



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS
DE *Bauhinia variegata* Linn FRENTE A BACTERIAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL.**

Trabajo de grado como requisito para optar al grado de Licenciadas en Bioanálisis

Autores:

Br. Garrido C. María A. CI 19.848.877

Br. Martínez C. Anyely Y. CI 19.881.022

Tutora: Prof^a. Judith Velasco C.

Mérida, Noviembre de 2019.

DEDICATORIA

A Nuestro Señor Jesucristo, por darnos la vida, la sabiduría y el sustento: sin su compañía y provisión no hubiese sido posible culminar cada una de las metas que nos hemos propuesto.

A nuestros padres: Garrido Ciro, Cadenas María y Martínez Johnny, quienes con su formación, dedicación y valores, hicieron de nosotras mujeres de bien, quienes estuvieron en las buenas y en las malas, a ustedes debemos lo que somos y en lo que nos hemos convertido, gracias a sus apoyos incondicional, nos ayudaron a cumplir esta etapa para finalmente terminar esta carrera. ¡Los Amamos!

A Contreras Luis: gracias por permitir tener dos hermosas hijas, María Antonieta y María Angélica, quienes son mi motor de vida, la razón de que cada día siga adelante. A ustedes, mi familia ¡Los Amo!

A Abreu Ronald: Mi compañero de vida, quien a pesar de los obstáculos presentados logramos juntos salir adelante, y quienes juntos pudimos los dos obtener un título universitario. ¡Te Quiero!

A nuestros hermanos: Garrido Ciro, Martínez Johnny y Martínez Greimar con quienes compartimos gran parte de nuestras vidas y que de una u otra manera formaron parte de esta meta, espero que este logro les sirva de ejemplo y todos puedan concluir su formación académica y profesional ¡Los Amo!

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso: por darnos la vida y la fortaleza para superar cada obstáculo que se nos presentaba y por estar allí siempre haciéndonos saber que bajo su mirada nunca estuvimos solas.

A la ilustre Universidad de Los Andes: por abrirnos sus puertas y en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Que pese a todas las dificultades por las que atraviesa actualmente, da lo mejor de sí para seguir formando profesionales de calidad.

A nuestra Tutora, la Prof^a. Judith Velasco: por su dedicación, cariño y gran paciencia hacia nosotras, nos transmitió sus conocimientos y nos permitió llevar a cabo esta investigación.

www.bdigital.ula.ve

A la Prof^a. Janne Rojas: quien con toda su buena voluntad y conocimientos nos permitió realizar parte de la investigación en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

A todos los que de manera directa o indirecta, formaron parte de la realización de esta investigación ¡Gracias!

Garrido C. María A. y Martínez C. Anyely Y.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	
Planteamiento del problema	3
Justificación del problema	7
Objetivos de la investigación	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	9
Alcances y limitaciones de la investigación	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	
Trabajos previos	10
Antecedentes históricos	12
Bases teóricas	13
Generalidades de la familia Fabaceae	13
Especie vegetal <i>Bauhinia variegata</i> Linn	13
Taxonomía de la especie <i>Bauhinia variegata</i> Linn	14

Uso terapéutico de la especie <i>Bauhinia variegata</i> Linn	15
Composición química de la especie <i>Bauhinia variegata</i> Linn.	16
Obtención de los extractos vegetales	117
Métodos de extracción más utilizados para la preparación	17
Maceración	18
Percolación	18
Decocción	19
Bacterias	20
Clasificación bacteriana	20
Bacterias Gram positivas	21
<i>Staphylococcus aureus</i>	22
<i>Enterococcus faecalis</i>	22
Bacterias Gram negativas	23
<i>Escherichia coli</i>	24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Resistencia bacteriana	25
Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	26
a) Método de difusión en agar con discos	27
b) Método de difusión en agar con pozos	27
c) Método para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM)	28
Definición operacional de términos	30
Operacionalización de las variables	30
Sistema de hipótesis	32
Hipótesis alternativa	32
Hipótesis nula	33

