



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Baccharis prunifolia*  
EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

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

Trabajo presentado como requisito para optar por el título de Licenciados en  
Bioanálisis

**Autores:**

-Peña Ruth  
-Sayago Isabel

**Tutor:**

-Dr. Buitrago Alexis

**Cotutor:**

-PhD. Rojas Janne

**Mérida, Febrero 2020**



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Baccharis prunifolia*  
EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

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

**Autores:**

- Peña Ruth
- Sayago Isabel

**Tutor:**

- Dr. Buitrago Alexis

**Cotutor:**

- PhD. Rojas Janne

**Mérida, Febrero 2020**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   | Pàg.     |
|---|----------|
| ÌNDICE DE CONTENIDO   | iv       |
| ÌNDICE DE TABLAS  | vii      |
| ÌNDICE DE FIGURAS   | viii     |
| GLOSARIO  | ix       |
| DEDICATORIA   | x        |
| AGRADECIMIENTO  | xi       |
| RESUMEN   | xii      |
| INTRODUCCIÓN  | 1        |
| <b>CAPÍTULO I. EL PROBLEMA</b>                              | <b>3</b> |
| Planteamiento del problema                                  | 3        |
| Justificación de la Investigación                           | 4        |
| Hipótesis   | 5        |
| Objetivos de la Investigación                               | 5        |
| Objetivo general  | 5        |
| Objetivos específicos                                       | 5        |
| Alcances de la Investigación                                | 5        |
| Limitaciones de la Investigación                            | 6        |
| <b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>                           | <b>6</b> |
| Trabajos previos  | 6        |
| Antecedentes Históricos                                     | 9        |
| Bases Teóricas  | 10       |
| <i>Familia Asteraceae</i>                                   | 10       |
| <i>Género Baccharis</i>                                     | 11       |
| <i>Fitoquímica del género Baccharis</i>                     | 12       |
| <i>Flavonoides</i>  | 13       |
| <i>Terpenoides</i>  | 13       |
| <i>Diterpenos</i>   | 14       |
| <i>Cumarinas</i>  | 15       |
| <i>Usos tradicionales del género Baccharis</i>              | 15       |
| <i>Baccharis prunifolia</i>                                 | 16       |
| <i>Clasificación taxonómica de la especie B. prunifolia</i> | 16       |
| <i>Productos Naturales</i>                                  | 17       |
| <i>Extractos</i>  | 17       |
| <i>Extractos fluidos</i>                                    | 17       |
| <i>Extractos secos</i>                                      | 18       |
| <i>Extractos blandos</i>                                    | 18       |
| <i>Crioextractos</i>  | 18       |
| <i>Actividad antibacteriana</i>                             | 18       |
| <i>Bacterias</i>  | 19       |
| <i>Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas</i>            | 20       |
| <i>Tinción de Gram</i>                                      | 21       |

|  |    |
|--|----|
| <i>Resistencia bacteriana</i>                                    | 21 |
| <i>Tipos de resistencia</i>                                      | 22 |
| <i>Natural o intrínseco</i>                                      | 22 |
| <i>Adquirido</i>   | 22 |
| <i>Mecanismos de resistencia</i>                                 | 23 |
| <i>Métodos de extracción</i>                                     | 24 |
| <i>Tipos de extracción</i>                                       | 24 |
| <i>Extracción soxhlet</i>  | 24 |
| <i>Digestión</i>   | 24 |
| <i>Infusión y decocción</i>                                      | 24 |
| <i>Selección del solvente</i>                                    | 24 |
| <i>Maceración</i>  | 25 |
| <i>Percolación</i>   | 25 |
| <i>Métodos para determinar la susceptibilidad antibacteriana</i> | 26 |
| <i>Método de dilución en caldo o en agar (CIM)</i>               | 26 |
| <i>Método de difusión en agar con discos</i>                     | 26 |
| <i>Método de la cinta o Epsilométrico (E test)</i>               | 26 |
| Sistema de hipótesis   | 27 |
| Operacionalización de los eventos                                | 28 |
| <b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>                          | 28 |
| Tipo de investigación  | 28 |
| Diseño de la investigación                                       | 28 |
| Población y muestra  | 28 |
| Unidad de investigación  | 29 |
| Selección y tamaño de la muestra                                 | 29 |
| Materiales y Métodos   | 30 |
| Recolección de la especie botánica                               | 30 |
| Determinación taxonómica de la planta                            | 30 |
| Selección, división y preparación del material vegetal           | 30 |
| Secado, molienda y pesado del material vegetal                   | 30 |
| Extracción por maceración del material vegetal                   | 31 |
| Tamizaje fitoquímicos  | 31 |
| Actividad antibacteriana   | 31 |
| Preparación del medio cultivo                                    | 35 |
| Preparación de discos  | 35 |
| Reactivación de las bacterias                                    | 35 |
| Preparación de los inóculos                                      | 35 |
| Siembra  | 35 |
| Pre-incubación e incubación                                      | 36 |
| Lectura de los ensayos   | 36 |
| Determinación de la concentración inhibitoria mínima             | 36 |
| Evaluación de los resultados                                     | 36 |
| Diseño de análisis   | 36 |
| <b>CAPÍTULO IV</b>   | 37 |
| Resultados y Discusiones   | 37 |

|   |           |
|---|-----------|
| Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios del Extracto Metanólico de <i>Baccharis prunifolia</i> | 37        |
| Determinación de la Actividad Antibacteriana del Extracto Metanólico de <i>Baccharis prunifolia</i>             | 40        |
| <b>CAPÍTULO V</b>   | <b>42</b> |
| Conclusiones  | 42        |
| Recomendaciones   | 43        |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS</b>   | <b>44</b> |

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

## ÍNDICE DE TABLAS

|  | Pàg       |
|--|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Operacionalización de los eventos  | <b>28</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Procedimientos para el tamizaje fitoquímico del extracto <i>Baccharis prunifolia</i> | <b>32</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Tamizaje fitoquímico del extracto de <i>B. prunifolia</i>                            | <b>39</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Actividad antibacteriana del extracto de <i>B. prunifolia</i>                        | <b>40</b> |

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

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1.</b> -Partes de una planta de la familia Asteraceae      | 11   |
| <b>Figura 2.</b> -Flavonoides aislados en el género <i>Baccharis</i> | 13   |
| <b>Figura 3.</b> -Estructura del ácido oleanólico                    | 14   |
| <b>Figura 4.</b> -Estructura de un diterpeno                         | 15   |
| <b>Figura 5.</b> -Estructura de cumarina                             | 15   |
| <b>Figura 6.</b> - <i>Baccharis prunifolia</i>                       | 16   |
| <b>Figura 7.</b> -Bacterias grampositivas y gramnegativas            | 21   |
| <b>Figura 8.</b> -Mecanismos de resistencia de las bacterias         | 23   |

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

## GLOSARIO

- **CIM**: concentración mínima inhibitoria
- **Mse**: metabolitos secundarios
- **ATB**: Antibiótico

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

## DEDICATORIA

- ✓ A Dios todo poderoso, por ser la luz que ilumina nuestro camino y permitirnos alcanzar y llegar con éxito a todo lo propuesto, sin el nada sería posible.
- ✓ A nuestros padres fuente de inspiración y pilares fundamentales, para la culminación de nuestras metas y logros.
- ✓ A nuestros más grandes amigos, que compartieron nuestras vivencias y estuvieron allí, en aquellos momentos de poco triunfo y grandes victorias.

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

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A Dios todo poderoso por brindarnos la dicha de culminar nuestra carrera con grandes bendiciones.
- ✓ A nuestro tutor Dr. Alexis Buitrago por abrirnos las puertas en su grupo de investigación y contribuir con nuestra formación profesional. Que dios te colme de muchas bendiciones como lo ha hecho hasta ahora.
- ✓ A nuestra cotutora la *PhD.* Janne Rojas por su constante dedicación y empeño en todo momento. Gracias por brindarnos sus conocimientos.
- ✓ A la Dra Judith Velazco, por brindarnos su valioso apoyo y asesoría, mil gracias.
- ✓ A la ilustre Universidad de Los Andes nuestra casa de estudio, por habernos permitido adquirir el aprendizaje académico, siempre estará en nuestros corazones.
- ✓ A todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron en la elaboración de nuestro trabajo de grado.

## RESUMEN

En el presente estudio se describe la extracción, análisis y determinación de la actividad antibacteriana del extracto *B. prunifolia*. Estudios fitoquímicos y farmacológicos han revelado que este género presenta actividad antibacteriana y antifúngica. Esta especie fue recolectada en el sector collado del cóndor, a 20 Km de la población de Piñango, Municipio Miranda, Estado Mérida. Para posteriormente ser llevada a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. La obtención del extracto se realizó mediante la técnica de maceración en frío y con la muestra resultante se realizó un tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de algunos compuestos del tipo alcaloide, cumarinas, fenólico, flavonoide, glicósidos, entre otros. De igual manera, se determinó la actividad antibacteriana frente a cinco cepas de referencia internacional: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Cuatro cepas presentaron resistencia y solo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); por el contrario arrojó sensibilidad frente a el extracto. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto *B. prunifolia* de forma combinada ejercen un efecto sinérgico potenciando así la actividad inhibitoria en los microorganismo ensayados. Se podría pensar que el mecanismo de acción de estos compuestos presentes en el extracto se deba a la degeneración de las proteínas provocando daño a la membrana celular de las bacterias.

**Palabras Claves:** actividad antibacteriana, flavonoides, alcaloides, tamizaje fitoquímico

## INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad hasta nuestros días se sigue utilizando la medicina tradicional, con la finalidad de suplir las necesidades médicas y de salud con una cifra no menor al 80 % según la organización mundial para la salud. Este hecho es muy claro sobre todo en países en vía de desarrollo y, Venezuela no es una excepción (Chaudhury, 1992).

