definición, la fitoquímica es el estudio de los componentes químicos de las plantas. La técnica más común para obtener los Principios Activos (PA) a partir de plantas es conocida como extracción y su finalidad es la separación de la materia soluble (componentes fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble) por acción de un disolvente.

El término Fitoquímico 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. Existen más de 2.000 fitoquímicos en las plantas, que 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 (Instituto Nacional de Nutrición, 2008).

Según Balch, y Balch (2000), los fitoquímicos se describen como las sustancias biológicamente activas de las plantas, cuya función es proporcionarles color, sabor y resistencia natural contra las enfermedades. En este contexto, los llamados compuestos fitoquímicos o fitonutrientes, son elementos químicos obtenidos de las plantas y que se han identificado como elementos activos para la prevención de enfermedades (Knishinsky, 2000).

Para conocer el tipo de compuestos presentes en las plantas pueden usarse diferentes técnicas, tales como el tradicional tamizaje fitoquímico,

cromatografía de gases, cromatografía de capa delgada, cromatografía de líquidos de alta resolución, espectrofotometría de masas, espectrofotometría infrarrojo, entre otras (Lock, 1988).

Tamizaje o Screening Fitoquímico

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Universidad Interamericana para el Desarrollo, 2016).

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Universidad Interamericana para el Desarrollo, 2016).

Metabolitos Secundarios

Las plantas producen una amplia gama de compuestos orgánicos que no están involucrados en el metabolismo primario, es decir, que no poseen roles reconocidos en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación y que también difieren de los metabolitos primarios, por tener una distribución restringida en el reino vegetal, lo que significa que un producto secundario en particular, el metabolito secundario, generalmente se halla solo en una especie o en un grupo de especies taxonómicamente relacionadas (Taiz y Zeiger, 2002). A través del tiempo, el hombre ha hecho uso de los metabolitos secundarios con diversos propósitos, entre los que

pueden mencionarse el uso como saborizantes, colorantes, fragancias, insecticidas, drogas medicinales y adictivas, y cosméticos (Salisbury y Ross, 1992). En la actualidad, se conocen aproximadamente 20.000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

Metabolitos Secundarios presentes en las plantas

La síntesis de los productos naturales o metabolitos secundarios comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Existen tres intermediarios químicos principales como son la acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, entre otros (Gutiérrez y Estévez, 2009).

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de metabolitos secundarios, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. Es así como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por parte de las

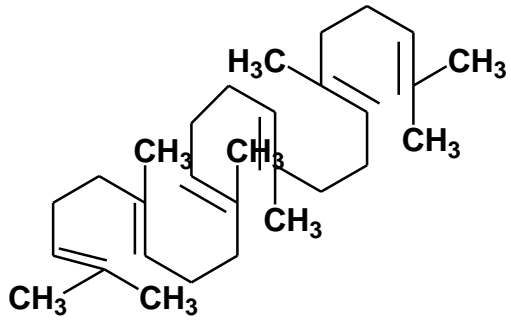
plagas (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003). Algunos metabolitos secundarios se mencionan a continuación:

- **Terpenos y esteroides:**

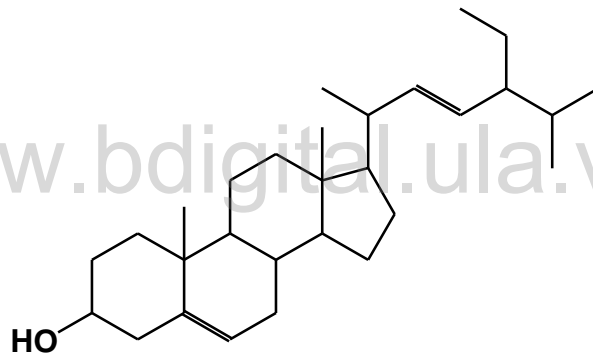
Los terpenoides y esteroides constituyen sin duda, el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. La inmensa mayoría de los terpenos son específicos del reino vegetal, pero se pueden encontrar en los animales: feromonas y hormonas juveniles sesquiterpénicas de los insectos, diterpenos de organismos marinos (*Celentéreos*, *Espongiarios*). Los esteroides vegetales, como los triterpenos (Figura 15), proceden -vía escualeno- del mevalonato: el mecanismo de su formación es ligeramente diferente de aquel que da lugar a los triterpenos y, casi siempre, su estructura «demuestra» su especificidad vegetal; cardiotónicos cardenólidos, alcalinas esteroídicas, saponósidos, fitosteroles (Bruneton, 2001). Poseen un hidroxilo en el C3 que les permite la unión con una o varias moléculas glucocídicas. Pueden establecerse dos grandes grupos dependiendo de su estructura química: triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos y esteroides (Pelczar y Reid, 1992).

Los compuestos esteroidales pueden interferir determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química: los de naturaleza hidrocarbonada, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Pelczar y Reid, 1992).

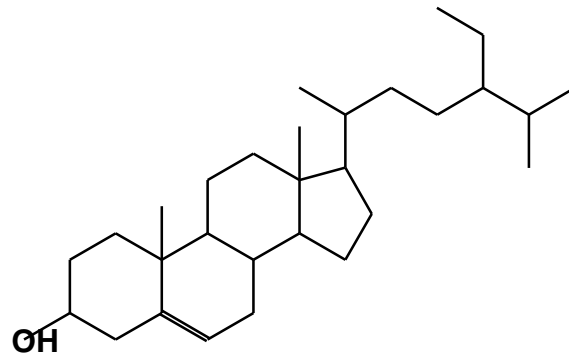
Figura 15. Estructura química del escualeno y sus derivados triterpenos cíclicos estigmasterol y sitosterol



Escualeno



Estigmasterol

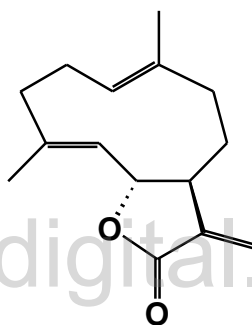


Sitosterol

- **Sesquiterpenlactonas:**

Son una clase de sesquiterpenoides (Terpenoides C15) con un anillo lactónico. Se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean con la terminación ólido que indica la existencia de un grupo funcional lactona (Figura 16). Inducen la apoptosis celular, por ende, tiene características antiinflamatorias y efecto citotóxico (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

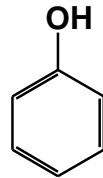
Figura 16. Estructura química del germacranólido



- **Compuestos fenólicos:**

La presencia de fenoles es una característica de todos los tejidos vegetales. Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol (Figura 17), pero la mayor parte de estos compuestos son polifenoles. Entre los polifenoles vegetales, de los que actualmente se conocen más de 8 000, figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides. Además de las estructuras monoméricas y diméricas, existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos. También se encuentran unidades fenólicas entre los compuestos nitrogenados, de los que un buen ejemplo es el aminoácido aromático tirosina (Azcón y Talón, 2000).

Figura 17. Estructura química del fenol

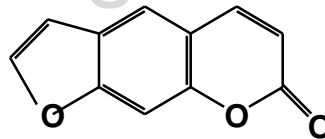


- **Cumarinas:**

Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopirano-2-ona (Figura 18). Se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm. Son inhibidoras de la geminación y altamente tóxicas para la célula (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

Figura 18. Estructura química del psolareno

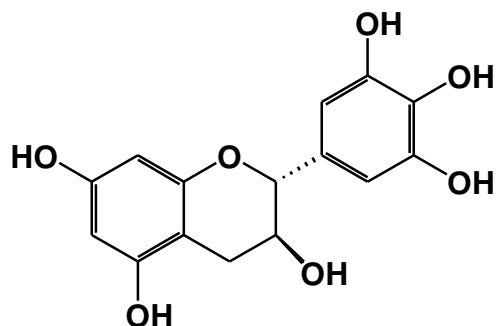
www.bdigital.ula.ve



- **Taninos:**

Los taninos (Figura 19) son compuestos químicos de carácter fenólico de alto peso molecular, no cristalizables, que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor muy astringente. Aunque su constitución química sea diferente entre un tipo de tanino y otro existen propiedades semejantes, por la presencia de grupos fenólicos en todos ellos (Sierra, Barros, Gómez, Mejía y Suarez, 2018).

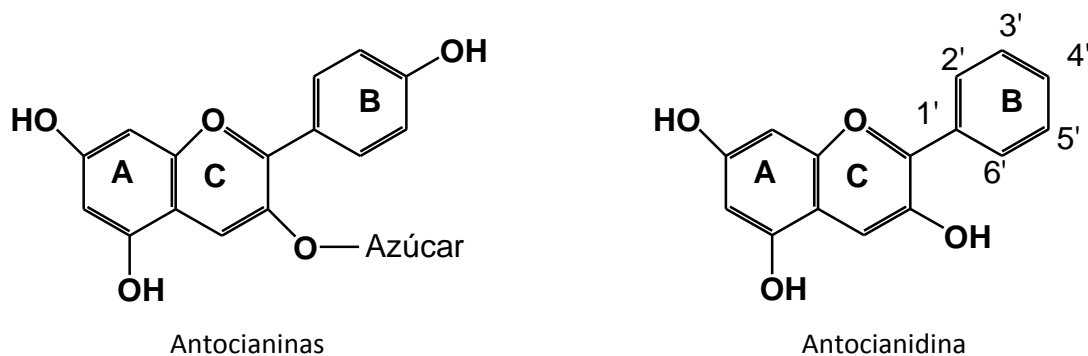
Figura 19. Estructura química de la galactoquina (tanino condensado)



- **Flavonoides:**

Los flavonoides (Figura 20) pertenecen a un grupo de compuestos naturales arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Se conoce como 10 clases de flavonoides los cuales pueden encontrarse como aglicona o bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa (Lock, Cabello y Doroteo, 2006).