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

Tipo de la investigación	36
Diseño de Investigación	36
Población y Muestra	37
Unidad de Investigación	37
Selección del tamaño muestral	37
Sistemas de Variables	38
Variable independiente	38
Variable dependiente	38
Materiales y métodos	38
Instrumento de recolección de los datos	38
Recolección de la planta y preparación del material	38
Método de extracción	39
Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con disco	40
Preparación del agar Mueller Hinton	41
Preparación de los discos de papel de filtro	41
Preparación de los inóculos bacterianos	42
Siembra del medio y disposición de los discos	42
Lectura de la prueba	43
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	43

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados	46
Obtención del extracto de <i>Bauhinia variegata</i> Linn	46

Evaluación de la Actividad Antibacteriana	47
Discusión	48
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
Conclusiones	51
Recomendaciones	52
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	53
ANEXOS	58

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Taxonomía de la especie <i>Bauhinia variegata</i> Linn.	15
Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de <i>Bauhinia variegata</i> Linn.	32
Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente: Composición Química del extracto metanólico obtenido de las hojas de <i>Bauhinia variegata</i> Linn.	32
Tabla 4. Antibióticos utilizados como control positivo para los microorganismos en estudio.	43
Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico obtenido de las hojas de <i>Bauhinia variegata</i> L., contra bacterias de referencia internacional.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Aspecto general y detalle de la floración en Abril y detalle de los frutos en Junio de la especie <i>Bauhinia variegata</i> Linn.	15
Fig. 2. Bacterias grampositivas y gramnegativas.	21
Fig. 3. <i>Staphylococcus aureus</i> , cocos grampositivos dispuestos en racimo.	22
Fig. 4. <i>Enterococcus faecalis</i> , cocos grampositivos dispuestos en cadena.	23
Fig. 5. <i>Escherichia coli</i> , bacilos Gram negativos.	24
Fig. 6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> , bacilos Gram negativos.	24
Fig. 7. <i>Pseudomona aeruginosa</i> , bacilos Gram negativos.	25
Fig. 8. Comprobante de identificación de la muestra botánica por el investigador del herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes	57
Fig. 9. Destilación del solvente con rotavapor (foto tomada por el autor)	38
Fig. 10. Bacterias de referencia internacional (ATCC) preservadas en agar conservación.	39
Fig. 11. Discos impregnados con 20 µL del extracto metanólico de <i>Bauhinia variegata</i> Linn y discos con 20 µL del solvente metanol,	40

usados como control negativo.

Fig. 12. Disposición de los discos en el agar Mueller-Hinton. Extracto 41
metanólico de las hojas de *B. variegata* L. (disco marrón), Metanol
(disco blanco), Compuesto de referencia (antibiótico comercial).

Fig. 13. Preincubación de las placas 4°C e Incubación de las placas 42
inoculadas con las cepas bacterianas a 37°C.

Fig. 14. Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de 58
las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn contra
Staphylococcus aureus ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC
29212, por el método de difusión en agar con discos.

Fig.15. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas 58
de de *Bauhinia variegata* Linn (disco marrón), halo de inhibición del
antibiótico (control positivo), el control negativo (disco blanco) frente a
Escherichia coli ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853.

Fig. 16. Esterilización de los discos en campana con luz UV y discos 43
impregnados con extracto metanólico obtenido de las hojas de la
especie *Bauhinia variegata* Linn a distintas concentraciones para
determinar la CIM.

Fig. 17. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima del 43
extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia*
variegata Linn contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y
Enterococcus faecalis ATCC 29212, por el método de difusión en
agar con discos.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Bauhinia variegata* Linn FRENTE A BACTERIAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL.

Trabajo de Grado II

Autores:

Br. Garrido C. María A.

Br. Martínez C. Anyely Y.

Tutora: Prof^a. Judith Velasco C.

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Para contribuir con el conocimiento de *B. variegata* L. cultivada en los andes venezolanos, en el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L., recolectada en el Municipio Libertador del edo. Mérida – Venezuela. El extracto metanólico fue obtenido por el método de maceración y la actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en agar con discos frente a bacterias de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados muestran que el extracto metanólico fue activo sólo frente a las bacterias grampositivas, *S. aureus* y *E. faecalis*, con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 100 y 250 mg/mL, respectivamente. Este es el primer estudio realizado en Mérida – Venezuela sobre la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *Bauhinia variegata* L. Se sugiere realizar el estudio fitoquímico, el proceso de extracción con otros solventes y la actividad antibacteriana de otras partes de la planta, para contribuir de esta manera con el conocimiento de esta especie cultivada en los andes venezolanos.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, extractos, *Bauhinia variegata* Linn.