Venezuela cuenta con centenares de plantas medicinales, aquellas que los pueblos aborígenes utilizan con fines médicos. Durante siglos las plantas han sido empleadas de forma empírica y en la actualidad han llamado la atención de los investigadores a fin de descubrir los posibles principios activos que justifiquen los usos terapéuticos (Escaleras y Naranjo, 1995).

Por su parte, las plantas de la familia Asteraceae hacen referencia no sólo por su gran diversidad botánica, abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por sus diversidad de usos medicinales; es así que muchas de estas especies han sido utilizadas para el tratamiento de ciertas dolencias como expectorantes, energizantes, analgésico, diurético, antihelmíntico, antiinflamatorio, como agentes estomacales y antibacteriano (Bessa, Bermejo y Martínez, 2007).

El género *Baccharis* es uno de los más importantes de la tribu Astereae (familia Asteraceae), es exclusiva de América (Gianello y Giordano, 1984). En algunos países ciertas especies de *Baccharis* (*B.trimera*, *B.articulata*, y *B.crispa*) son usadas en la medicina popular, en forma de infusiones para el tratamiento de reumatismo, desordenes hepato biliares, diabetes, así como en el tratamiento de ulceración y heridas en la piel. (Gene, Cartaña, Adzet, Marin, Parella y Cañigueral, 1996).

Así mismo, se ha demostrado en muchas investigaciones sobre los extractos de estas plantas que son utilizados como propósitos medicinales; la intención de estos estudios ha sido diferente en el sentido de buscar

compuestos que inhiban el crecimiento microbiano, en alimentos, aguas residuales, además, de su utilidad para la elaboración de diversos antibióticos. (Delaquis, Stanich, Girard y Mazza, 2002).

Tomando en cuenta los antecedentes mencionados y que las especies taxonómicamente cercanas podrían compartir actividades biológicas en común, la presente investigación evalúa la actividad antibacteriana de la especie *Baccharis prunifolia* perteneciente a la familia Asteraceae.

El objetivo general de esta investigación es evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *Baccharis prunifolia* en cepas de referencia internacional. La misma se realizará en el laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Prof<sup>a</sup> Luisa Vizcaya”, del departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en el Estado Mérida desde noviembre de 2017 a diciembre de 2019.

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

# CAPÍTULO I

## EL PROBLEMA

### Planteamiento del Problema

Las plantas medicinales constituyen un recurso invaluable por su potencialidad farmacológica que hace necesario estudiarlas ante la demanda de nuevos fármacos. En la actualidad, existe un gran interés por la utilización de las plantas, las cuales, presentan una gran variedad de compuestos activos. La familia Asteraceae representada por cinco géneros, presenta un gran número de especies utilizadas con fines medicinales (Gyllenhaal y Soejarto, 1997).

Por otra parte, es conocida la actividad antimicrobiana, antifúngica, antiséptica y antioxidante de algunos extractos, de ahí las posibles aplicaciones industriales de estas sustancias, muchos de los compuestos presentes en los extractos obtenidos de diferentes plantas, tales como: alcaloides, terpenoides, cumarinas, flavonoides, ligano, glucósido, entre otros, actúan contra ciertas bacterias patógenas. El estudio farmacológico para los extractos se fundamenta en sus propiedades antioxidantes, antiinflamatoria, y antibacteriana; las cuales se encuentran agrupadas en diversas pruebas biodirigidas (Baratta, 1998).

A las especies que contienen flavonoides como es el caso de la familia Asteraceae se les atribuye varias propiedades farmacológicas, y es por esto su uso en la medicina por la vinculación entre la presencia y actividad biológica de estos compuestos y otros compuestos fenólicos (Abad y Bermejo, 2008).

La capacidad antibacteriana del reino vegetal ha sido motivo de esta investigación, en el caso particular se evaluará el género *Baccharis*. La misma se describe como una planta perenne y arbustiva, que presenta unos 400 taxones registrados y aceptados dentro de las 1.300 descritas originarias de América.

Para la presente investigación se preparó el extracto con las partes aéreas de la especie *Baccharis prunifolia* se le determinó la actividad antibacteriana frente a los microorganismos grampositivos *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* así como, las gramnegativas *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; utilizando el método de difusión en agar con discos de papel. Se determinó la concentración inhibitoria mínima crítica, expresada en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  que representa una medida de la susceptibilidad del microorganismo.

Una vez descrita la situación del problema de estudio, los autores proponen el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la actividad antibacteriana del extracto de *Baccharis prunifolia* en cepas de referencia internacional grampositivas y gramnegativas, que se estudiará en el Laboratorio C de Productos Naturales “Dr. Antonio Morales Méndez” ubicado en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en el estado Mérida, entre noviembre de 2017 a diciembre de 2019?

### **Justificación de la Investigación**

Es necesario realizar la investigación sobre la actividad antibacteriana en la especie *Baccharis prunifolia* para el posible tratamiento de algunas enfermedades infecciosas; considerando su menor efecto secundario que ya ha sido demostrado para este género. En ese sentido, se evaluará si los componentes químicos presentes en el extracto metanólico de la especie *B. prunifolia* (Asteraceae) presentaran un efecto antibacteriano.

Los autores seleccionaron este tema de investigación, considerando que la especie *B. prunifolia* (Asteraceae) son conocidas por poseer propiedades antibacterianas, las cuales han proporcionado múltiples avances en la medicina tradicional alopática.

## **Hipótesis**

Tomando en cuenta los antecedentes bibliográficos, las plantas del género *Baccharis* presentan diversas actividades biológicas, se espera observar en el extracto metanólico de la especie *B. prunifolia* alguna actividad antibacteriana.

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo General**

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Baccharis prunifolia* en cepas de referencia internacional.

### **Objetivos Específicos**

1. Obtener el extracto metanólico de las partes aéreas de la especie *Baccharis prunifolia*, mediante la técnica de maceración.
2. Determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *B. prunifolia* a través de un tamizaje fitoquímico.
3. Evaluar la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional en el extracto metanólico de *B. prunifolia* por el método de difusión en agar con discos de papel.
- 4.

### **Alcances de la Investigación**

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. De igual manera establece, la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcances

descriptivo, exploratorio y correlacionados (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

La profundidad que se alcanzó en esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana en el extracto metanólico de la especie *Baccharis prunifolia*. El criterio de estudio fue representado por la técnica de maceración para obtener el extracto, un estudio fitoquímico y la determinación de la actividad antibacteriana

### **Limitaciones de la Investigación**

Para el desarrollo de esta investigación se presentaron diversas limitaciones tales como: recolección de la especie vegetal, adquisición de materiales y reactivos, rendimiento del extracto, dificultad para el acceso de las base de datos especializadas los mismos, afectan el establecimiento del evento de estudio y la unidad de estudio.

www.bdigital.ula.ve

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **Trabajos Previos**

Suárez (2012). Publicó un estudio titulado: ***Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de Baccharis latifolia (Asteraceae) de la provincia de Loja, en donde determinaron la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de Baccharis latifolia.*** El aceite esencial constituido principalmente de monoterpenos y sesquiterpenos, presentó un total de 28 compuestos. La actividad biológica la realizaron mediante el método de microdilución en caldo. El aceite esencial de *B. latifolia* inhibió el crecimiento de *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), sin embargo, no presentó actividad contra las bacterias gram-negativas

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Typhimurium* (LT2) y las bacterias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Este trabajo guarda relación con el proyecto de investigación al determinar la actividad antibacteriana del género *Baccharis*, pero difiere en los métodos utilizados.

Parreira, Lizandra, Magalhães, Morais, Caixeta y col. (2010) publicaron un trabajo titulado: **Actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), popularmente conocido como 'alecrim do campo'**. Es una planta nativa de Brasil utilizada en la medicina popular como febrífugo, antiinflamatorio, antiséptico y antiulceroso. Además, esta planta es la fuente vegetal más importante en propóleo verde de Brasil, que es reconocido por sus actividades antisépticas y antiprotozoarias. Este estudio tuvo como objetivo investigar la actividad antiparasitaria y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *B. dracunculifolia*. El aceite esencial se obtuvo por Hidrodestilación y analizado por GC y GC/MS, permitió la identificación de 14 compuestos, principalmente del tipo sesquiterpenos oxigenados. El aceite esencial mostró actividad contra formas promastigotes de *Leishmania donovani*, con valores de CIM de 42 mg/mL. El aceite esencial presentó una elevada actividad esquistosomicida, ya que todos los pares de *Schistosoma mansoni* estaban muertos después de la incubación con el aceite esencial a las concentraciones de 10, 50, y 100 g/mL. Este tipo de investigación está relacionada al proyecto de investigación al determinar la actividad antibacteriana de género *Baccharis*, pero con un método diferente.