Figura 20. Estructura química de antocianina y antocianidina



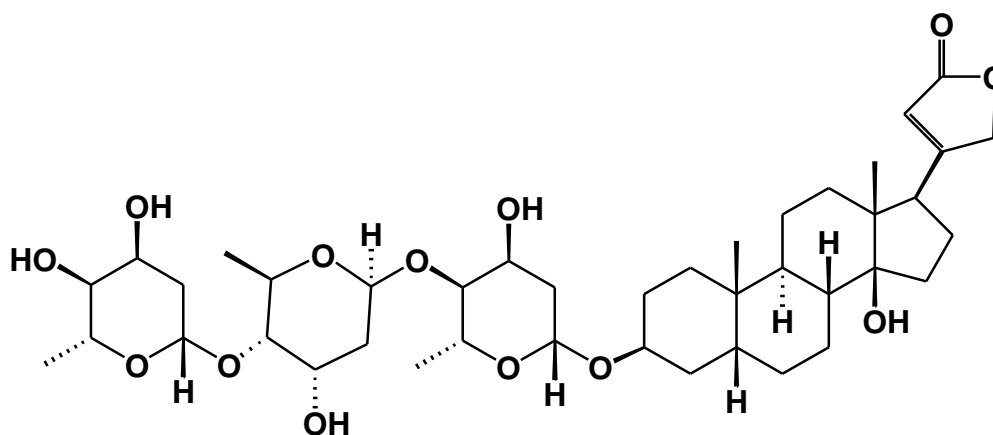
Se hallan presentes en todas las partes de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes

las flavonas y flavonoles y más restringidas en su ocurrencia, las isoflavonas, las chalconas y auronas. Estos compuestos poseen también importancia farmacológica, resultado de algunas propiedades importantes atribuidas a algunos representantes de las diferentes clases, como antiinflamatorio, antialérgico, antiulcerogénico, antiviral, anticarcinogénico; asimismo, son utilizados para el tratamiento de la fragilidad capilar, de la diabetes y de las afecciones cardiacas, entre otras. Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados (Lock, Cabello y Doroteo, 2006).

- **Glucósidos cardiotónicos:**

Una aglicona cardiotónica, estructuralmente está constituida por el sistema anular esteroidal (ciclopentano perhidrofenantreno) con los grupos metilos C-18 y C-19, un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un anillo lactónico α - β insaturado de cuatro carbonos unido al carbono 17 del núcleo esteroidal (Figura 21) (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

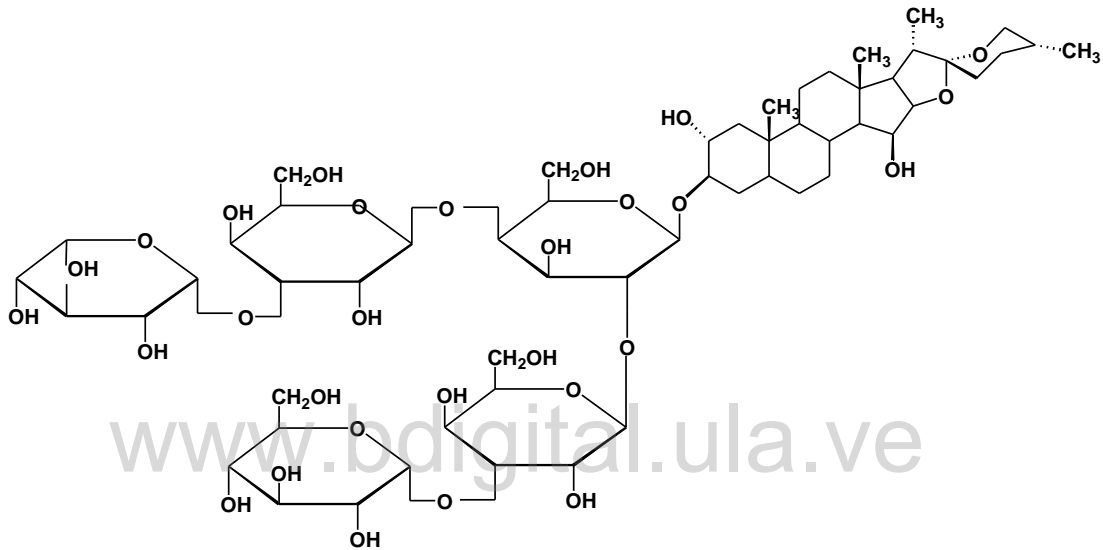
Figura 21. Estructura química de la digitoxina



- **Saponinas:**

Son compuestos que al agitarse en agua producen abundante espuma. Debido a esta propiedad, a las plantas que las contienen se les usa como jabón. Estructuralmente las saponinas (Figura 22) son compuestos orgánicos que contienen uno o varios azúcares (Romo, 2006).

Figura 22. Estructura química de la digitonina

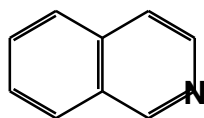


- **Alcaloides:**

Siguiendo la definición dada por (Miño, 2007), los alcaloides son compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de nitrógeno, generalmente en anillo heterocíclico y con actividad fisiológica específica. Estas sustancias son de origen biológico y sobre todo de origen vegetal. Por lo general, presentan un nitrógeno heterocíclico, como amina primaria ($R-NH_2$), secundaria ($R'-NH$) o terciaria ($R''-N$). Son particularmente activos en el metabolismo vegetal. Se los considera como depósitos para síntesis proteicas y estimulantes o reguladores de actividades como el crecimiento, metabolismo y reproducción.

Por otro lado, estos presentan una diversidad estructural siendo la clasificación más destacada la de alcaloides isoquinolínicos, llamados así por poseer como base en su estructura la isoquinolina (Figura 23) (Peña, 2011).

Figura 23. Estructura química de la isoquinolina



Microbiología

La microbiología es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos, seres vivos pequeños no visibles al ojo humano, también conocidos como microbios. Se dedica a estudiar los organismos que son sólo visibles a través del microscopio: organismos procariontas y eucariotas simples. Son considerados microbios todos aquellos seres vivos microscópicos, estos pueden estar constituidos por una sola célula (unicelulares), así como pequeños agregados celulares formados por células equivalentes (sin diferenciación celular); estos pueden ser eucariotas (células que poseen envoltura nuclear) tales como hongos y protistas; y procariontas (células sin envoltura nuclear) como las bacterias. Sin embargo la microbiología tradicional se ha ocupado especialmente de los microorganismos patógenos entre bacterias, virus y hongos, dejando a otros microorganismos en manos de la parasitología y otras categorías de la biología (Madigan, Martinko y Parker, 2004).

Microorganismos

También llamado microbio u organismo microscópico, son conjunto de seres vivos que se caracterizan por tener un tamaño pequeño de modo que la mayoría de ellos no son visibles a simple vista, teniendo una gran sencillez en su estructura y organización. Se explica, que son organismos dotados de individualidad que presentan, a diferencia de las plantas y los animales, una organización biológica elemental. Tenemos pues, que en su mayoría son unicelulares, aunque en algunos casos se trate de organismos cenóticos compuestos por células multinucleadas, o incluso multicelulares. Así mismo, dentro de los microorganismos se encuentran organismos unicelulares procariotas, como las bacterias, y eucariotas, como los protozoos, una parte de las algas y los hongos, e incluso los organismos de tamaño ultramicroscópico, como los virus. Sucede, que, con el desarrollo de la física, la química y la medicina se acumularon conocimientos; y el desarrollo de la óptica ha permitido ver los organismos más pequeños (Prats, 2007).

Microorganismos patógenos

Los microorganismos patógenos son causantes de daños en nuestro cuerpo o en algún lugar natural, provocando diferentes enfermedades, dependiendo de qué microorganismo se encuentre inserto en nuestro cuerpo o en algún lugar natural. Existen tres tipos de microorganismos patógenos que son: bacterias, virus y hongos. Estos se pueden encontrar en nuestro cuerpo o en superficies inertes (De La Rosa, Prieto y Navarro, 2011).

Procariotas y Eucariotas

La unidad fundamental de la vida es la célula y a pesar de su complejidad y variedad todas las células vivientes pueden ser clasificadas

dentro de dos grandes grupos: Eucariotas y Procariotas, basadas en su estructura cuando son vistas a través del microscopio electrónico. Las células procariotas y eucariotas son químicamente similares: ambas poseen ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, carbohidratos, ambas usan el mismo tipo de reacciones químicas para metabolizar alimentos, sintetizar proteínas y almacenar energía. Sin embargo, difieren en algunos aspectos fundamentales, la célula procariota es aquella célula u organismo que carece de un núcleo verdadero y presenta su ADN en una sola molécula generalmente en forma circular; mientras que las células eucariotas son aquellas células u organismos que poseen un núcleo verdadero (cromosomas), delimitado por una membrana nuclear y que presentan otras estructuras delimitadas por membranas denominadas organelos como por ejemplo: mitocondrias, retículo endoplasmático, aparato de golgi, etc. (UCV, 2017).

www.bdigital.ula.ve **Bacterias**

Son microorganismos procariotas unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico, se reproducen por división asexual. Poseen membrana citoplasmática, citoplasma, ADN y ARN, ribosomas y pared celular. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: una pared celular Grampositiva y una pared celular Gramnegativa. Su tamaño es variable entre 1 – 5 μm (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Las bacterias se clasifican principalmente basándose en las características morfológicas, tintoriales, bioquímicas, fisiológicas y ecológicas (Ramírez y cols., 2010):

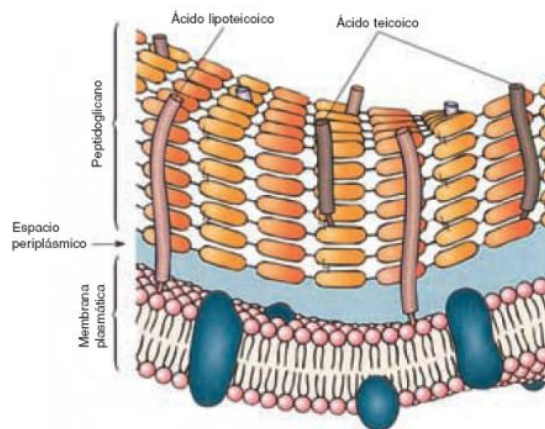
- **Según su morfología (forma):**
 1. Cocos: Presentan forma esférica, pueden ser individuales o en pares (diplococos), en cadenas (Streptococos) y en racimos (Estafilococos).