INTRODUCCIÓN

Según el programa que conduce la organización mundial de la salud (OMS), los primeros datos publicados del año 2018 sobre la vigilancia de la resistencia a los antibióticos, indican que los niveles de resistencia a algunas infecciones bacterianas graves son elevados tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos, representando un serio problema de salud en todo el mundo (Lindmeier, 2018).

Aunque la resistencia es un fenómeno natural, el uso irracional de antimicrobianos tanto en el ser humano, animales y agricultura están acelerando este proceso. Las infecciones por gérmenes resistentes pueden afectar a cualquier persona sin importar edad, religión o región donde se encuentre. A nivel hospitalario las infecciones asociadas a cepas multirresistentes dejan prácticamente sin alternativas el tratamiento de algunas patologías, lo que aumenta el riesgo de mortalidad (Serra 2017, Angles 2018).

Los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos con diferentes actividades biológicas, entre las que destaca la actividad antibacteriana. Debido al incremento en el número de aislados clínicos multirresistentes, surge la necesidad de continuar la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana y las plantas representan una fuente natural de nuevos metabolitos (Corzo, 2012). Entre los innumerables vegetales de interés medicinal se encuentran las plantas del género *Bauhinia*, las cuales crecen principalmente en áreas tropicales y subtropicales del planeta con amplio uso en la medicina folklórica (Barragán, Murillo y Méndez, 2010).

Bauhinia variegata Linn, conocida como pata de vaca o árbol de orquídeas, ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional para tratar una gran cantidad de afecciones. Los trabajos farmacológicos han mostrado que esta especie ejerce efectos anticancerígenos, antioxidantes, hipolipidémicos, antimicrobianos, antiinflamatorios, nefroprotectores, hepatoprotectores, antiulcerosos, inmunomoduladores, molusquicidas, cicatrizantes y antidiabéticos. Se le han descrito metabolitos secundarios que son adecuados para ser utilizados como medicamentos, como los que se mencionan a continuación: terpenoides, flavonoides y taninos, saponinas, azúcares reductores, esteroides y glucósidos cardíacos (Al-Snafi 2013, Singh y col. 2016).

Se conoce que la composición química y la actividad biológica de una especie vegetal puede variar dependiendo de las condiciones climáticas donde se desarrolla (Figueredo y col 2008, Sampaio y col. 2016, Yang y col 2018, Isah 2019), en tal sentido, para contribuir con el conocimiento de *B. variegata* L. cultivada en los andes venezolanos, el presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L., frente a bacterias de referencia internacional, por el método de difusión en agar con discos, especie localizada en la urbanización San Antonio, avenida Andrés Bello, municipio Libertador, del estado Mérida-Venezuela.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La resistencia actual de los gérmenes a los antimicrobianos constituye un grave problema actual de salud en todo el mundo. El uso indiscriminado e irracional de estos fármacos constituye la principal causa de la gravedad de la situación que hoy se presenta (Serra, 2017), e involucra cada día nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia. El uso excesivo y con frecuencia empírico de los antibacterianos para el tratamiento de diferentes situaciones clínicas provoca modificaciones de la ecología bacteriana y el surgimiento de microorganismos resistentes a estos compuestos (Romeu y col, 2012).

El aumento de la resistencia bacteriana frente a determinados antibióticos ha sido motivo de preocupación y análisis de muchos investigadores, casi desde el momento mismo del descubrimiento de éstos productos, ya sean de origen natural, sintéticos o semi-sintéticos (Pérez, Pérez y Delgado 2014).

Debido a su disponibilidad generalizada, a su costo generalmente bajo y a su relativa seguridad, los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que más se utilizan de forma incorrecta. La mejora de las decisiones sobre el uso de los antimicrobianos requiere en última instancia una orientación de las decisiones terapéuticas hechas por los pacientes y los prestadores de atención sanitaria (OMS, 2012).