Toribio, Fernández, Toso y Tortone (2007) publicaron: **Estudio de la actividad antimicrobiana en cuatro especies del género *Baccharis* (*Baccharis articulata*, *B. soliafolia*, *B. pingraea* y *B. spartioides*) frente a ocho especies bacterianas: *Staphylococcus aureus* CIM(100 mg/mL) *Streptococcus agalactiae* CIM (97 mg/mL), *Staphylococcus epidermidis***

CIM(105 mg/mL), *Salmonella Typhimurium* CIM(10 mg/mL), *Klebsiella spp* CIM (36 mg/mL), *Shigella spp* CIM(12 mg/mL), *Proteus spp* CIM(5 mg/mL) y *Escherichia coli* CIM(7 mg/mL). Los extractos metanólicos de *B. articulata*, presento un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 12mm y *Staphylococcus epidermidis* de 17mm. *B. soliafolia* presento un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 15mm, *Staphylococcus epidermidis* de 20mm y *Streptococcus agalactiae* de 12mm. Y por último *B. pingraea* presento un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 17mm, *Staphylococcus epidermidis* de 20mm y *Streptococcus agalactiae* de 20mm. Este trabajo se relaciona al proyecto de investigación en la utilización del método Kirby- Bauer para la determinación de la actividad antibacteriana del género *Baccharis*, pero el extracto metanólico de *Baccharis prunifolia* presento un halo de inhibición solo frente *S. aureus* de 8mm menor al trabajo ya mencionado. El efecto antibacteriano fue reducido, limitado solo a microorganismo grampositivos no manifestando ser sensibles las bacterias Gram negativos. Sin embargo, cabe destacar que *B. spartioides* no manifestó actividad biológica frente a ninguno de los microorganismos ensayados.

Rangel, García, Velazco, Buitrago y Velazco (2001) publicaron un estudio titulado **actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida***. En el presente estudio consistió en determinar el efecto antibacteriano por el método de difusión en agar con disco de papel contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los resultados que obtuvieron, mostraron acción antibacteriana para todos los extractos sólo contra *S. aureus*, en el caso del extracto etanólico el halo inhibición fue de 16 mm, en el extracto cetónico de 15 mm y el extracto acuoso de 17 mm Sin embargo, para el caso de *P. aeruginosa* se estimuló el desarrollo de la bacteria, de igual manera no ejerció ninguna actividad sobre *C. albicans*

## Antecedentes Históricos

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos. El estudio con las plantas de la familia Asteraceae se inició hace 300 años a. C. ya que fue Teofrasto (372- 288 a.C.) quien la describió en su obra de Historia Plantarum. No obstante, la familia recién fue fundada con el nombre de Compositae por Paul D. Giseke en 1792. El Código Internacional de Nomenclatura Botánica permite también el uso del nombre Asteraceae Dumortier, nombre asignado en 1822 y que deriva del género tipo, Aster, término que a su vez proviene del griego ἀστήρ que significa estrella y hace alusión a la forma de la inflorescencia (Katinas, 2007).

Las contribuciones más importantes al conocimiento y la sistemática de las Asteraceae comienzan con el francés Henri Cassini a través de numerosas publicaciones durante el período 1812-1831 que incluyen descripciones muy detalladas de su morfología. Otro gran contribuyente al conocimiento de la familia fue George Bentham (1873), quien las trató, junto con Joseph Dalton Hooker, en su monumental obra Genera Plantarum (1862-1883) y establecieron las 13 tribus, que son las tradicionalmente usadas en la actualidad. En Argentina, el gran botánico español Angel Lulio Cabrera (1908-1999) fue quien marcó los estudios en esta familia de plantas. Cabrera y autores subsiguientes se basaron en la clasificación de Bentham (1873) para el tratamiento de Asteraceae en las floras locales (Katinas, 2007).

En su clave para la determinación de géneros de Asteraceae de Argentina, Cabrera (1961) considera dos subfamilias: Tubuliflorae y Liguliflorae con las tribus Anthemideae, Arctotideae, Astereae, Calenduleae, Cynareae, Eupatorieae, Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae,

Senecioneae y Vernonieae, para la primera y la tribu Cichorieae para la segunda. Esta familia incluye una cantidad de especies útiles desde diversos puntos de vista. El uso etnobotánica de muchas de ellas ha ayudado al progreso y sustento de un gran número de pueblos en todo el mundo satisfaciendo sus necesidades de alimento, forraje, leña, medicinas, entre otros (Katinas, 2007).

Desde el punto de vista estrictamente económico, unas 40 especies tienen importancia directa en alimentación humana (hortalizas y “semillas” oleaginosas) e indirectamente por productos obtenidos por la industria. Otras especies silvestres tienen potencial nutricional, muchas son de interés tecnológico u ornamental, y centenares contienen metabolitos secundarios de uso farmacéutico o industrial o aportan néctar y polen para la producción apícola, forraje para la producción ganadera, entre otros. Muchas son pioneras u oportunistas, y gran número resultan malezas de cultivos y/o tóxicas para el ganado. Además, numerosas especies tienen un rol destacado en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Vitto y Petenatti, 2009).

Por otra parte, la fitoquímica nos permite conocer aún más los recursos naturales con que se cuenta y así darles un mejor aprovechamiento; proporcionándoles un mayor valor agregado al comercializarlas como productos puros o extractos (González, 2004).

## **Bases Teóricas**

### ***Familia Asteraceae***

La familia Asteraceae según Simpson G. (2005) corresponde al orden Asterales, Suborden Asteridae, y está caracterizada por sus inflorescencias racimosas en capítulos, con flores individuales epíginas rodeadas de una o

varias hileras de brácteas involucreales, sobre el receptáculo común en que remata el escapo o rama florífera (Simpson, 2005).

En muchas regiones del mundo las Compuestas llegan a integrar hasta el 10 % de la flora vernácula. Son flores (Figura 1) hermafroditas, unisexuales o estériles. Sin cáliz o con éste reemplazado por vilano de pelos o escamas; los pelos pueden ser lisos, escábridos o plumosos. Corola formada por 5 pétalos soldados; puede ser tubulosa, con forma de tubo (flósculos o flores flosculosas) o de lengüeta con tres o cinco dientes (lígulas o flores liguladas). Su fruto tipo aquenio o cipsela. Puede presentar en su extremo superior vilano, en ocasiones sobre una prolongación estrecha o pico estas pueden almacenar inulina un polisacárido, como sustancia de reserva en órganos subterráneos. Su distribución es cosmopolita; y es la familia más numerosa de las plantas con flores, con unos 1100 géneros y 20.000 especies (Simpson, 2005).



**Figura 1. Partes de una planta de la familia Asteraceae (Carretero, 2004)**  
**Género *Baccharis***

El género *Baccharis* está representado por más de 500 especies descritas por Carlos Linneo como árboles perennes que miden de uno hasta seis metros de altura. Generalmente son glabros y a menudo resinosos de ramas ascendentes, Las hojas son caulinares, ocasionalmente escasas o ausentes en la floración, sus brácteas son usualmente de color verde, pero

también rojo o púrpura. Tienen un nervio o carena y márgenes coroides, las flores son todas floculadas, Blancas a amarillentas; estas especies son alimentos para las larvas de algunos lepidópteros y algunas especies son interesantes para cultivos bacterianos (Grierson y Covey, 1991).

*Baccharis* es un género exclusivamente americano cuyo carácter fundamental es la dioecia. Se reconocen cerca de 400 especies mayormente representadas en las zonas tropicales y subtropicales, que se extienden desde el extremo austral de Suramérica hasta el sur de los Estados Unidos continuando por la zona este hasta Massachusetts. Sus especies habitan en gran diversidad de condiciones ecológicas, encontrándose en diferentes zonas climáticas. Numerosas especies son características de las sinecias representativas de los páramos, subpáramos y del nivel superior de los bosques andinos. También pueden serlo de la vegetación subserial que prospera en las áreas total o parcialmente destruidas del bosque andino (Grierson y Covey, 1991).

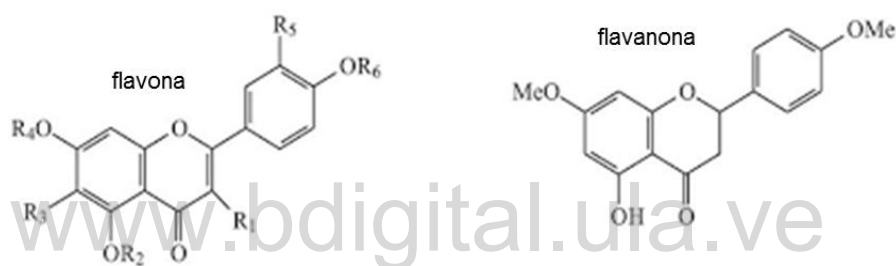
www.bdigital.ula.ve

### ***Fitoquímico del género Baccharis***

El género *Baccharis* ha sido objeto de gran cantidad de estudios fitoquímico y de actividad biológica. Desde principios de 1900 se inició su estudio y hoy en día, hay más de 150 compuestos aislados e identificados de este género. Entre los compuestos reportados se encuentran principalmente flavonoides, diterpenos y triterpenos, también se han obtenido cumarinas y aceites esenciales (Abad y Bermejo, 2008). A continuación, se describirán los núcleos más representativos de metabolitos aislados del género *Baccharis*.

## Flavonoides

Los flavonoides son compuestos casi universales en los vegetales, algunos de ellos son los responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas. Son un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo (Figura 2). Por lo general están presentes como agliconas libres y pocas veces glicosilados, una característica de la familia Asteraceae. Se tiene un registro de 298 flavonoides en *Baccharis* con 109 compuestos diferentes, de los cuales 24 unidades son de flavanona y 85 unidades de flavona (Abad y Bermejo, 2008).



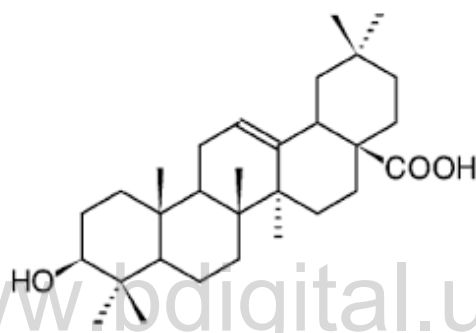
**Figura 2. Unidades de flavonoides aislados en el género *Baccharis***  
(Abad y Bermejo, 2008)

Los flavonoides han sido estudiados durante décadas, por su amplia gama de actividades biológicas. Numerosos estudios han asociado los flavonoides con beneficios en la salud e importantes propiedades antioxidantes ya que reducen la peroxidación lipídica y el efecto negativo de los radicales libres, contribuyendo a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y algunos tipos de cáncer (Prada, 2015).