2. Bacilos: Presentan forma de bastón con extremos redondos, cuadrados, fusiformes y curvos.
 3. Cocobacilos.
 4. Espirilos: Bacteria rígida con forma espiral.
 5. Espiroquetas: Bacteria flexible con forma espiral.
 6. Formas filamentosas.
- **Según sus requerimientos de oxígeno:**
 1. Bacterias aeróbicas: Son aquellas que necesitan oxígeno para crecer, entre los aeróbicos tenemos: los aerobios obligados, requieren una tensión absoluta de oxígeno (en el aire el O₂ comprende un 21%); y los microaerófilos, requieren tensiones de oxígeno inferiores a la atmosférica (del 2 al 10% de O₂), bajo la forma de CO₂.
 2. Bacterias anaeróbicas: Son aquellas que crecen en ausencia de O₂. Existen tres categorías de anaerobios tenemos: los anaerobios obligados (o estrictos), el oxígeno les resulta tóxico; los anaerobios aerotolerantes, pueden crecer en presencia de O₂, aun cuando no pueden utilizarlo, debido a que poseen enzimas detoxificadoras. Los anaeróbicos facultativos pueden realizar metabolismo energético aeróbico o anaeróbico, dependiendo al medio ambiente donde se encuentren.
 - **Según la temperatura óptima de crecimiento:**
 1. Termófilas: Crecen a una temperatura entre 25 y 80°C (50-60°C).
 2. Mesófilas: Se desarrollan entre -5 y 30°C (10-20°C).
 - **Según sus características tintoriales:** En 1884, el físico danés Hans Christian Gram desarrolló una tinción compuesta, sobre la base de esta coloración las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. Bacterias Gram positivas: Son aquellas bacterias que poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática, este es un elemento clave para la estructura, la replicación y supervivencia de la célula. Posee también otros componentes como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos. Los ácidos teicoicos son unos polímeros hidrosolubles de fosfato de polioliol que están unidos al peptidoglicano mediante enlaces covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular. Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplasmática, estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que diferencian los serotipos bacterianos (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Estas bacterias cuya pared celular de peptidoglicano es más densa (Figura 24), al ser deshidratadas cierran sus poros impidiendo la salida del complejo violeta de genciana-yodo (colorante primario), adquiriendo así un color púrpura que le atribuye su característica Gram positiva (Ramírez y cols., 2010).

Figura 24. Pared celular de las Bacterias Gram positivas



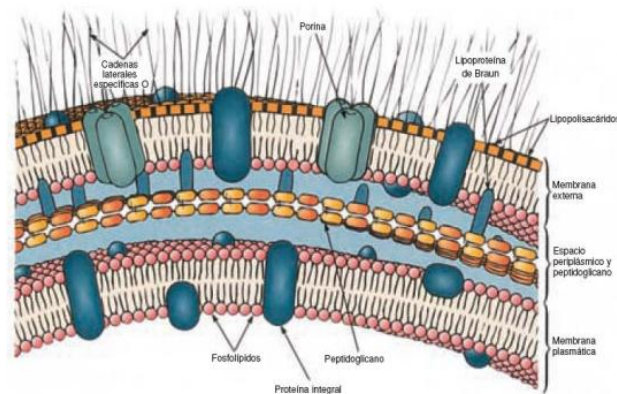
Fuente: Universidad Central de Venezuela (UCV), 2017.

2. Bacterias Gram negativas: Son bacterias que poseen una capa de peptidoglicano delgada, una membrana externa que contiene fosfolípidos, proteínas, y lipopolisacaridos, los cuales están formados por tres regiones estructurales: el lípido A, región central del polisacárido, y antígeno O, el espacio periplásmico existente entre la membrana citoplasmática y la membrana externa contiene las proteínas de transporte, degradación, y síntesis de la pared celular. La membrana externa está unida a la membrana citoplasmática en unos puntos de adhesión; asimismo está fija al peptidoglicano por enlaces de lipoproteínas (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Estas bacterias cuya pared celular es rica en lípidos (Figura 25), al decolorar quedan poros en su pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana-yodo y al adicionar la safranina (colorante de contraste) toman el colorante por lo que se observan color rosado, característica bacteriana Gram negativa (Ramírez y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

Figura 25. Pared celular de las Bacterias Gram negativas



Fuente: Universidad Central de Venezuela (UCV), 2017.

Tinción de GRAM

La tinción de Gram suele utilizarse para el examen directo por microscopía de las muestras y los sub-cultivos. El violeta de genciana (cristal violeta) es el colorante principal; se une a la pared bacteriana luego del tratamiento con una solución débil de yoduro, que actúa como mordiente para fijar el colorante. Algunas especies de bacterias, como consecuencia de la naturaleza química de sus paredes celulares, tienen la capacidad de retener el violeta de genciana aun luego del tratamiento con un decolorante orgánico, como la mezcla de dos partes iguales de acetona y alcohol etílico al 95%. Las que retienen el colorante aparecen de color azul-negro cuando se observan con el microscopio y se denominan Gram positivas. Ciertas bacterias pierden el colorante principal de violeta de genciana cuando se les trata con el decolorante, debido tal vez al alto contenido de lípidos de su pared celular, éstas cambian de color, toman la contracoloración de safranina y aparecen de color rojo vistas con el microscopio: son las Gram negativas (Koneman y Allen, 2008).

Agentes Antimicrobianos

Puede definirse como agente antimicrobiano la sustancia producida por microorganismos o sintetizada químicamente, que en bajas concentraciones es capaz de inhibir e, incluso, destruir microorganismos sin producir efectos tóxicos en el huésped (Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro y Portoles, 2008). Estos fármacos, se dividen en antibacterianos, antivirales, antimicóticos, antimicrobianos, antiparasitarios y antirretrovirales (Girón, 2008).

Métodos para evaluar la Actividad Antibacteriana

Algunos métodos para la determinación de actividad antibacteriana se describen a continuación:

- ***Método de dilución en caldo o en agar:*** Se preparan tubos con la concentración definida de antibiótico y se le agrega a cada tubo una cantidad conocida del agar Müller-Hinton, este tubo se homogeniza y se vierte en una placa de Petri con lo que se logra una placa de agar Müller-Hinton con el antibiótico diluido a una concentración determinada (Reyes, Palou y López, 2014).

Generalmente se inicia a una concentración de 128 µg/mL y se hacen diluciones dobles hasta obtener el gradiente decreciente en la concentración de antibiótico (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 µg de droga activa). La elección de la concentración en la que se inicia el gradiente, depende del antibiótico y del tipo de cepa a probar (Reyes, Palou y López, 2014).

Adicional a esto, se inocula una placa de Müller-Hinton sin antibiótico, que sirve como control positivo de crecimiento. La placa se incuba a 35°C por 18 a 24 horas y se revisa el crecimiento, siempre contra el control positivo. Si la cepa logra crecer en la superficie del medio de cultivo, se reporta como resistente a esa concentración del antibiótico. Si, por el contrario, no crece, se reporta como sensible a esa concentración de antibiótico (Reyes, Palou y López, 2014).

Preparar un gradiente de medios de cultivo con una concentración decreciente de antibiótico, hace que esta técnica sea muy engorrosa por lo que se utilizan sólo dos diluciones, una arriba del punto de quiebre del antibiótico y otra debajo de este valor. El punto de quiebre es un valor matemático, que expresa un punto o concentración arriba del cual la cepa se debe interpretar como resistente al antibiótico. Basándose en este criterio, al

escogerse dos concentraciones, una abajo y otra arriba del punto de quiebre, si la cepa crece en las dos concentraciones es resistente, si crece sólo en la concentración bajo el punto de quiebre, la cepa es intermedia y sensible si no crece en ninguna (Reyes, Palou y López, 2014).

- **Método Epsilométrico (Etest):** Este método emplea una tira con una matriz plástica que tiene una concentración decreciente de un antibiótico determinado. El medio que se usa es agar sangre con sangre de caballo al 5% y con una base de Müller-Hinton o puede utilizarse agar HTM (Medio Test Haemophilus) o agar chocolate suplementado; se determina solamente la concentración mínima inhibitoria y ésta se encuentra en la interfase de la elipse. La lectura debe ser muy cuidadosa y puede hacerse con la ayuda de una lupa. Se recomienda que, si la interfase cae entre dos puntos, se elija la concentración más alta y también es muy importante la observación de pequeñas colonias presentes en las zonas de bajo crecimiento, lo que puede indicar resistencia o bajos niveles de esta (Alippi, Reynaldi y López, 2013).

La técnica empleando las tiras de Etest es considerablemente más rápida y requiere una menor cantidad de medio de cultivo que la técnica de dilución en agar, por lo que puede adaptarse fácilmente al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas (Alippi, Reynaldi y López, 2013).

- **Método de difusión en agar (Kirby-Bauer):** Esta técnica fue estandarizada por Kirby y Bauer en 1966. Se basa en la inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de un disco de papel de filtro impregnado con cantidades conocidas de los agentes antimicrobianos. Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en la superficie de una placa con medio de cultivo, sobre él se depositan los discos de papel impregnados, los cuales difunden casi instantáneamente a través del

agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente, se lleva a incubar a 37°C durante 18 horas. El microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los discos cuya concentración de antimicrobiano es inhibitoria. El diámetro de halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo, (este halo es medido en milímetros) (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009). Aunque es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina, solo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibióticoterapia. El microorganismo de ensayo debe provenir de un cultivo puro y el inóculo bacteriano debe estar ajustado al patrón 0,5 de turbidez de McFarland; posteriormente se realiza el inóculo en un medio predeterminado para el microorganismo (Ramírez y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

Antibióticos

Según la OMS (2018), los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. Son moléculas derivadas del metabolismo de bacterias y hongos principalmente, pero también pueden ser compuestos obtenidos por síntesis química para inhibir el crecimiento o destruir a microorganismos causantes de infecciones. Los antibióticos pueden ejercer su acción antimicrobiana a través de alguno de los cinco mecanismos que utilizan para actuar y causar daño en alguna de las rutas metabólicas esenciales para la sobrevivencia de las bacterias (De la Fuente, Villarreal, Díaz y García, 2015). Estos mecanismos incluyen:

- ***Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana:*** las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemos,

pertenecen a la familia de los betalactámicos ya que la base de su estructura química es el anillo betalactámico. Inhiben la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a enzimas que actúan en la fase final de la síntesis del peptidoglucano inactivándolas, es decir inactivan a las proteínas ligadoras de las penicilinas (PBP), además, inducen un efecto autolítico, por lo tanto, su efecto es bactericida (Marín y Gudiol, 2003).