El hombre a través del tiempo ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas, empleando las plantas a nivel alimenticio, Industrial y medicinal, convirtiéndose de esta manera, en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad (Corzo, 2012).

En los últimos años el estudio de las plantas medicinales ha llamado la atención de la ciencia, convirtiéndose así en un área amplia de investigación y desarrollo, debido a la gran acogida que tienen dentro de la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos, entre otras (Corzo, 2012).

La utilización de productos naturales con fines curativos es importante, se ha transmitido de generación en generación y frecuentemente se usan extractos de plantas, constituyéndose como una fuente de agentes antimicrobianos (Ramírez y Díaz, 2007), respaldando que dichos compuestos extraídos de plantas podrían inhibir el crecimiento bacteriano por un mecanismo diferente a los antibióticos convencionales (Eloff, 1998).

Entre los innumerables vegetales de interés medicinal se encuentran las plantas del género *Bauhinia*, las cuales crecen principalmente en áreas tropicales del planeta (aproximadamente 400 especies), las cuales son utilizadas en muchos casos en la etnofarmacología de África, Asia y América Central y del Sur. Como consecuencia de la gran cantidad de especies, la taxa relacionada con el género no ha sido ajena a confusiones, es así que algunos autores lo incluyen dentro de la familia Leguminosae, para otros hace parte de la familia Caesalpinioideae, en tanto que para la nomenclatura moderna pertenece a la familia Fabaceae. (Barragán, Murillo y Méndez, 2010).

El uso medicinal de las plantas del género *Bauhinia* por la población en diferentes partes del mundo ha encontrado apoyo en los estudios científicos que demuestran la eficacia de las mismas en diferentes modelos

experimentales. En este contexto, algunos efectos biológicos o farmacológicos, como antimicótico, antibacterial, analgésico, antiinflamatorio y sobre todo antidiabético, son reportados en la literatura, lo que confirma y justifica el uso de estas especies en la medicina popular. Aunque muchos compuestos, incluidos los alcaloides, terpenos, esteroides y flavonoides, se han aislado e identificado en estas especies, hay escasos pocos estudios que se relacionan con los efectos biológicos de tipo citotóxico, sobre todo de los compuestos de tipo alcaloidal (Martínez y col, 2011).

En 2010, Barragán y col., en su estudio Taxonomía y funcionalidad del género *Bauhinia*, recolectaron, identificaron y caracterizaron macro y micromorfológicamente las especies de *Bauhinia* existentes en la zona urbana de Ibagué (Colombia), cuantificaron fenoles, flavonoides y flavonoles totales en las especies encontradas y evaluaron la actividad antioxidante. El análisis morfológico de las cuatro especies de *Bauhinia* detectadas evidenció características típicas de la familia vegetal Fabaceae-Caesalpinaceae. El estudio micromorfológico mostró diferencias intraespecíficas entre los vegetales, manifestadas en el parénquima, floema, xilema y estomas. *B. variegata* y *B. picta* fueron las especies de mayor potencial antioxidante, esta funcionalidad parece estar correlacionada con los contenidos de fenoles y de flavonoides totales.

Bauhinia variegata Linn, conocida como pata de vaca o árbol de orquídeas, es un árbol caducifolio que pertenece a la familia Caesalpinaceae que crece en lugares soleados y cálidos. El fruto es una vaina de 20 a 30 cm de longitud que contiene varias semillas (Singh y col. 2016).

En Brasil, *B. variegata* L, las hojas se usan como tratamiento tradicional para la diabetes (Azevedo y col., 2006) al igual que en México en el municipio de Olinalá, Guerrero. En la India su corteza se emplea para la gota, diabetes,

disentería, diarrea, dolor, procesos inflamatorios y presenta actividad antitumoral. En China la decocción de la raíz se usa como antídoto para mordeduras de serpientes y se ha encontrado actividad antibacterial de los extractos metanólicos frente a *B. cereus*, *S. epidermidis*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris*, *S. Typhimurium* (Parekh y col., 2006).