## Terpenoides

Inicialmente se creía que este tipo de metabolitos eran producidos exclusivamente por hongos del género *Fusarium* y *Myrothecium* y se les

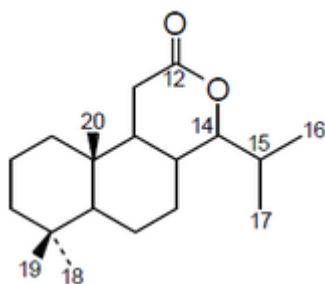
denominó Tricotecenos. Sin embargo, este tipo de metabolito se aisló en *B. megapotamica*, lo que hizo sospechar que era por contaminación con hongos demostrando que estos metabolitos se biosintetizan en algunas especies de estas plantas después de la polinización femeninas, como es el caso *B. coridifolia*. Aunque existen pocos reportes sobre la composición de triterpenos en el género *Baccharis*, los compuestos más comunes son triterpenoides de núcleo oleanólico (Figura 3) al cual se le han atribuido numerosas propiedades beneficiosas para la salud, (Abad y Bermejo, 2008).



**Figura 3. Estructura del ácido oleanólico.** (Abad y Bermejo, 2008)

### ***Diterpenos***

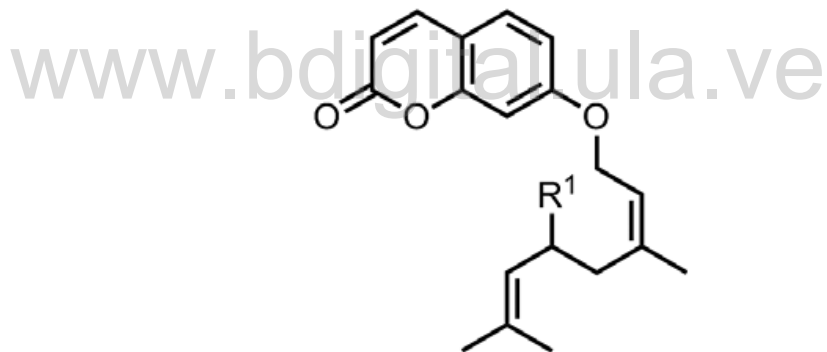
Los diterpenos (Figura 4) característicos del género *Baccharis* son los de tipo neoclerodano, además se han aislado derivados de kaurano y labdano. De *B. gaudichaidiana* se aisló dos nuevos diterpenos clerodano, denominados gaudichanolides (A y B) y otro llamado bacchariol (Abad y Bermejo 2007).



**Figura 4. Estructura de un diterpeno.** (Abad y Bermejo, 2008)

### **Cumarinas**

En extractos de *Baccharis darwiniis* se aislaron tres cumarinas (Figura 5) llamadas 5'- hidroxiaurapteno (anisocoumarin H), aurapteno (7-geraniloxicumarina) y 5'- oxoaurapteno (diversinina). La anisocoumarina H y diversinina han demostrado tener actividad antifúngica (Prada, 2015).



**Figura 5. Estructura de una cumarina.** (Abad y Bermejo, 2008)

### **Usos tradicionales del género *Baccharis***

Las especies de este género son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de varias dolencias, tales como: contusiones, inflamaciones, antiséptico, entre otros. Estas propiedades se deben a su composición química, basada principalmente en flavonoides, diterpenos y triterpenos, en

donde los flavonoides se distinguen por conferir el color a las plantas y resistencia frente al ataque de microorganismos. También se han obtenido en menor proporción cumarinas y aceites esenciales; sin embargo, hasta el momento no se ha establecido un marcador químico para caracterizar a las especies de *Baccharis* (Martínez y Terraza, 2010).

### ***Baccharis prunifolia***

Esta especie se describe como un arbusto con una altura máxima de dos metros, presenta capitulescencias terminales de flores blancas, es bastante polimorfa en cuanto a tamaño y forma de las hojas como a desarrollo, densidad de las inflorescencias y número de flores por capítulo, es propia de la región templada de los Andes (Figura 6), donde crece abundantemente en zonas boscosas, abiertas y en matorrales. Se extiende desde Venezuela hasta Bolivia. Para esta especie han sido registrados los siguientes nombres vulgares: Chilco de páramo, Ciro y Chilca (Yepes, 2007).



**Figura 6. *Baccharis prunifolia*** (Yepes, 2007).

### ***Clasificación taxonómica de la especie Baccharis prunifolia***

El Herbario Nacional Colombiano indica que, la especie objeto de estudio corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

**Clase:** Magnoliopsida

**Sub clase:** Asteridae

**Orden:** Asterales

**Familia:** Asteraceae

**Género:** *Baccharis*

**Especie:** *Baccharis prunifolia*

(Yepes, 2007).

### ***Productos naturales***

Es un compuesto químico o sustancia biosintetizadas en las plantas, también llamados metabolitos secundarios, los cuales, tienen actividad biológica que pueden ser de interés para los investigadores. Los principales productos naturales son aceites esenciales, oleorresinas, concretos, absolutos, tinturas y extractos (Marcano y Hasegawa, 2002).

### ***Extractos***

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente del material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos (Bruneton, 2001).

- ***Extractos Fluidos***

Los extractos fluidos son extractos de origen vegetal que, con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de esta corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de material vegetal seco corresponden a 100 partes de

planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación (Bruneton, 2001).

- **Extractos Secos**

Los extractos secos son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5 % (Bruneton, 2001).

- **Extractos Blandos**

Poseen una concentración de principio activo superior al material vegetal original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan (Bruneton, 2001).

- **Crioextractos**

Se obtiene por molturación del vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que, dependiendo del vegetal, puede llegar a ser hasta 70 °C (Bruneton, 2001).

### ***Actividad antibacteriana***

Las investigaciones actuales han enfocado sus estudios en la búsqueda de compuestos que posean usos como agentes terapéuticos, con la finalidad de controlar las diferentes enfermedades que derivan de los microorganismos. Para ello el uso de los aceites esenciales y extractos han tomado un papel importante en esta búsqueda, porque muchas veces la mezcla de componentes terpénicos en su mayoría oxigenados, presentan

algún tipo de actividad frente a bacterias comunes. Por tal motivo, resulta necesario encontrar nuevos compuestos que tengan efectos antibacterianos, como una alternativa al desarrollo de la resistencia bacteriana, propiciada por el uso indiscriminado de los antibióticos. (Albado, Saez y Gradiel, 2001).

Como las bacterias pueden evadir los efectos letales de los antibióticos a través de varios mecanismos, lo que se requiere actualmente son agentes antibacterianos con mecanismos de acción novedosos. Esto resalta la importancia de realizar estudios en aceites esenciales y extractos para obtener una posible alternativa terapéutica con promisorio actividad antibacteriana (Albado, Saez y Gradiel, 2001).

### ***Bacterias***

Las bacterias son organismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$  de longitud) y diversas formas, incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Carecen de núcleo, su ácido desoxirribonucleico (ADN) se encuentra libre en el citoplasma y no tienen organelos, como las mitocondrias, cloroplastos o aparato de Golgi. A pesar de su sencilla organización celular, cuentan con una pared celular (capa de polisacáridos) que envuelve la célula proporcionándole rigidez y protección (Spicer, 2009).

Se reproducen asexualmente por medio de una forma de división celular denominada fisión binaria, que produce copias genéticamente idénticas a la célula original. En condiciones ideales, algunas bacterias se duplican en cuestión de minutos por lo que podrían en principio, dar origen a una población de millones de bacterias en poco tiempo (Spicer, 2009).

## ***Bacterias Gram-positivas y Gram-negativas***

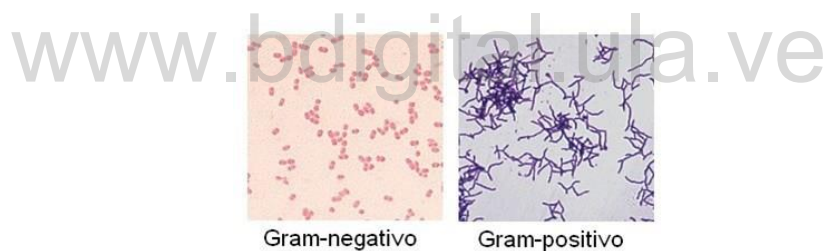
La pared celular de las bacterias Gram positivas se compone de peptidoglucano que es el responsable de la rigidez estructural y de la resistencia a la presión osmótica interna bacteriana, estos microorganismos contienen una estructura relativamente simple, de 15-50 nm de grosor. Está formada por alrededor de 50 % de peptidoglucano, un 40-45 % de polímero ácido (que hace que la superficie celular sea muy polar y tenga carga negativa) y un 5-10 % de proteínas y polisacáridos. La capa de polímeros intensamente polar influye en la penetración de moléculas ionizadas favoreciendo la entrada de compuestos cargados positivamente (Spicer, 2009).