- ***Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática:*** los polipéptidos son antibióticos bactericidas altamente nefrotóxicos, por lo que están restringidos a uso tópico, es decir, para el tratamiento de infecciones cutáneas, oftálmicas y óticas, ya que no se absorben. En microbiología se utilizan principalmente para la identificación de algunos bacilos gramnegativos no fermentadores y para la elaboración de medios selectivos. Su estructura química está conformada por polipéptidos que se unen a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, alterando su permeabilidad y ocasionando su destrucción (Pigrau, 2003).
- ***Inhibidores de la síntesis de proteínas:*** Este grupo de antibióticos actúa uniéndose a la unidad 30S ribosomal o a la unidad 50S ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas (Mensa, García y Vila, 2003):
 1. **Antibióticos que actúan en la unidad 30S ribosomal:** aminoglucósidos y tetraciclinas.
 2. **Antibióticos que actúan en la unidad 50S ribosomal:** fenicoles, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas, ketólidos, oxazolidinonas. En líneas generales, los antibióticos pertenecientes a estos grupos son bacteriostáticos excepto los aminoglucósidos y streptograminas que son bactericidas.

- **Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos:** Se dividen en rifamicinas, quinolonas y sulfamidas (González y Saltigeral, 1992):
 1. **Las rifamicinas:** son un grupo de antibióticos de estructura compleja que inhiben la síntesis de ARN bacteriano mediante la inhibición de la enzima ARN polimerasa, su acción es bactericida.
 2. **Las quinolonas:** son un grupo de antibióticos sintéticos que actúan sobre la replicación del ADN bacteriano inhibiendo la acción de la ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV, que se encargan del superenrollamiento de la molécula de ADN y separación de las cadenas de la doble hélice durante la replicación bacteriana. Su acción es bactericida.
 3. **Las sulfamidas:** son un grupo de antibióticos con actividad contra bacterias y protozoarios. El trimetoprim, que tiene actividad contra bacterias, es un análogo del ácido dihidrofólico, compuesto esencial en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo así la síntesis de ADN y ARN. Su efecto es bactericida. Este grupo de antibióticos fueron los primeros quimioterápicos eficaces que se administraron por vía sistémica para prevenir y tratar infecciones en humanos. Las sulfonamidas son análogos del ácido para-aminobenzoico (PABA), compuesto necesario en la síntesis del ácido fólico, que actúan inhibiendo la enzima dihidropteroato sintetasa, enzima que incorpora el PABA en la síntesis del ácido fólico. Su efecto es bacteriostático (De la Fuente, Villarreal, Díaz y García, 2015).

Sin embargo, cuando un antibiótico aplicado en la dosis habitual es incapaz de causar daño en los microorganismos, se dice que ha adquirido resistencia al agente antimicrobiano (De la Fuente, Villarreal, Díaz y García, 2015).

Resistencia Antimicrobiana

Es la capacidad de las bacterias u otros microorganismos para contrarrestar el efecto de algún antibiótico; esta resistencia sobreviene cuando la bacteria sufre algún cambio que reduce o elimina la efectividad de antibiótico, compuestos químicos o cualquier otro agente destinado para curar o prevenir alguna infección. La resistencia puede ser una consecuencia evolutiva vía la selección natural, pero también es causada por el uso indiscriminado de los agentes antimicrobianos (De la Fuente, Villarreal, Díaz y García, 2015). Este es un fenómeno biológico natural debido a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genético, existiendo una clara correlación entre el uso de antibióticos y la resistencia bacteriana (Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011). Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven resistentes a los antibióticos. Estas bacterias fármaco resistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes (OMS, 2018). Existen diferentes tipos de resistencia entre ellos están:

- ***Natural o intrínseca***: todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación sensibles (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).
- ***Adquirida***: Constituye un problema en la clínica, se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un

microorganismo en otros tiempos sensibles (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

Mecanismos de Resistencia Bacteriana

El fenotipo de resistencia antibiótica es perceptible gracias a la presencia de uno o más mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en la bacteria. Dentro de los tipos de mecanismos moleculares de resistencia destacan por su relevancia: inactivación enzimática, alteraciones en el sitio blanco y alteraciones de la permeabilidad (Mosquito, 2011).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. La CMI se ha establecido como "gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005).

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). (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005).

Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005).

Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005).

Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología) (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005).

Existen diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de forma rutinaria, y de manera semicuantitativa, las CMI (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Se puede realizar mediante: Difusión en agar (Disco placa y E test), dilución (Medio sólido y medio líquido (micro/macrodilución)), mecanizados y automatizados (Horna, Silva, Vicente y Tamariz, 2005).

Cultivo o material de referencia

Son cultivos provenientes de una colección reconocida nacional o internacionalmente, acompañada de un certificado que especifique las características fenotípicas y genotípicas. Término colectivo que se refiera a cepas de referencia, cepas de reserva y cepas de trabajo (Departamento del Meta, 2015).

Ahora, según Técnicas de Control Metrológico (2014), las cepas de referencia son cultivos conservados y distribuidos por Colecciones de Cultivo, cuyos microorganismos se encuentran definidos como mínimo a nivel de género y especie. Los laboratorios microbiológicos deben utilizar en el control de sus técnicas y de los medios implicados las cepas indicadas en las normas de referencia (por ejemplo la norma ISO 11133 parte 1 y 2). Los microorganismos se relacionan con su medio, se reproducen, mutan, mueren, etc. Debido a que en estos casos el material de referencia es un ser vivo, es necesario que el laboratorio lo gestione y conserve de forma adecuada, estandarizando sus lotes de cepas de reserva y de trabajo,

cuantificando la concentración microbiana con métodos apropiados y garantizando las condiciones de conservación más adecuadas.

Hipótesis

Después de delimitar el problema de investigación y clasificar el estudio como una investigación confirmatoria, se propone la siguiente hipótesis: Existe o no una relación causal entre la composición química de los extractos obtenidos de las hojas de *Marrubium vulgare* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de la especie vegetal *Marrubium vulgare*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de la especie vegetal <i>Marrubium vulgare</i> .	Independiente Cualitativa Discreta	Metabolito secundario o Producto natural que se usa como sinónimo, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
<p>- Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.</p> <p>- Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas usando espectrofotómetros de masas, los cuales brindan información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales orgánicos e inorgánicos cuya respuesta aparece en la pantalla de una computadora dependiendo de las características químicas de los metabolitos secundarios.</p>	<p>Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alcaloides. - Esteroles y/o triterpenos. - Saponinas. - Compuestos fenólicos simples. - Taninos. - Flavonoides. - Quinonas y Antraquinonas. - Cumarinas. - Sesquiterpenlactonas. <p>Para la cromatografía de gases:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Revelador físico: pantalla de una computadora. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alcaloides: la aparición de turbidez o precipitados. - Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. - Formación de abundante espuma, para saponinas. - Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. - Un precipitado blanco indica presencia de taninos. <p>Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Para antraquinonas y quinonas una coloración roja. -Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul-violeta. - Las coloraciones roja, violeta o rosa para sesquiterpenlactonas.

Fuente: Villarreal y Cordero, 2020.

Tabla 3.Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana presente en los extractos de la especie vegetal *Marrubium vulgare*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de la especie vegetal <i>Marrubium vulgare</i> .	Dependiente Cuantitativa Discreta	Actividad antibacteriana, es la propiedad de ciertas sustancias cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos (Mandell, 2012).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Se puede medir por la actividad antibacteriana: -Método de difusión de Kirby-Bauer en disco.	Cepas Grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212. Cepas Gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. - <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357.	-Sensible -Sensibilidad intermedia -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas Grampositivas y Gramnegativas.

Fuente: Villarreal y Cordero, 2020.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Este proyecto se efectuó como una investigación confirmatoria, ya que se confirmó la relación de causa-efecto entre la actividad antibacteriana y el extracto natural de *Marrubium vulgare* en cepas de bacterias de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la Investigación

La presente investigación fue realizada con un diseño experimental, ya que la especie vegetal *Marrubium vulgare* fue sometida a determinados tratamientos, para observar los efectos o reacciones de la misma. El estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones y en el Laboratorio de Actinomicetos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en un lapso de tiempo determinado.

Población y Muestra

La población está integrada por la especie *Marrubium vulgare*, perteneciente a la familia Lamiaceae, ubicada en la región de Los Andes,

Chachopo, municipio Miranda del estado Mérida. La muestra a su vez está representada por las hojas de la misma especie.

Sistema de Variables

Las variables en esta investigación fueron sistematizadas en dependiente e independiente, considerando el marco teórico y los objetivos. La variable dependiente fue: Actividad antibacteriana de los extractos de la especie vegetal *Marrubium vulgare*. La variable independiente fue la composición química de los extractos de la especie vegetal *Marrubium vulgare*.

Instrumento de Recolección de datos

En este proyecto de investigación se empleó la observación estructurada como técnica, la cual consiste en visualizar la presencia o ausencia de los diferentes fitocompuestos presentes en los extractos de la planta a través de reacciones químicas cualitativas. Además de describir, la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos en estudio mediante la medición de los halos de inhibición frente a las concentraciones de los extractos obtenidos de *M. vulgare*; descritos en las tablas de resultados 6 y 7 respectivamente.

Procedimiento o Metodología

Recolección del Material Vegetal

El material vegetal utilizado en esta investigación fue la especie *Marrubium vulgare*, la cual fue recolectada en la región de Los Andes, específicamente en Chachopo, municipio Miranda del estado Mérida,

obteniendo de ella sus hojas y almacenándolas en bolsas plásticas para su posterior procesamiento (Esquema 1).

Material Biológico

Para la actividad antibacteriana se utilizaron cepas de bacterias ATCC (Colección de Cultivos Tipo Americano). Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Las cuales fueron obtenidas de los Laboratorios de Bacteriología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes; fueron sometidas a las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión en agar y concentración mínima inhibitoria, en el Laboratorio de Actinomicetos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

www.bdigital.ula.ve

Extracción y preparación del extracto vegetal

Para la extracción del material vegetal, se tomaron 285,29 gramos de hojas de *Marrubium vulgare*, las cuales fueron secadas en la estufa durante 72 horas obteniendo 93,40 gramos de las mismas (figura 26), seguidamente se sometieron a maceración (extracción sólido-líquido) en 2 disolventes orgánicos durante 120 horas cada uno: hexano destinado para extraer los componentes menos polares, y etanol para extraer los componentes más polares. Posteriormente se filtraron (figura 27) y separaron en un rotavapor (figura 28) a las diferentes temperaturas de ebullición de los solventes; los extractos concentrados se colocaron en envases estériles de vidrio y al reposar algunos días se secaron y se le realizaron pruebas cualitativas de tamizaje fitoquímico, de esta manera dando a conocer los metabolitos secundarios presentes en cada uno de ellos, por último dichos extractos

fueron almacenados para posteriormente ser utilizados en la actividad biológica.

Figura 26. Pesado del material vegetal previamente molido



www.bdigital.ula.ve

Figura 27. Filtración luego de la maceración



Figura 28. Concentración de los extractos en el rotavapor



Tamizaje Fitoquímico

Para determinar la presencia e identificación de metabolitos secundarios en los extractos de *Marrubium vulgare* se efectuaron las siguientes pruebas químicas cualitativas:

- ***Terpenos y/o Esteroles (Ensayo de Libermann-Burchard):*** el reactivo se prepara mezclando 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una gota del reactivo se le añade a la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 mL de cloroformo o sin disolver, la aparición de un color azul o verde, es prueba positiva para esteroides y color rojizo para triterpenos, en el lapso de una hora, particularmente los insaturados (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- ***Fenoles (Ensayo de Cloruro férrico (FeCl₃)):*** se disuelve la muestra (1-2 mg) en 1 ml de etanol, añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5%

en etanol; la coloración azul a negro es prueba positiva para compuestos fenólicos (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

- **Quinonas o Antraquinonas:** las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas. Se disuelve la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de hexano, y se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado en ambos tubos, la ausencia de coloración roja indica la negatividad de la prueba en los dos tubos (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Flavonoides (Ensayo de Shinoda):** se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, otro color naranja, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Sesquiterpenlactonas (Prueba de Baljet):** se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se prepara pesando 1 g de ácido pícrico y disolviéndolo en 2 mL de etanol; para la solución B se pesan 10 g de hidróxido de sodio, disolviéndolos en 2 mL de agua. Para la prueba se ponen 3 a 4 mg de reactivo, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma coloración naranja o roja oscura (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Alcaloides (Ensayo Dragendorff , Wagner y Mayer):** pesar 1-2 mg de la fracción etanólica y adicionar 5 mL de Ácido Clorhídrico (HCl) 10 %, colocar en baño de María hasta la ebullición por 30 minutos. Filtrar, y el filtrado distribuirlo en 3 tubos de ensayo para adicionar a cada uno gotas

del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Mayer). La aparición de turbidez y un precipitado indica la positividad de la prueba (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

- **Cumarinas (Hidróxido de amonio concentrado):** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de hexano, se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado a ambos tubos, se llevaron los tubos a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm. Se considera positiva la prueba si presenta una fluorescencia azul-violeta (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Saponinas (Prueba de altura y estabilidad de espuma):** colocar en un tubo una pequeña cantidad de cada una de las fracciones y adicionar 1 mL de agua. Agitar vigorosamente durante un minuto. La prevalencia de espuma durante más de 15 minutos indica la positividad de la prueba. (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La separación e identificación de los componentes del extracto hexanólico de *Marrubium vulgare* se realizó en un cromatógrafo de gases modelo 6890 (figura 29), equipado con detector de masas marca Hewlett Packard Modelo 5973, inyector automático y una columna capilar HP-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m de espesor de la película. Temperatura de la fuente 230 ° C; temperatura del cuádruplo 150 ° C; gas portador helio ajustado a una 40 velocidad lineal de 34 cm/s; energía de ionización 70 eV; amplitud del scan 40-500 amu; 3,9 scans s⁻¹. El volumen inyectado fue de 1,0 μ L de una solución de 5 mg de cada extracto en hexano, acetona, con relación de reparto de 1:1. El programa de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial de 100 ° C con incremento de 5 ° C por minuto hasta una

temperatura final de 260 ° C, con un tiempo de recorrida de 50 minutos. La determinación de los componentes se realizó mediante comparación de los espectros de masas de la librería Wiley 6ta Edición (Adams, 2007).

Figura 29. Cromatógrafo de gases modelo 6890 equipado con detector de masas marca Hewlett Packard Modelo 5973.



Fuente: Villarreal, 2020.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Fue realizada bajo tutoría de la Prof. Yndra Cordero. El método utilizado durante este procedimiento fue el de difusión en agar con discos según Kirby Bauer, donde se determinó la actividad antibacteriana de los extractos a partir de las hojas de la especie *Marrubium vulgare*, utilizando 2 cepas de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y 3 cepas de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Las cepas bacterianas a estudiar deben provenir de un cultivo fresco, preferiblemente de un cultivo en agar, de manera que podamos comprobar la pureza de la cepa (Velasco y cols., 2008).

Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas a ensayar 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 obtenidas las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano transfiriendo una o dos colonias del cultivo a un tubo que contenga solución fisiológica estéril. El crecimiento bacteriano se ajustó a la turbidez del patrón 0.5 del estándar de McFarland (Velasco y cols., 2008).

Preparación de las placas e inoculación

A cada placa se le colocó 20 mL del agar Müller-Hinton previamente preparado y esterilizado. Posteriormente se dejó solidificando a temperatura ambiente para su uso. Una vez preparadas las placas se introdujo un hisopo de algodón estéril dentro del tubo que contiene el inóculo. El exceso de líquido se eliminó haciendo rotar suavemente el hisopo contra las paredes del tubo; con el hisopo debidamente humedecido, se inoculó en tres o cuatro direcciones toda la superficie de una placa con el agar, girando sucesivamente dicha placa en ángulos de 90° (Velasco y cols., 2008).

Preparación y colocación de discos

Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro con las concentraciones de los extractos: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL y 7,8 µg/mL. Una vez que las placas fueron debidamente inoculadas, sobre su superficie se colocaron en forma equidistante los discos impregnados con las diluciones.

Preincubación e incubación

Las placas fueron preincubadas a 4°C durante 3 horas aproximadamente para permitir la difusión de los extractos, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37°C (Velasco y cols., 2007).

Lectura de las pruebas

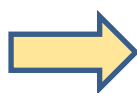
Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar cada una de las placas, en las cuales se consideró como positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco; por el contrario la ausencia de este halo se interpretó como negativo.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI de los extractos en estudio, solo para los microorganismos que mostraron sensibilidad en las diluciones preparadas.

Esquema 1. Procedimiento empleado para la investigación

1- Recolección de la planta en estudio



2- Secado y Molienda de las hojas y flores



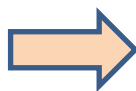
3- Preparación de la solución con los 2 solventes para su posterior maceración por 48 horas a temperatura ambiente



4- Obtención del extracto por el rotavapor



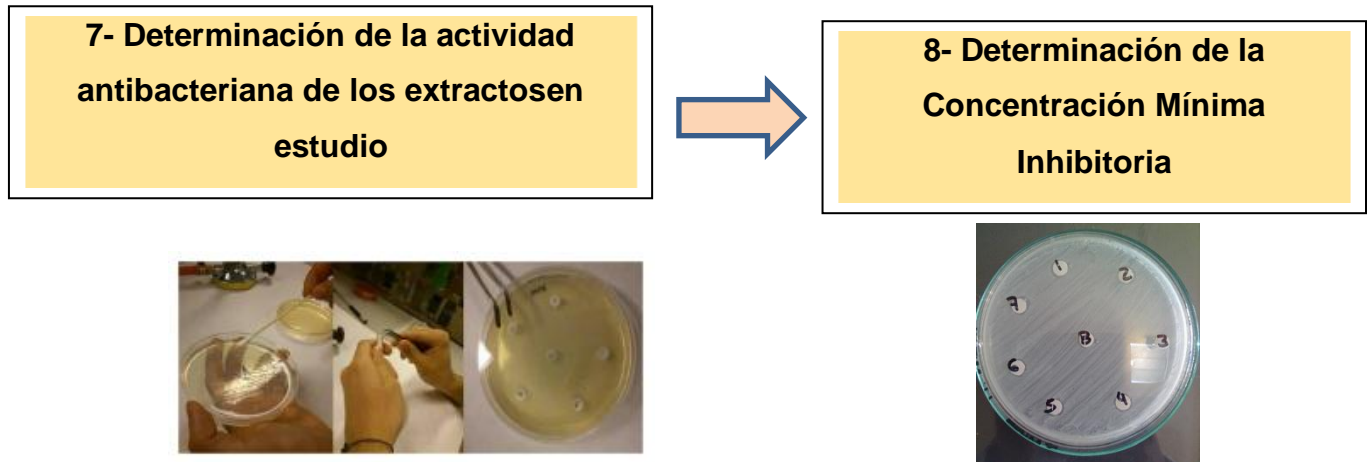
5- Realización del Estudio Fitoquímico



6- Identificación de los componentes individuales por medio de cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas



Esquema 1. Procedimiento empleado para la investigación (continuación)



Fuente: Villarreal, 2020.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Estudio Fitoquímico de las hojas de la especie *Marrubium vulgare*

Se realizaron una serie de pruebas para conocer cualitativamente los compuestos químicos presentes en las fracciones obtenidas de las hojas de *Marrubium vulgare* con solventes como hexano y etanol (Tabla 4). Siendo de diferentes formas la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color principalmente, aparición de precipitados, turbidez del medio, producción de espuma por agitación y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV).

Tabla 4. Estudio fitoquímico de las hojas de *Marrubium vulgare*

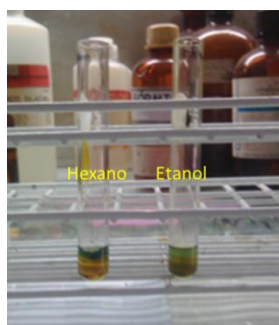
Metabolitos secundarios	Reacción	Fracciones	
		Hexanóica	Etanólica
Terpenos y/o Esteroles	Libermann-Burchard	+	+
Fenoles	FeCl ₃	ND	+
Quinonas o Antraquinonas	Reacción de Bornträger	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-
Sesquiterpenlactonas	Prueba de Baljet	-	-
Alcaloides	Dragendorff	-	+
	Wagner	-	+
	Mayer	-	+
Cumarinas	Hidróxido de amonio	-	-
Saponinas	Altura y estabilidad de espuma	-	-

(+) Presente

(-) Ausente

(ND) No determinado

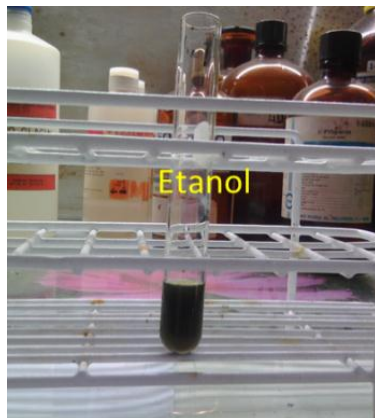
Figura 30. Identificación de Terpenos y/o Esteroles



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un color verde como resultado positivo en ambos tubos. Lo que indica la presencia de esteroides para los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

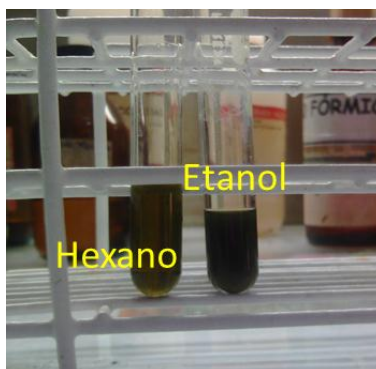
Figura 31.Identificación de Fenoles



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado positivo el tubo del extracto etanólico. Lo que indica la presencia de Fenoles para el extracto de las hojas de *Marrubium vulgare*.