Mientras que la pared celular de las Gram negativas es mucho más compleja. Desde la membrana plasmática hacia el exterior consta de las siguientes estructuras: un espacio periplásmico que contiene enzimas y otros componentes, una capa de peptidoglucano de 2 nm de grosor que constituye el 5% de la masa de la pared celular; con frecuencia está unida a moléculas de lipoproteínas que se proyectan hacia el exterior y una membrana externa formada por una bicapa lipídica similar en algunos aspectos a la membrana plasmática; contiene moléculas de proteínas y en su cara interna tiene lipoproteínas que están unidas al peptidoglucano. Otras proteínas forman canales transmembranales llenos de agua, denominados porinas, a través de la pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas polisacáridos complejos, que forman componentes importantes de la superficie externa; son diferentes en distintas cepas de bacterias y son los principales determinantes de la antigenicidad del microorganismo (Spicer, 2009)

## ***Tinción de Gram***

La técnica de la tinción de Gram es un tipo de coloración diferencial rápida y fácilmente empleada en microbiología para diferenciar las bacterias según sus características morfológicas. El principio del método se basa en la tinción de todas las bacterias mediante cristal violeta o violeta de genciana y posteriormente decolorar los microorganismos con alcohol-acetona, decolorándose los microorganismos Gram negativos mientras que los Gram positivos siguen manteniendo la coloración (Spicer, 2009).

Posteriormente se utiliza un colorante de contraste para visualizar los microorganismos Gram negativo como la fucsina o safranina. De este modo podemos visualizar las bacterias Gram positiva de color azul-violáceo mientras que las Gram negativas se visualizaran de color rojo o rosa (Figura 7).



**Figura 7. Bacterias Gram positivo y Gram negativo** (Rodríguez y Coronado, 2016)

## ***Resistencia Bacteriana***

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. Desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superiores a la concentración inhibitoria mínima (**CIM**). Una

concentración por debajo de la **CIM** califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles. Los conceptos de sensibilidad y resistencia son absolutamente relativos y dependen tanto del valor de la localización de la infección como de la dosis y vías de administración del antibiótico (Fernández ,2003)

### ***Tipos de resistencia***

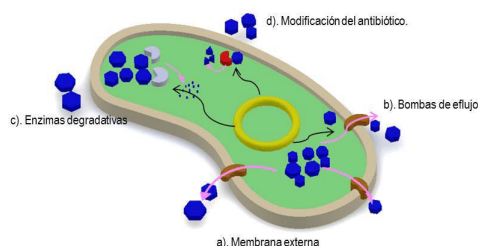
- ***Natural o intrínseca:*** Es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos, en el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Fernández ,2003)
- ***Adquirida:*** Constituye un problema en la clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles. La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético. En el primer caso, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández ,2003)

## ***Mecanismos de resistencia***

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos (Figura 8). El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (Fernández ,2003)

Producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por el acetil transferasa, y el caso más típico, el de las betas lactamasas, para el grupo de los betas lactámicos. En años recientes la aparición de beta lactamasas de amplio espectro que incluyen a las antibetalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam), dificulta el uso de estos antibióticos tan utilizados (Fernández ,2003)

Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Fernández ,2003)



**Figura 8. Mecanismo de resistencia bacteriana (Fernández ,2003)**

## ***Método de Extracción***

Los procesos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

- Extracción con agua: infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.
- Extracción con solventes orgánicos: maceración, lixiviación o percolación, extracción y Soxhlet, digestión (González, 2004).

## ***Tipos de Extracción***

- ***Extracción Soxhlet***: Método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas (González, 2004).
- ***Digestión***: En este proceso se agrega solvente caliente (con temperaturas no mayores a los 50 °C) al material vegetal molido colocado en un material de vidrio de boca pequeña, la temperatura del solvente permite una mayor extracción de 6 compuestos ya que la solubilidad de la mayoría de las especies aumenta con la temperatura (González, 2004).
- ***Infusión y Decocción***: Tanto la infusión como la decocción son procesos simples de extracción con agua, en el primer caso se agrega agua caliente o fría al material molido y luego se filtra; en el segundo el material se hierve por espacio de 15 minutos con el agua (González, 2004).
- ***Selección del solvente***: La elección del disolvente depende de parámetros técnicos y económicos, tales como: selectividad, estabilidad, inercia química, punto de ebullición, seguridad de manipulación entre otros. Los

disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos: éter de petróleo, hexano, propano y/o butano. Aunque el benceno es un buen disolvente, su toxicidad limita cada vez más su utilización. Igualmente, se ha recurrido a disolventes halogenados y al etanol. También se utilizan otros solventes como soluciones ácidas o alcalinas para la extracción selectiva de algunos compuestos, sin embargo, se debe tener precaución con el pH de las mezclas para prevenir hidrólisis o reordenamiento de compuestos sensibles (González, 2004).

- **Maceración:** Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente, consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación en intervalos de cinco días. Luego se filtra el líquido, exprime el residuo y recuperar el solvente en un rotavapor, hasta obtener el extracto (González, 2004).
- **Percolación:** También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico, y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hidraten con el disolvente (González, 2004).

## ***Métodos para determinar la susceptibilidad antibacteriana***

***Método de dilución en caldo o en agar (CIM):*** Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "*In vitro*" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado (Malbrán, 2012).

***Método de difusión en agar con discos:*** Es un método que mide la susceptibilidad de un microorganismo frente a un antimicrobiano. Utilizando un disco que tiene una cantidad específica de un antibiótico el cual es colocado en una superficie de agar previamente inoculado con un microorganismo, pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar y este difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Picazo,2000).

***Método de la cinta o Epsilometro (E test):*** La prueba Épsilon (Etest) es un método con una base de agar para evaluar susceptibilidad microbiana, desarrollado para vencer las desventajas de la difusión en disco y los métodos de dilución convencional, mientras mantiene los aspectos

favorables de ambos procedimientos. Consiste en un gradiente definido y continuo de antibiótico precalibrado, que cubre 15 diluciones dobles. El Etest se procesa tan fácilmente como la prueba de disco y genera valores precisos de concentración inhibitoria mínima y altamente reproducibles. La prueba ha sido exitosamente utilizada contra microorganismos aerobios, anaerobios, organismos de difícil crecimiento y de crecimiento lento como *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Neisseria spp.* *Legionella spp.* También ha sido evaluado para antibióticos "problema" como imipenem, glicopéptidos como vancomicina y teicoplanina y combinaciones de inhibidores de Beta lactamasas, tales como amoxicilina y ácido clavulánico. Complementa sistemas de tamizaje, de discos y sistemas automatizados como Vitec, Microscan y Pasco, en áreas donde estos métodos pueden ser limitados y los resultados son cuestionables o no reproducibles. El Etest es reconocido como una herramienta de C/M para vigilancia epidemiológica. Se está convirtiendo en el método estándar de las compañías farmacéuticas en la evaluación de nuevos antibióticos, de comparaciones multicéntricas grandes y ensayos clínicos (Velásquez, 1998).

### **Sistema de Hipótesis**

La investigación tiene variable, pero no fueron sistematizadas porque no es una investigación confirmatoria.

**Tabla 1. Operacionalización de los eventos**

| <b>Evento</b>            | <b>Definición Conceptual</b>   | <b>Definición Operacional</b>  | <b>Dimensiones</b>   | <b>Indicador</b>                    |
|--------------------------|--|--|--|-------------------------------------|
| Actividad Antibacteriana | Descrito como una sustancia que inhibe el crecimiento de bacterias (Albado, Saez, y Grabiell, 2001). | Se determinará mediante el Método de difusión en agar con disco de papel (Gracia, Correa y Rojas, 1995), | Actividad antibacteriana de la especie <i>Baccharis prunifolia</i> | Lecturas de los halos de Inhibición |

(Peña, Sayago, Buitrago y Rojas; 2019)

### **CAPÍTULO III**

#### **MARCÓ METODOLÓGICO**

##### **Tipo de Investigación**

Hurtado (2010), refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio, en la cual se resalta lo que quiere saber, pues esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso e identificar el tipo de investigación. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Específicamente, en esta investigación se estudió la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Baccharis prunifolia* en función de un periodo y contexto determinado, por lo tanto, se puede decir que esta investigación es de tipo evaluativa.

##### **Diseño de Investigación**

La estrategia que se implementa para recolectar los datos de un proceso de investigación constituye el diseño (Hurtado, 2010). De tal manera, esta investigación es de campo, ya que los datos del evento de

estudio se recolectaron en el lugar donde ocurrió el fenómeno, específicamente en el Laboratorio C “Antonio Morales,” ubicado en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Con respecto al tiempo de recolección de datos, esta investigación debe ser contemporánea, debido a que se recolectaron durante el periodo de desarrollo del trabajo, y los datos se tomaron en un solo momento.

## **Población y Muestra**

### **Unidad de investigación**

Hernández, Fernández y Baptista (2004), refieren que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga. Una vez conociendo lo citado al principio la población estudiada es finita, integrada por la especie *Baccharis prunifolia* que se recolectó en el sector collado del cóndor, a 20 km de la población de Piñango Municipio Miranda en el estado Mérida, dicha especie se evaluó en el Laboratorio C “Dr. Antonio Morales”, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde noviembre de 2015 hasta diciembre de 2019.

### **Selección y tamaño de la muestra**

Los instrumentos que se utilizarán para la obtención de la información deberán ser aprobados por los expertos, con el objetivo de determinar la validez del contenido. De hecho, se estima que la eficacia constituye el procedimiento que permite determinar la consistencia interna de los instrumentos en cuanto a lo que se propone medir, de ahí se dice que la

validez, se refiere al grado en que un instrumento realmente mida la variable según Hernández, Sampieri (2010).

## **Materiales y Métodos**

**Recolección de las especies botánicas:** Las muestras vegetales fresca de *Baccharis prunifolia* se colectaron en el mes de mayo del año 2017, en el sector collado del cóndor, a 20 km de la población de Piñango, Municipio Miranda en el estado Mérida.