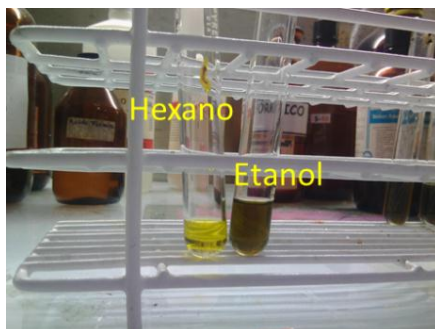
Figura 32.Identificación de Quinonas o Antraquinonas



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado negativo en ambos tubos. Lo que indica la ausencia de Quinonas o Antraquinonas para los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

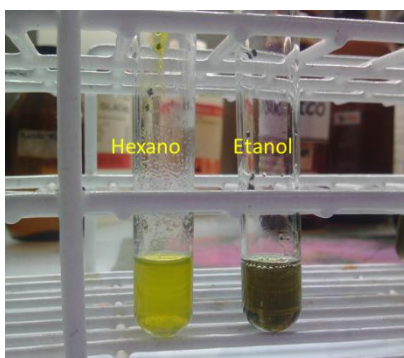
Figura 33.Identificación de Flavonoides



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado negativo para la reacción de Shinoda en ambos tubos. Lo que indica la ausencia de Flavonoides para los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

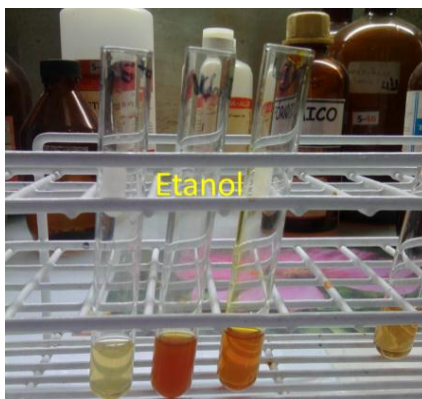
Figura 34.Identificación de Sesquiterpenlactonas



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado negativo en ambos tubos. Lo que indica la ausencia de Sesquiterpenlactonas para los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

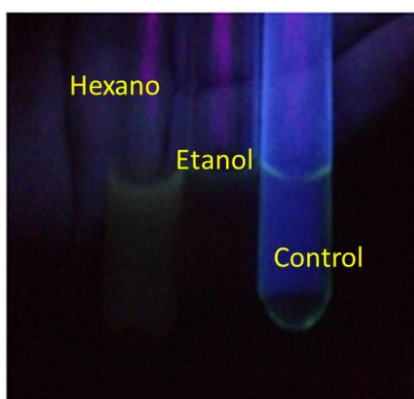
Figura 35.Identificación de Alcaloides



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado positivo para los reactivos Mayer, Wagner y Dragendoff en el extracto de etanol. Lo que indica la presencia de Alcaloides para el extracto de las hojas de *Marrubium vulgare*.

Figura 36.Identificación de Cumarinas



Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado negativo para la reacción de Hidróxido de Amonio con luz ultravioleta. Lo que indica la ausencia de Cumarinas para los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

Figura 37. Identificación de Saponinas



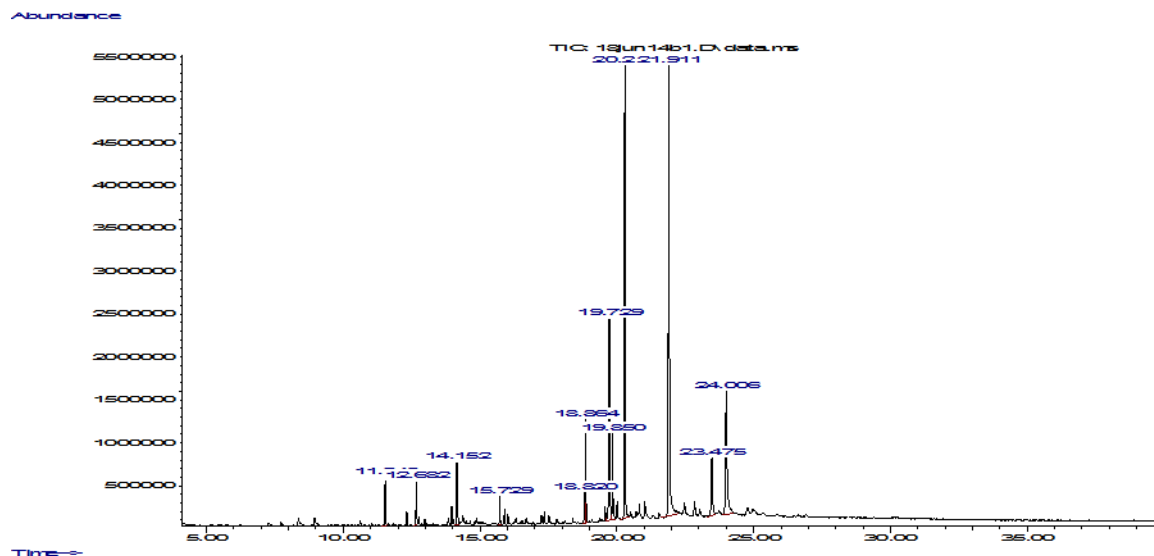
Fuente: Villarreal, 2020.

Se obtuvo un resultado negativo en ambos tubos (No hay formación de espuma). Lo que indica la ausencia de Saponinas para los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*.

Identificación de los componentes individuales del extracto de hexano de las hojas de *Marrubium vulgare* por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Luego de la recolección de la planta *Marrubium vulgare* y de la obtención de su extracto con el solvente hexano. Los resultados conseguidos por medio de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas se presentan a continuación (Figura 38):

Figura 38. Cromatograma general del extracto de hexano de *Marrubium vulgare*

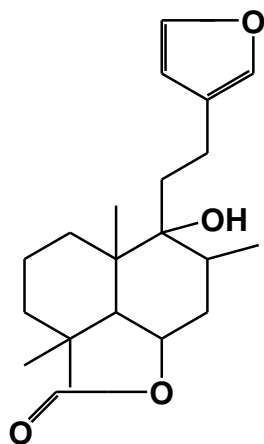


Se observa la presencia de una serie de compuestos (Tabla 5), unos más abundantes (Figura 39) que otros.

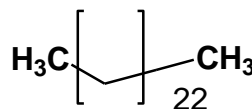
Tabla 5. Componentes identificados en el extracto de Hexano de las hojas de *Marrubium vulgare*

Número de Pico	Compuesto	Tiempo de Retención	% de Área
1	Hexahidrofarnesil acetona	11,54	2,32
2	Éster metílico del ácido hexadecanoico	12,32	0,81
3	Ácido hexadecanoico	12,68	2,18
4	Heneicosano	13,97	0,73
5	Fitol	14,15	3,58
6	Tricosano	15,73	1,06
9	Pentacosano	17,35	0,51
10	Heptacosano	18,86	4,33
11	Octacosano	19,57	0,61
12	Marrubiina	19,73	10,94
13	Escualeno	19,82	4,00
14	Tetracosano	20,29	18,66
15	Nonacosano	21,02	1,03
16	Hexatriacontano	21,91	28,11
17	Vitamina E	22,47	0,89
18	Dotriacontano	22,84	1,15
19	Lanosterol	23,47	4,56
20	Tetratetracontano	24,00	10,55

Figura 39. Estructura química de la marrubiina y tetracosano



Marrubiina



Tetracosano

**Actividad antibacteriana de las fracciones hexanóicas y etanóicas de
*Marrubium vulgare***

Los extractos crudos obtenidos de las hojas de *Marrubium vulgare* fueron sometidos a las pruebas de susceptibilidad antibacteriana leyendo el halo de inhibición, y posteriormente calculando la concentración mínima inhibitoria, mediante el método de difusión en agar (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Halos de inhibición del extracto hexanóico expresados en mm (milímetros) del ensayo difusión en agar con disco Kirby- Bauer.

Extracto Hexanóico	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
[] µg/mL	Halo de Inhibición (mm)				
1000	8	7	9	0	8
500	7	7	9	0	8
210	7	7	9	0	7
125	7	7	8	0	7
62,5	7	7	8	0	7
31,25	7	7	8	0	7
15,62	7	7	7	0	7
7,8	0	0	7	0	0
CMI (µg/mL)	15,62	15,62	ND	-	15,62

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

ND: No Determinada

Se determinó que el extracto hexanólico a diferentes concentraciones presento acción antibacteriana sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en *Enterococcus faecalis* no obtuvo ninguna reacción.

Tabla 7. Halos de inhibición del extracto etanólico expresados en mm (milímetros) del ensayo difusión en agar con disco Kirby- Bauer

Extracto Etanólico	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
[] µg/mL	Halo de Inhibición (mm)				
1000	8	8	9	0	0
500	8	8	9	0	0
210	8	8	9	0	0
125	8	8	9	0	0
62,5	8	8	9	0	0
31,25	8	8	9	0	0
15,62	7	8	9	0	0
7,8	0	8	8	0	0
CMI (µg/mL)	15,62	ND	ND	-	-

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

ND: No Determinada

Se determinó que el extracto etanólico a diferentes concentraciones presento acción antibacteriana sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que en *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* no obtuvo ninguna acción.

Discusión

Luego de la recolección del *Marrubium vulgare* y la obtención por maceración de los extractos de hexano y etanol se realizó el tamizaje o screening fitoquímico preliminar que arrojó la presencia de esteroides en las fracciones hexanólica y etanólica, mientras que solo en la fracción etanólica se determinó la presencia de compuestos fenólicos y de alcaloides.

En tal sentido, esteroides en los extractos etanólico y hexanólico fueron identificados con el reactivo de Lieberman-Burchard, por lo cual dio una coloración verde en esta prueba, asimismo en el extracto etanólico, los compuestos fenólicos se evidenciaron con una reacción de color azul a negro mediante la utilización de FeCl_3 , y por último los alcaloides con una respuesta positiva (turbidez y un precipitado) en los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer.

Como se ha podido observar en el tamizaje fitoquímico realizado al extracto etanólico la presencia de alcaloides; en esta investigación llama mucho la atención ya que los alcaloides nunca han sido reportados ni en la familia ni en el género *Marrubium*, por lo que se estima fue un falso positivo en los resultados. En cambio los compuestos fenólicos, están acorde con la quimiosistemática de la familia Lamiaceae, existiendo además estudios que resaltan que estos compuestos son bien tolerados por los animales y tienen acción antioxidante y antiséptica (Chasquibol y cols., 2003).

Al comparar este reporte (Tabla 4) con los estudios anteriores realizados por Amri y cols., (2017) reflejó ser similar con respecto a la presencia de polifenoles, y difiere en la presencia de flavonoides, naftoquinonas y alcaloides. Aunque en ambas investigaciones fueron usadas las hojas de la especie, esta diferencia en cuanto a los componentes encontrados por estos investigadores quizás se deba a que su evaluación fue preparando un extracto hidroalcohólico a través de la aplicación de una Extracción por Solvente Asistido por Microondas, y su perfil fitoquímico se

realizó mediante cromatografía de capa fina y cromatografía líquida de alto rendimiento.

Seguidamente una vez analizado el cromatograma general realizado al extracto hexanólico de *Marrubium vulgare* se puede inferir que dicha especie contiene una cantidad amplia de compuestos, los cuales le proporcionan sus propiedades. Dentro de por lo menos estos 20 compuestos detectados en la investigación se observa la presencia de algunos que por su elevado porcentaje con respecto a los demás llaman la atención, y estos son: Hexatriacontano en una cantidad de 28,11%, Tetracosano con una cantidad de 18,66%, Marrubiina con una cantidad de 10,94% y Tetratetracontano con una cantidad de 10,55%.

Los componentes en mayor proporción fueron alcanos superiores de cadena recta (Hexatriacontano y Tetratetracontano), hidrocarbonados del tipo cera de parafina (Tetracosano), y una lactona diterpénica responsable de la acción fluidificante de las secreciones mucosas y expectorantes (Marrubiina).

Aunque Amri y cols., (2017) utilizaron un método diferente como lo es la resonancia magnética nuclear cuantitativa para medir la cantidad de marrubina, estos investigadores confirman la presencia de esta sustancia en *Marrubium vulgare*.

De los procesos de determinación de la actividad antibacteriana de los extractos en estudio y determinación de la CMI se puede deducir que el extracto hexanólico presentó sensibilidad *contra Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, mostrando halos de inhibición desde 7 a 9 mm de diámetro con una Concentración Mínima Inhibitoria que oscila entre valores menores a 7,8 µg/mL y 15,62 µg/mL; *Staphylococcus aureus* con 15,62 µg/mL, *Escherichia coli* con 15,62 µg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* con 15,62 µg/mL que fueron más resistentes en comparación con *Klebsiella pneumoniae* que fue la más

sensibles con un valor de CMI no determinado específicamente, encontrándose por debajo de 7,8 µg/mL.

El extracto etanólico presento sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, mostrando también halos de inhibición desde 7 a 9 mm de diámetro con una Concentración Mínima Inhibitoria que oscila entre <7,8 µg/mL y 15,62 µg/mL; *Escherichia coli* con 15,62 µg/mL siendo la más resistente en este caso, y *Staphylococcus aureus* con un valor no determinado (<7,8 µg/mL) al igual que *Klebsiella pneumoniae* siendo estas bacterias las más sensibles en este extracto.

En relación a estos resultados obtenidos Tlili y cols., (2019) ratifican la capacidad antibacteriana de *Marrubium vulgare* contra algunas bacterias Gram positivas, en este caso *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, y aunque difieren en los efectos con bacterias Gram negativas tomando como referencia *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ya que son las comunes entre las dos investigaciones, puede deberse a la diferencia de técnicas y de la naturaleza de los extractos hexanólico, etanólico y acetónico; como también posiblemente esta diferencia sea la responsable de las discrepancias al hacer contraste con el estudio de Limaymanta,(2018), donde también concordamos y reafirmamos una vez más que los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare*, ubicando la relación en el extracto etanólico presentan una importante actividad antibacteriana en presencia de cepas ATCC de bacterias importantes y con diferentes concentraciones de los mismos.

Es evidente que si esta planta a través de sus extractos posee propiedades antibacterianas podría aplicarse como tratamiento antibacteriano por lo menos en las cepas estudiadas y semejantes, siempre teniendo en cuenta las diferentes necesidades del paciente, y así proporcionar más conocimientos importantes a la salud pública.

Es necesario resaltar que las condiciones climáticas y geográficas donde sea recolectada la planta puede influir en su composición química o

en su composición botánica y por ello los resultados obtenidos al momento de realizar las pruebas pueden variar unas de otras.

Por otra parte aunque en esta investigación se profundizó el estudio en relación a la actividad antibacteriana de *Marrubium vulgare* durante su realización se confirmó la presencia compuestos relacionados con propiedades antioxidantes, antisépticas, y fluidificantes que también han sido evaluadas en los estudios realizados por otros autores previamente y que están reflejados en este trabajo.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se determinó de manera cualitativa que de los extractos de hexano y etanol obtenidos por maceración y utilizados en el estudio de la planta *Marrubium vulgare*, el etanol presentó mayor rendimiento en el análisis fitoquímico realizado, encontrando en él componentes químicos como: compuestos fenólicos, alcaloides y esteroides; mientras que en el extracto hexanólico solo esteroides.
- El extracto de hexano de las hojas de *Marrubium vulgare* utilizado para el estudio con cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas arrojó la presencia de por lo menos 20 compuestos donde los de mayor proporción son Hexatriacontano en una cantidad de 28,11%, Tetratetracontano con una cantidad de 10, 55%, Tetracosano con una cantidad de 18, 66%, y Marrubiina con una cantidad de 10, 94%.
- En la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos hexanólico y etanólico de la especie *Marrubium vulgare*, que realizada por el método de Kirby-Bauer frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional, la fracción hexanólica fue activa frente a las cepas bacterianas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que la fracción etanólica

presentó halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* solamente.

- Según los resultados obtenidos en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), se puede establecer que los extractos de las hojas de *Marrubium vulgare* poseen una importante actividad antibacteriana, predominando su capacidad en las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* ya que necesita menores concentraciones de los extractos para generar inhibición, seguido de la cepa ATCC de *Escherichia coli* que presenta mayor resistencia a los extractos ya que requiere de concentraciones más altas.

Recomendaciones

- Evaluar la posibilidad de utilizar otros solventes y otras técnicas de extracción para estudiar posibles compuestos que se manifiesten en ellos.
- Utilizar otras técnicas o procedimientos fitoquímicos y/o cromatográficos cualitativos y cuantitativos para aislar, identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Marrubium vulgare*.
- Continuar la investigación de esta especie en cuanto a sus propiedades antifúngicas, ya que está poco documentada y puede ser muy útil en cuanto a terapias de esta índole.
- Impulsar posible uso frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

BIBLIOHEMEROGRAFÍAS

- Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by Chromatography/Mass Spectrometry*. 4 Edición. Illinois, Estados Unidos; Allured Publishing Corporation.
- Agencia Europea del Medicamento (EMA). (2013). *Community herbal monograph on Marrubium vulgare L.*, herba. [Documento en línea]. Disponible:
<https://www.fitoterapia.net/archivos/201611/wc500147018.pdf?1>
- Alippi, A., Reynaldi, F. y López, A. (2013). Evaluación del método epsilométrico E-test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*. *Revista Argentina de Microbiología*, 45 (4): 257-261.
- Amri, B., Martino, E., Vitulo, F., Corana, F., Kaâb, L., Rui, M., Rossi, D., Mori, M., Rossi, S. y Collina, S. (2017). *Marrubium vulgare L. Leave Extract: Phytochemical Composition, Antioxidant and Wound Healing Properties*. *Molecules* (Basel, Switzerland) [Revista en línea], 22(11), 1851. Disponible: <https://doi.org/10.3390/molecules22111851>.
- Anon, (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 1 (9): 1.
- Azcón, J. y Talón, M. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Editorial McGraw Hill S.A. Interamericana, pp. 851.
- Balch, J. y Balch, P. (2000). *Recetas nutritivas que curan*. (2ªEd.). EE.UU: Avery.
- Brack, A. (1999) *Diccionario Enciclopedia de Plantas Medicinales Útiles del Perú*. Cuzco, Perú: Editorial Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas- PNUD.
- Bruneton J. (1991). *Elementos de la Fitoquímica y Farmacognosia*. Zaragoza, España: Acribia.

- Bruneton J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. 2ª edición. Zaragoza, España: Acribia.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N. y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá. *Revista Colombia Forestal*, 12. 161-170.
- Carretero, M. y Ortega, T. (2018). Otras plantas medicinales para afecciones respiratorias (I). *Panorama Actual Med*, 42(411). Disponible: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2018/5/9/122595.pdf>.
- Cocho, D. (2007). *Desarrollo de un método por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos*. Universidad de Santiago de Compostela, pp. 27-28.
- Csáky, A. y Martínez, G. (1998). *Técnicas experimentales en síntesis orgánica*, Madrid: Ed. Síntesis.
- De la Fuente, N., Villarreal, J., Díaz, M. y García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* [Revista en línea], 46(2), 7-16. Disponible: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007.
- De La Rosa, M., Prieto, J. y Navarro J. (2011). *Microbiología en ciencias de la salud*. España: Elsevier.
- De las Casas, B. (1995). *Salud para todos "plantas medicinales y salud indígena"*. Perú: Centro de estudios regionales andinos.
- Departamento del Meta. (2015). Guía. *Manejo de Cepas Microbiológicas*, pp. 1-7.
- Fariña, N. (2016). Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* [Revista en línea], 14(1), 04-05. Disponible: [https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)04-005](https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)04-005).