**Determinación taxonómica de las plantas:** Las diferentes muestras recolectadas de *Baccharis prunifolia* fueron identificadas por el Dr. Pablo Meléndez. Una muestra testigo fue depositada, en el herbario “Dr. Luis Ruiz Terán” (MERF), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

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

**Selección, división y preparación del material vegetal:** El material vegetal recolectado de la especie *Baccharis prunifolia*, fue sometido a un proceso de selección para eliminar las impurezas y partes en descomposición de las hojas. Luego se seleccionó una muestra representativa destina a la preparación del extracto.

**Secado, molienda y pesado del material vegetal:** El material vegetal seleccionado de *Baccharis prunifolia* (200 gr), se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario MERF, a la temperatura no superior a 40 °C, durante al menos 72 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que la muestra se encontrara libre de humedad y quebradiza al tacto, para luego realizar el proceso de molienda, hasta obtener un polvo fino capaz de traspasar un tamiz de malla número 20. La muestra obtenida con un peso de 180 g, se

colocó en un envase rotulado, para luego colocarse en un lugar seco y fresco, hasta la realización de las diferentes pruebas.

**Extracción por maceración del material vegetal:** La muestra seca y molida de *Baccharis prunifolia*, luego de pesar una cantidad representativa, fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días divididos en dos ciclos de cinco días. El extracto metanólico obtenido se filtró por gravedad y concentró destilando el metanol a presión reducida, utilizando un rotavapor a la temperatura de 50 °C el producto seco se pesó (25 g) y colocó en un envase de color ámbar rotulado y sellado, conservándose en un lugar seco y fresco.

**Tamizaje Fitoquímico:** El estudio fitoquímico preliminar para el extracto metanólico, se realizó en el laboratorio C de productos naturales “Antonio Morales” del Instituto de investigaciones de la facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión del Dr. Alexis Buitrago. Los diferentes ensayos colorimétricos y cromatográficos utilizados reportados en la Tabla 2, permitieron identificar de forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos, cardiotónicos, taninos y mucilagos (Marcano y Hasegawa, 2002).

**Actividad antibacteriana:** La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó, en el laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) “Profesora Luisa Vizcaya”, del departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de Difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo se utilizaron las bacterias de referencia internacional: *Escherichia coli* (ATCC 25922),

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

| Tabla 2.- Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto <i>Baccharis prunifolia</i> |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|
| Alcaloides  |   |   |   |   |
| Ensayo  | Reactivo  | Preparación de la muestra   | Procedimiento   | Resultados  |
| Wagner  | Solución I <sub>2</sub> y KI  | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de HCl al 5 %. Luego se agitaron en vortex y filtraron | Agregar gotas del reactivo  | Precipitado de color rojo pardo   |
| Mayer   | Solución HgCl <sub>2</sub> y KI   |   |   | Precipitado color blanco o amarillento  |
| Hager   | Solución saturada de ácido pícrico  |   |   | Precipitado color blanco o amarillento  |
| Dragendorff   | Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O y KI                      |   |   | Precipitado color rojo o anaranjado   |
| Antraquinonas   |   |   |   |   |
| Reacción con amonio   | NH <sub>4</sub> OH concentrado  | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron    | Adicionar 1 gota del reactivo   | Color rojo (antraquinonas)  |
| Reacción con ácido sulfúrico  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado                                    |   | Adicionar 1 gota del reactivo   | Color rojo (quinona)  |
| Reacción de Borntrauger   | Agua destilada, KOH 5%, CHCl <sub>3</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6 % |   | Adicionar 3 mL de la base, llevar a ebullición durante 3 minutos. Extraer con el solvente orgánico y alcalinizar con 2 mL de la base. Agregar gotas del agente oxidante | Color rojo, amarillo o verde (benzoquinonas) y color rojo (derivados de antranas) |
| Reacción con Benceno  | Benceno y NH <sub>3</sub> 10%   |   | Adicionar 1 mL del solvente orgánico y alcalinizar con la base  | Color rosa, rojo o violeta (antraquinonas)  |

| Tabla 2.- Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto <i>Baccharis prunifolia</i> (Continuación) |                                     |  |   |  |
|--|-------------------------------------|--|---|--|
| Flavonoides  |                                     |  |   |  |
| Ensayo   | Reactivo                            | Preparación de la muestra  | Procedimiento   | Resultados   |
| Reacción de Shinoda  | HCl concentrado y magnesio metálico | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron | Añadir 2 gotas del ácido  | Color rojo (auronas o chalconas)   |
|  |                                     |  | Adicionar virutas de metal  | Color anaranjado a rojo (flavonas), color rojo (flavonoles), color magenta (flavononas)                        |
| Reacción de Pew's  | Polvo de zinc y HCl 5 N             |  | Adicionar gotas del ácido y una porción de polvo                        | Color rojo púrpura rojo cereza (dihidroflavonas), color rosa o café (flavononas y dihydrochalconas)            |
| Reacción de hidróxido de sodio   | NaOH 10 %                           |  | Añadir 3 gotas de la base fuerte  | Color amarillo a rojo (xantonas y flavonas), color café a púrpura rojizo(chalconas), color azul (antocianinas) |
| 2-aminoetil-difenil-borato (2-AED8)  | Solución 2-AED8 al 2 % en MeOH      |  | Aplicar la muestra en una placa cromatográfica. Revelar con el reactivo | Mancha de color amarillo con fluorescencia intensa a 365nm   |
| Cumarinas  |                                     |  |   |  |
| Reacción con hidróxido de amonio   | NH <sub>4</sub> OH concentrado      | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron | Adicionar 2 gotas de la base débil                                      | Fluorescencia de color azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365nm                                  |

www.bdigital.ula.ve

| Tabla 2.- Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto <i>Baccharis prunifolia</i> (Continuación) |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|
| Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos  |  |  |  |  |
| Ensayo   | Reactivo   | Preparación de la muestra  | Procedimiento  | Resultados   |
| Reacción con hidróxido de sodio  | Solución de NaOH 2 N   | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron | Añadir 5 gotas de la base  | Color amarillo (glicósidos)  |
| Keller-Killiani  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado, CH <sub>3</sub> COOH glacial y FeCl <sub>3</sub> |  | Adicionar el reactivo con cinco gotas del ácido fuerte   | Interface de color marrón (azúcares 2-desoxigenados)                     |
| Reacción de Legal  | Piridina, nitroprusiato de sodio al 5 %, NaOH 2 N  |  | Agregar 3 gotas de la base débil, una gota de la solución de la sal y tres gotas de la base fuerte | Color amarillo (cardenolidos ó lactonas $\alpha$ , $\beta$ -insaturadas) |
| Saponinas  |  |  |  |  |
| Prueba de la altura de espuma  | Agua destilada   | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron | El extracto acuoso se agitará vigorosamente y se medirá la altura de la espuma                     | Altura de la espuma entre 8 a 10mm, estable por 30 minutos               |
| Prueba de Bicarbonato de sodio   | NaHCO <sub>3</sub>   | Se disolvió una porción del extracto con 50mL de agua. Luego, se agitó en vortex y filtro                                | Añadir gotas de la sal y agitar vigorosamente durante 3 minutos                                    | La formación de espuma en forma de panal de abeja (saponinas)            |

| Tabla 2.- Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto <i>Baccharis prunifolia</i> (Continuación) |  |   |   |   |
|--|--|---|---|---|
| Taninos  |  |   |   |   |
| Ensayo   | Reactivo   | Preparación de la muestra   | Procedimiento   | Resultados  |
| Control  | Agua destilado<br>CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH y<br>NaCl | Se disolvió 100mg del extracto en 10 mL de etanol y se agitó durante 5 minutos. Luego se realizó una extracción con 25 mL de agua destilada, la solución resultante se calentó hasta ebullición durante 15 minutos. A la solución se le adicionó 0,2 mL de NaCl al 10% y se filtró. se roturaron 5 tubos de ensayo y se le adicionaron 3 mL del filtraron | Tubo 1: control   | Sin reacción  |
| Gelatina 1 %   | Gelatina   |   | Tubo 2: agregar 5 gotas de Solución de gelatina           | Precipitado de color blanco (taninos)   |
| Gelatina (1 %)- Sal (10 %)   | Gelatina y NaCl  |   | Tubo 3: agregar 5 gotas de la solución salina en gelatina | Precipitado de color blanco (taninos)   |
| Tricloruro férrico   | FeCl <sub>3</sub> 10 %   |   | Tubo 4: agregar 3 gotas de la solución de la sal férrica  | Color rojo-vino (compuestos fenólicos), color verde intenso (taninos pirocatecólicos), color azul (taninos pirogalatánicos) |
| Ferricianuro de potasio  | K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>                             |   | Tubo 5: agregar 1 gota de la cuaternaria                  | color azul (fenólicos)  |
| Mucilago   |  |   |   |   |
| Enfriamiento a 0-5 °C  | Agua destilada   | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron  | enfriará a una temperatura de 0-5 °C                      | Consistencia gelatinoso (mucilago)  |

| Tabla 2.- Procedimiento para el tamizaje fitoquímico del extracto <i>Baccharis prunifolia</i> (Continuación) |   |   |  |  |
|--|---|---|--|--|
| Triterpenoides y Esteroides  |   |   |  |  |
| Ensayo   | Reactivo  | Preparación de la muestra   | Procedimiento  | Resultados   |
| Reacción de lieberman bouchard   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . concentrado y CH <sub>3</sub> COOH glacial   | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron            | Añadir 2 gotas del ácido débil y esterificar con 2 gotas del ácido fuerte  | Interfase de color azul o verde (esteroides). Color amarillo anaranjado (Triterpenoides) |
| Reacción de Rosenthaler vainillina triterpenoides  | Vainillina y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . concentrado   |   | Añadir 2 gotas reactivo con 2 gotas del ácido fuerte   | Interfase de color violeta (triterpenoides)  |
| Prueba de Salkowski (Esteroides)   | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado  | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de CHCl <sub>3</sub> . Luego se agitaron en vortex y filtraron | Adicionar lentamente 2 mL del ácido fuerte   | Interfase de color marrón rojizo (anillo esteroideo)                                     |
| Prueba de Komarowsky   | A: 25 mL de 4-hidroxibenzaldehído en CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH al 2 %<br>B: 5 mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . E y CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH 1:1 | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron            | Aplicar la muestra en una placa cromatográfica. Eluir con una mezcla cloroformo, metanol y agua (70:30:5). Revelar con el reactivo | Mancha de color rojo (triterpenos), Mancha de color verde (esteroides)                   |
| Compuestos fenólicos   |   |   |  |  |
| Prueba de FeCl <sub>3</sub>  | FeCl <sub>3</sub> , solución de NaCl 0,9 % m/v y CH <sub>3</sub> COONa  | Se disolvieron en tubos de ensayo, 3 porciones del extracto con 2 mL de metanol. Luego se agitaron en vortex y filtraron            | Adicionar 3 gotas de acetato, neutralizada con 3 gotas la sal férrica en solución fisiológica                                      | Color rojo, vino, verde o azul (compuestos fenólicos)                                    |

El método permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias frente a una sustancia o mezcla de sustancia de origen vegetal. El protocolo experimental que se utilizó se presenta a continuación:

**Preparación del medio de cultivo:** Para las bacterias se colocaron aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri. Una vez solidificada la placa, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 °C hasta el día del ensayo.

**Preparación de discos:** Los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 20 µL del extracto *B. prunifolia* el cual fue preparado con el solvente de extracción a la concentración de 500 mg/mL. Luego se colocaron en placas de Petri y esterizaron bajo la luz UV, durante 90 minutos previo al ensayo.

**Reactivación de las bacterias:** Las bacterias se mantuvieron en medio de conservación a temperatura ambiente, a partir de este medio, se reactivaron las cepas y se verificó su pureza.

**Preparación de los inóculos:** Los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müller-Hinton, con un patrón McFarland N° 1 ( $3 \times 10^8$  UFC/mL).

**Siembra:** Los inóculos de cada bacteria se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril. Seguidamente, se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro impregnado con las muestras solventes (control negativo) y fármacos de referencia para cada bacteria (controles positivos).

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

**Lectura de los ensayos:** Se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 h, expresando el diámetro de la zona de inhibición en milímetro (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento bacteriano alrededor de los discos.

**Determinación de la (CIM):** Se determinó en aquellas bacterias que mostraron susceptibilidad al extracto ensayado. Para determinar la **CIM** se prepararon diluciones a diferentes rangos de concentración y se aplicó el procedimiento antes descrito, el cual, permitió la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (CLSI, 2018).

### **Evaluación de los Resultados**

Los resultados mostraron la actividad antibacteriana. Con la lectura de los halos de inhibición y la determinación de la concentración inhibidora mínima (**CIM**) en 5 cepas Gram-positivas y Gram-negativas.

### **Diseño de análisis**

Hernández, Sampieri (2010) refirieron que existe dos tipos de enfoques de investigación: cuantitativo y cualitativo. Esta investigación tiene un enfoque cualitativo, ya que se estudió las características de la especie *Baccharis prunifolia* (Asteraceae), con el fin de medir su actividad antimicrobiana.

## CAPÍTULO IV.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Determinación Cualitativa de los metabolitos secundarios del Extracto

##### Metanólico de *Baccharis prunifolia*

En la detección de alcaloides a través de la prueba Drangendorff se obtuvo como resultado la positividad (bajo) en el ensayo aplicada. Por otro lado se determinaron compuestos del tipo flavonoides mediante la reacción con Hidróxido de sodio al 10 % y el reactivo de Pew's obteniéndose en el primer ensayo positividad para xantonas y flavonas, mientras que en el segundo se obtuvo una coloración café que indica positividad (baja y moderada) para flavononas (Tabla 3).

Según (Abad y Bermejo, 2008) los compuestos más comunes presentes en el género *Baccharis* son los compuestos fenólicos. Los resultados de los ensayos realizados están relacionados con los reportes, obteniéndose positividad (abundante) en dos ensayos para los compuestos del tipo fenólico. Por otro lado, la reacción hidróxido de amonio se evidenció la positividad (abundante) de cumarinas en el extracto; mientras que la reacción de Salkowski fue positiva (bajo) para la presencia de esteroides. Además, los glicósidos se identificaron a través de las pruebas de hidróxido de sodio y Keller-Killiani dando positivas (bajo) en el extracto. En cuanto a la determinación de los taninos, realizada mediante la prueba de tricloruro de hierro al 10 %, se obtuvo una coloración rojo-vino demostrando la positividad (bajo) de este tipo de estructura química.

En un estudio previo obtención y caracterización de colorante natural a partir de la *Baccharis salicifolia* (chilca blanca) para uso textil, se demostró la presencia de alcaloides (prueba Drangendorff) y esteroides (prueba Salkowski), siendo ambas positivas y en mayor concentración en comparación con la especie *B. prunifolia* (Fernández y Saavedra, 2019). En

otra investigación (Herrera, 2017) se emplearon pruebas similares a las aplicadas en este estudio para *B. latifolia* se encontró positiva para esteroides, taninos y glucósidos en mayor comparación y compuestos fenólicos en menor comparación, permitiendo observar una diferencia con el resultado del tamizaje fitoquímico de esta investigación. La presencia de estos compuestos en muchos extractos rectifican algunas bondades atribuidas a las especies del género *Baccharis prunifolia* como antioxidantes (flavonoides) y actividad anti-inflamatoria (taninos). Estos resultados son comparados con especies del mismo género ya que no existen estudios recientes sobre la composición química de esta especie.

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

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico de los extractos metanólico de *B. prunifolia*

| Metabolitos secundario    | Pruebas                             | Bp  | Posibles Compuestos                                    |
|---------------------------|-------------------------------------|-----|--|
| Quinonas<br>Antraquinonas | NH <sub>4</sub> OH conc             | -   | -  |
|                           | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc | -   |  |
| Glucósidos                | NaOH conc                           | +   | Glucósidos   |
|                           | Keller Killiani                     | +   |  |
| Esteroides                | Salkowski                           | +   | Esteroides   |
| Triterpenoides            | Vainillina                          | -   | -  |
|                           | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> CONC |     |  |
| Flavonoides               | Pew's                               | +   | Flavononas,<br>dihidrochalconas y<br>otros flavonoides |
|                           | NaOH 10 %                           | ++  | Xantonas, flavonas<br>y chalconas                      |
| Taninos                   | Gelatina 1 %                        | -   | -  |
|                           | Solución<br>gelatina-NaCl           | -   |  |
|                           | K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>  | -   |  |
|                           | FeCl <sub>3</sub> 10%               | ++  |  |
| Saponinas                 | Altura de<br>espuma                 | -   | -  |
|                           | NaHCO <sub>3</sub>                  | -   |  |
| Alcaloides                | Dragendorff                         | +   | Alcaloides   |
| Cumarinas                 | NH <sub>4</sub> OH                  | +++ | Cumarinas  |
| Mucilagos                 | Enfriamiento<br>5 %                 | -   | -  |
| Fenoles                   | FeCl <sub>3</sub> 5 %<br>NaCl 0,9 % | +++ | Compuestos<br>Fenólicos                                |

Bp: *Baccharis prunifolia*, Ausente (-), bajo (+) Moderada (++), Abundante (+++)

**Determinación de la Actividad Antibacteriana del Extracto Metanólico de  
*Baccharis prunifolia*:**

El extracto fue ensayado con el propósito de determinar su potencial antibacteriano frente a las cepas de referencia internacional *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Mediante el método de susceptibilidad por difusión con disco de papel impregnado con el extracto metanólico de *Baccharis prunifolia*, se demostró el efecto solamente contra *S. aureus* a una **CIM** de 100 mg/mL (halo de inhibición de 8 mm), de igual manera, para las demás bacterias ensayadas no se observó ningún efecto. En la tabla 4, se presenta los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad antibacteriana realizado para la especie vegetal en estudio.

**Tabla 4. Actividad antibacteriana para el extracto *B. prunifolia***

| Microorganismos                   | <i>B.p</i> | Zona de inhibición (mm)* |     |     |     |     | CIM (µg/mL) |
|-----------------------------------|------------|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------|
|                                   |            | Antibióticos             |     |     |     |     |             |
|                                   |            | TS                       | VA  | GM  | AZ  | CE  |             |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)     | 8*         | 40*                      |     |     |     |     | 100         |
| <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)   | NA         |                          | 26* |     |     |     | NE          |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922)       | NA         |                          |     | 34* |     |     | NE          |
| <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357) | NA         |                          |     |     | 42* |     | NE          |
| <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) | NA         |                          |     |     |     | 38* | NE          |

**B.p:** extracto metanólico *B. prunifolia*; **TP:** Trimetoprim-Sulfametoaxol® (23,7/1,25 µg), **VA:** Vancomicina® (30 µg), **GM:** Gentamicina® (10 µg), **AZ:** Aztreonam® (30 µg), **CE:** Cefepima® (30 µg), **CIM:** concentración mínima inhibitoria; **NA:** no activo; **NE:** no ensayado; \*mm: de los halos de inhibición (disco de 6 mm de diámetro)/ promedio 2 ensayos

En tal sentido, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los extractos de *B. punifolia* presenta actividad similar a la obtenida en estudios previos (Rangel, García, Velazco, Buitrago y Velazco, 2001), a partir de los extractos etanólico, acetónico y acuoso, de la partes aéreas de *Baccharis nitida*, frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida albicans* (aislado clínico, LBM N° 151), por el Método de difusión en agar modificado. Los resultados obtenidos muestran acción antibacteriana de todos los extractos sólo contra *S. aureus*, en el caso del extracto etanólico el halo inhibición fue de 16 mm, en el extracto cetónico de 15 mm y el extracto acuoso de 17 mm, en comparación con esta investigación el halo de inhibición del extracto metanólico de *Baccharis prunifolia* fue menor frente a *S. aureus* siendo de 8mm.