- Fernández, F., López, J., Ponce, L. y Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32 (1): 41.
- Fernández, J. y Rivera, O. (2006). *Libro Rojo de Plantas de Colombia*. Bogotá, Colombia: Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, pp. 385-582.
- Flores, V., Castañeda, O., Montiel, T. y Hernández, G. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Ciencia*, 22(63).
- Forbes, B., Sahn, D. y Weissfeld, A. (2009). *Diagnostico microbiológico*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, pp. 1160.
- Girón, W. (2008). Antimicrobianos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, 5 (2), 70-77.
- González, N. y Saltigeral, P. (1992). *Guía de antimicrobianos, antiparasitarios, antivirales y antimicóticos*. 3ra. Edición. México: Mc Grawhill Interamericana.
- Gutiérrez, A. y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2), 409-419.
- Harley, R., Atkins, A., Budantsev, P., Cantino, B., Conn, R., Grayer, M., Harley, R., De Kok, T., Krestovskaja, R., Morales, A., Paton, O. y Ryding, T. (2004). *The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)*. Berlin: Springer, pp. 167-275.
- Harris, C. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. Barcelona: Reverte.
- Heisler, E., Budó, M., Schimith, M., Badke, M., Ceolin, S. y Heck, R. (2015). Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. *Enfermería*

- Global* [Revista en línea],14(39), 390-403. Disponible: <http://scielo.isciii.es/pdf/eg/v14n39/revision5.pdf>.
- Hertz, E. (1996). *Cultivo de plantas medicinales (parcelas demostrativas)*. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/26590464/Proyecto-Plantas-medicinales>.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W. y Tamariz, J. (2005). Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de Ciprofloxacina en Bacterias Uropatógenas Aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Médica Herediana* [Revista en línea], 16(1), 39-45. Disponible: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007.
- Instituto Nacional de Nutrición. (2008). *Fitoquímicos*. División de Nutrición en Salud Pública. Caracas, Venezuela [Documento en línea]. Disponible: <https://www.inn.gob.ve/pdf/docinves/fitoquimicores.pdf>. [Consulta: 2019, Mayo 24].
- Knishinsky, R. (2000). *Alternativas para el Prozac: Remedios naturales para la depresión*. Mexico: Lasser press Mexicana, S.A. de C.V.
- Koneman, E. y Allen, S. (2018). *Diagnostico Microbiológico*. Texto Y Atlas En Color. Argentina: Editorial Médica Panamericana, pp. 25.
- Krivoy, S. (2008). La problemática de la salud en Venezuela. *Gaceta Médica de Caracas* [Revista en línea], 116(2), 91-92. Disponible: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622008000200001&lng=es&nrm=iso [Consulta: 2019, Marzo 20].
- Limaymanta, J. (2018). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de un gel preparado con extracto etanólico de Marrubium vulgare L* (Tesis de Pregrado). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Lock, D. (1988). *"Investigación Fitoquímica" Métodos En El Estudio De Productos Naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú.

- Lock, O., Cabello, I. y Doroteo, V. (2006). *Análisis de Flavonoides en Plantas. Analysis Of Flavonoids In Plants*. Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. y Portoles, A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. España: Editorial Medica panamericana, pp. 792.
- Mandell, G. (2012). *Introducción a las Enfermedades Microbianas*. (19ª Ed.). México: Tratado de Medicina Interna.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2004). *Biología de los Microorganismos*. Madrid, España: Pearson Educación, S.A., p. 11.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela; Editorial Torino.
- Marín, M. y Gudiol, F. (2003). Antibióticos β -lactámicos. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (1): 42-55.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, M., Mesa, M. y Galeano, E. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica*. Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia.
- Martínez, C. y Rojas, G. (2019). Jardín de plantas medicinales de la especialidad de agronomía en el IPA “Manifiesto de Montecristi”. *Revista Caribeña de Ciencias Sociales* [Revista en línea]. Disponible:<https://www.eumed.net/rev/caribe/2019/10/plantas-medicinales-agronomia.html>
- Martínez, M., Fragoso, I., Garcia, M. y Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* [Revista en línea], 84(1), 30-86. Disponible: <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.30158>.
- Méndez, R. (2008). *Cultivos orgánicos (su control biológico en plantas medicinales y aromáticas)*. (2ªEd.). Bogotá, Colombia: Ediciones ECOE.

- Mensa, J., Garcia, E. y Vila, J. (2003). Macrólidos, cetolidos y estreptograminas. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (4): 200-208.
- Ministerio de la Protección Social de la Republica de Colombia. (2008). *Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales*. Bogotá: Imprenta Nacional de Colombia, pp. 192-193.
- Miño, G. (2007). *Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género Baccharis*. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Quito, Ecuador.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. y Ochoa, T. (2011). Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a Diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* [Revista en línea],28(4), 648-56. Disponible: https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpmesp/v28n4/a13v28n4.pdf
- Mostacero, J., Mejía, F. y Gamarra, O. (2002). *Taxonomía de las Fanerógamas útiles en el Perú*. Trujillo, Perú.
- Murray, M., Rosenthal, S. y Pfaller, A. (2009). *Microbiología Médica*. 6ta. Edición. Editorial El Sevier.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2002). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Resistencia a los antibióticos* [Documento en línea]. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>. [Consulta: 2018, Abril 24].

- Orsini, G. y Velazquez, D. (1996). Tipos del Herbario Nacional de Venezuela (VEN). II Labiadas (Lamiaceae). *Acta Botánica Venezolánica* [Revista en línea], 19 (2), 67-78. Disponible: <https://www.jstor.org/stable/41740541>.
- Pelczar, J. y Reid, R. (1992). *Microbiología*. La Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación.
- Peña, D. (2011). *Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de Siparuna sessiliflora* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.
- Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Review* [Revista en línea], 6, 1-5. Disponible: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2012/6/11/1/95849>.
- Pigrau, C. (2003). Oxazolidinonas y glucopeptidos. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (3): 157-165.
- Ponz, E. (2005). *La medicina tradicional de los Toscana y Machineri*. La Paz, Bolivia: Investigaciones regionales Pando.
- Prats, G. (2007). *Microbiología Clínica*. Madrid: Medica Panamericana.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M. y Mosqueda, N. (2010). *Manual práctico de bacteriología general*. Mérida, Venezuela: Colección Textos Universitarios de la Universidad de Los Andes.
- Reyes, F., Palou, E. y López, A. (2014). *Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales*. Puebla, México: Temas Selectos.
- Rivas, M., Oranday, C. y Verde, S. (2016). *Investigación en Plantas de Importancia Clínica*. Nuevo León, México: Omnia Science.
- Roger, J. (2006). *Salud por las plantas medicinales*. Madrid, España: Safeliz, S.L.
- Romo, A. (2006). *Química de la flora mexicana. Investigaciones en el instituto de química UNAM*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp.143.

- Ruiz, M. y Susunaga, C. (2000). *Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies Bursera simaoruba y Bursera graveolens, frente a microorganismos: Agrobacterium tumefaciens, Erwinia carotovora, Fusarium oxysporum, Trichoderma viride y Botrytis cinérea*. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.
- Salisbury, F. y Ross, C. (1992). *Fisiología Vegetal*. México. D. F, México: Grupo Editorial Iberoamericano.
- Santamaría, C., González, A. y Astorga, F. (2015). *Extractos vegetales: uso en la reducción del estrés*. Madrid: European Natural Additives, S.L., pp.75- 80.
- Savolainen, V., Chase, M., Hoot, S., Morton, C., Soltis, D., Bayer, C., Fay, M., de Bruijn, A., Sullivan, S. y Qiu, Y. (2000). Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid atpB and rbcL gene sequences. *Systematic Biology* [Revista en línea], 49 (2), 306-362. Disponible: <https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.306>.
- Sepúlveda, G., Porta, H. y Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* [Revista en línea], 21(3), 355-363. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61221317>.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* [Revista en línea], 16(3), 402-419. Disponible: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011&lng=es&nrm=iso [Consulta: 2019, Marzo 20].
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A. y Suarez, D. (2018). *Productos Naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia.
- Skoog, D., West, D. y Holler, F. (2003). *Fundamentos de Química Analítica*. 7ª edición. España: Reverté.

- Soltis, D., Soltis, P., Chase, M., Mort, M., Albach, D., Zanis, M., Savolainen, V., Hahn, W., Hoot, F., Fay, M., Axtell, M., Swensen, S., Prince, L., Kress, W., Nixon, K. y Farris, J. (2000). Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* [Revista en línea], 133(4), 381-461. Disponible: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2000.tb01588>
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*. Sunderland. United States: Editorial Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Takhtajan, A. (2009). *Flowering Plants*. Russia: Springer.
- Técnicas de Control Metrológico. (2014). *Cepas de Referencia y Control de Medios*. Disponible: <https://www.tcmetrologia.com/blog/cepas-de-referencia/>.
- Tlili, H., Marino, A., Ginestra, G., Cacciola, F., Mondello, L., Miceli, N., Taviano, M., Najjaa, H. y Nostro, A. (2019) .Polyphenolic profile, antibacterial activity and brine shrimp toxicity of leaf extracts from six Tunisian spontaneous species. *Natural Product Research* [Revista en línea], 1-7. Disponible: <https://www.doi.org/10.1080/14786419.2019.1616725>
- Universidad Central de Venezuela (UCV). (2017). *La Microbiología y su objetivo* [Documento en línea]. Disponible: <http://www.ucv.ve/organizacion/facultades/facultad-de-farmacia/programas-academicos/pregrado/catedras/catedra-de-microbiologia/material-de-apoyo/temas-de-microbiologia.html>. [Consulta: 2019, Mayo 24].
- Universidad Interamericana para el Desarrollo. (2016). *Tamizaje Fotoquímico*. Lima, pp. 1-16.
- Velazco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K. y Velazco, E. (2008). *Manual práctico de bacteriología clínica*. Venezuela: Universidad de Los Andes. Vicerrectorado Académico, CODEPRE.

Vibrans, H. (ed.), (2009). *Malezas de México*. Disponible:
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/marrubium-vulgare/fichas/ficha.htm> [Consulta: 2019, Mayo 26].

www.bdigital.ula.ve