Por otro lado, (Toribio M, Delia O, Fernandez Y, Toso R, y Tortone, 2007) evaluaron en cuatro especies del género *Baccharis* (Compositae) la presencia de actividad antimicrobiana frente a ocho especies bacterianas. El método utilizado en el ensayo fue el Kirby Bauer modificado al igual que esta investigación. Los extractos metanólicos de *B. articulata*, presento un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* CIM (100mg/dL). de 12mm y *Staphylococcus epidermidis* (105mg/dL). de 17mm. *B. soliafolia* presento un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 15mm, *Staphylococcus epidermidis* de 20mm y *Streptococcus agalactiae* (97mg/dL). de 12mm. Y por último *B. pingraea* presento un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 17mm, *Staphylococcus epidermidis* de 20mm y *Streptococcus agalactiae* de 20mm, pero el extracto metanólico de *Baccharis prunifolia* presento un halo de inhibición solo frente *S. aureus* de 8mm, menor en comparación al trabajo ya mencionado. Ninguna de las especies investigadas presento actividad frente a bacterias Gram-negativo. *B.*

*spartioides* no demostró actividad antimicrobiana frente a ninguna de las especies bacterianas investigadas.

## CAPITULO V.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

Las pruebas fitoquímicos del extracto metanólico de *Baccharis prunifolia* revelaron la presencia de alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides, glucósidos en menor concentración en comparación con cumarinas y compuestos fenólicos en mayor concentración, empleando la técnica de maceración como método de extracción.

Al evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales se evidencia el potencial de muchas especies vegetales, tal es el caso de *B. prunifolia* frente a cepas de referencia como: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) la cual mostro sensibilidad frente al extracto con una **CIM** de 100 mg/mL (halo de inhibición de 8 mm), de igual manera, para las demás bacterias ensayadas no se observó ningún efecto a través de los métodos antes descritos permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de esta especie.

El desarrollo continuo de mecanismos de resistencia bacteriana ha estimulado la búsqueda de nuevas moléculas para combatirlas. Una opción a considerar es el uso de productos naturales que en los últimos tiempos están alcanzando niveles mayores de aceptación, ello debido a su accesibilidad económica, baja tasa de efectos colaterales y la difusión de sus efectos benéficos tal como lo muestra el género *Baccharis*.

## Recomendaciones

- Continuar con el estudio del extracto de otras especies perteneciente al género *Baccharis*.
- Evaluar el extracto de *B. prunifolia* con otros microorganismos patógenos, ya que esta especie no reporta estudios previos de la actividad antibacteriana en la literatura.

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

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Abad M., & Bermejo P. (2008). *Baccharis*. Zaragoza, Madrid: Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense.
- Adzet T., Cartaña C., Cañigüeral S., Gené R., Marin E., & Parella M. (1996). Actividad antiinflamatoria y analgésica de *Baccharis trimera*. Distrito Federal, Mexico: Editorial UAM (Universidad Autónoma de México).
- Albado P., Saez F., & Grabiell A. (2001). Composición y actividad antibacteriana. Lima, Perú: *Revista Med Hered*, 12,9-16.
- Baptista P., Fernández C., & Hernández R. (2010). Metodología de la Investigación (4ta Edición). Monterrey, México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- Baratta M. (1998). Composición química, actividad antimicrobiana y antioxidativa de aceites esenciales de laurel, salvia, romero, orégano y cilantro. Yucatán: México: *Revista Tropical and subtropical Agroecosystems*, 12, 539-547.
- Bastos Y., Caixeta H., Cunha M., Jairo K., Lizandra G., Magalhães M., Márcio L., Morais K., Nanayakkara V., Parreira J., Rodrigues K., Silva M. & Wilson R. (2010). Actividades del aceite esencial de las hojas de *Baccharis dracunculifolia*. Madrid: España: Editorial círculo rojo.
- Bermejo P., Bessa A. & Martinez M. (2007). Sustancias biológicamente activas del género *Baccharis*. Toronto, Canadá: Universidad de Estudios de productos naturales.

- Buitriago D., García I., Rangel D., Velazco J. & Velazco E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida*. Mérida, Venezuela: *Revista de la Facultad de Farmacia*. Página: 42
- Bruneton J. (2001). Farmacognosia y fitoquímica de Plantas medicinales. (2da Edición). Zaragoza: España: Editorial Acribia.
- Cabrera A. (1961). Clave para la determinación de los géneros. Buenos Aires, Argentina: *Revista Museo Argentino de Ciencias Naturales*, 16, 618-627.
- Carretero I. (2004). Familia Compositae (Asteraceae). Distrito Federal, México: *Revista ciencia botánica de México*, 42, 62-63.
- Chaudhury R. (1992). Medicina herbaria para la salud humana. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud, General Guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine.
- CLSI. (Estados Unidos) . Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28 Edición, {Wayne, PA}: clínica and laboratory, standards institute.<[https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28\\_sample.pdf](https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf)>Consulta: 23 de Junio de 2018.
- Correa E., Gracia C., & Rojas N. (1995). Estudio Fitoquímicos preliminar y evaluación antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. Bogotá, Colombia: *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 74:101-109.
- Coronado M., & Rodríguez E. (2016). Bacteriología general, principios y práctica de laboratorio (2da Edición). Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.

Covey N. & Grierson D. (1991). "Biología Molecular de plantas". Zaragoza, España: Editorial Acribia.

Delaquis P., Girard B., Mazza E. & Stanich K. (2002). Actividad antimicrobiana de fracciones individuales y mixtas de aceites esenciales de eneldo, cilantro y eucalipto. Roma, Italia: Editorial Internacional de Microbiología.

Escaleras R. y Naranjo P. (1995). La Medicina Tradicional en el Ecuador. Quito, Ecuador: Corporación Editora Nacional.

Fernández F. (2003). Resistencia microbiana a las drogas; antibióticos e infecciones bacterianas. Ciudad de la Habana. Cuba: *Revista Cubana de medicina militar*. <scielo.sld.cu > scielo > pid=S0138-65572003000100007> Consulta: 23 de Junio de 2018.

Fernández J., Oriani D., Toribio M., Tortone C. & Toso R. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Baccharis*. Buenos Aires, Argentina: *Revista Farmacológica y actividad Biológica*. Página: 7.

Fernandez W., & Saavedra D. (2019) obtención y caracterización de colorante natural de *Baccharis salicifolia* (chilca blanca) para uso textil. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Gianello J. & Giordano O. (1984). Examen Químico en seis especies del Género *Baccharis*. Milan, Italia: *Revista Laboratorio de Química*. 5: 123-126.

González A. (2004) Obtención de aceites esenciales y extractos Etanólicos de plantas del amazonas. Manizales, Colombia: Universidad nacional de Colombia, departamento de Ingeniería química.

- Gyllenhaal Ch. & Soejarto D. (1997). Información etnomédica en el descubrimiento y desarrollo farmacéutico. Roma, Italia: Sociedad Italo-latinoamericana de Etnomedicina.
- Hernández A. & Sampieri R. (2010). Metodología de la investigación. Distrito Federal, México: Editorial McGraw Hill.
- Herrera B. (2017) Cibrado fitoquímico del *Baccharis latifolia*. Ciudad de Habana, Cuba: *Revista Cubana de plantas medicinales*, Vol 22 nº 1.
- Hurtado J.(2010). Procesos Metodológicos de la Investigación: En el Proyecto de Investigación, Compresión Holística de la Metodología y la Investigación. Caracas, Venezuela: Ediciones Quirón (páginas: 97-123).
- Katinas L. (2007). Panorama de la familia Asteraceae. Buenos Aires, Argentina: Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.
- Malbrán C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiano por dilución. España: Clinical and laboratory standards institute, Vol 32. 2-4.
- Marcano D. & Hasegawa M. (2002). Fotoquímica orgánica. Caracas, Venezuela: Ediciones Vicerrectorado Académico UCV.
- Martínez S. & Terraza E. (2010). Actividad antifúngica in vitro de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre Fitopatógenos. Bolivia: *Revista Boliviana de Química*, pagina: 27.
- Prada J. (2015). Análisis metabólico de la especie *Baccharis latifolia* (Asteraceae) en la sabana de Bogotá. Colombia: Bogotá, Universidad militar nueva

Granada, Facultad de Ciencia Básicas, departamento de Biología Biorgánica.  
Paginas (17- 20).

Petenatti M., & Vitto L. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, Importancia ecológica y plantas de interés industrial. Roma, Italia: Editorial Multequina.

Picazo J. (2000). Procedimiento en microbiología clínica. España, Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiológicas.

Simpson G.(2005). Asteraceae (Compositae): Plant Systematica. España, Madrid: Editorial Elsevier.

Spicer J. (2009). Microbiología clínica y enfermedades infecciosas (2da edición). España: Editorial Elsevier páginas: 20-30, 41-50.

Suarez M. (2012). Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis Latifolia* (Asteraceae) de la provincia de Loja. Quito, Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja, Escuela de Bioquímica y Farmacia.

Velásquez J. (1998). Prueba Epsilon (E test). Colombia, Medellín: *Revista de medicina*, 12(1): 165-174.

Yepez A. (2007). *Baccharis prunifolia* Kunth. Boyacá, Colombia: Herbario nacional de Colombia, catálogo nº 6401.