Una decocción de las hojas de *B. variegata* L. es ampliamente utilizada en la medicina tradicional venezolana como antidiabética. En 2003, Ríos y col., en su estudio Efecto inhibitorio de *B. variegata* L. sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina, demostró un significativo efecto inhibitorio *in vitro* sobre la glucación no enzimática de la hemoglobina, donde los resultados sugieren un potencial antidiabético de *B. variegata* L. para la prevención de las complicaciones de la diabetes.

En 2011, Martínez y col. realizaron el estudio Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *B. variegata* L. (Fabaceae). El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana y citotóxica *in vivo* de los extractos alcaloidales de *B. variegata* L. mediante el método de cromatografía de columna para la extracción y el aislamiento de los alcaloides presentes en las hojas de *B. variegata*. Extractos y fracciones alcaloidales, se evaluaron para determinar el potencial citotóxico empleando "camarones de mar" (*Artemia salina*) y el potencial antibacterial frente a *Escherichia coli* por el método de difusión en agar con discos. Como resultado se obtuvieron 6 compuestos depurados, a los cuales se les determinó la presencia del núcleo protoberberínico según espectrofotometría ultravioleta. En relación con el bioensayo sobre *Artemia salina*, el extracto crudo mostró menor toxicidad (CL50 > 1 000 µg/mL), la fracción de los alcaloides totales y el compuesto CD1 mostró alta toxicidad (CL50 < 500 µg/mL); por otra parte los extractos y los compuestos no mostraron actividad antibacteriana.

Existen diversidad de ecosistemas y microclimas, lo cual hace que la vegetación sea muy variada, con la presencia de especies endémicas, entre las cuales se tienen algunas que poseen extractos con principios activos con potencial actividad biológica, de interés para la investigación y desarrollo de nuevos productos naturales (Hada y Sharma, 2017).

Por lo que dicha investigación se basó en determinar la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata*, generando la siguiente interrogante:

¿Cuál es la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L. recolectada en el municipio Libertador del edo. Mérida - Venezuela frente a bacterias de referencia internacional ?.

www.bdigital.ula.ve

Justificación del problema

Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella y podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (Serra 2017).

Las bacterias, por su gran capacidad de adaptación, pueden desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas. El consumo (uso y/o abuso) de los antibióticos influye en las resistencias, no sólo de las bacterias patógenas, sino también de las saprofitas y oportunistas (Dasa, 1998).

Debemos considerar la importancia que tienen en la práctica diaria los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antimicrobianos disponibles, y tenerlos en cuenta a la hora de instaurar un tratamiento antibacteriano, ya que es sabido que las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie (Angles, 2018).

El uso de plantas medicinales es la terapéutica más frecuente en la medicina tradicional y en la medicina alternativa a nivel mundial, conocer estas tradiciones ha sido el inicio de numerosas investigaciones de gran importancia; lo que ha motivado a realizar estudios de detección y validación de plantas con fines medicinales (Martínez y col, 2014), proporcionando una fuente de posibles sustancias activas contra agentes bacterianos.

La importancia de este estudio es determinar la actividad antibacteriana de origen natural, que pudiera representar una alternativa terapéutica para la industria farmacéutica y contribuir con el tratamiento de las infecciones ocasionadas por microorganismos multirresistentes.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L. recolectada en el municipio Libertador del edo. Mérida - Venezuela frente a bacterias de referencia internacional.

Objetivos específicos

- Identificar las partes aéreas de la especie *B. variegata* L.
- Obtener el extracto metanólico de las hojas de *B. variegata* L. por maceración.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L., por el método de difusión en agar con discos, frente a bacterias de referencia internacional.
- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L. contra los microorganismos que muestre actividad antibacteriana.

Alcances y Limitaciones de la investigación

Según Hernández, Fernández y Baptista (2010), el alcance de una investigación está relacionado con la profundidad con la que se abarcará el tema de estudio, durante el proceso de investigación. Además, Hurtado (2010), refirió que un evento de estudio se puede investigar desde varios grados de elaboración, tales como: exploratorio, descriptivo, analítico, comparativo, explicativo, predictivo, proyectivo, interactivo, confirmatorio, y evaluativo. En este sentido, ésta investigación permitió evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L. recolectada en la urbanización San Antonio, avenida Andrés Bello, municipio Libertador del edo. Mérida - Venezuela frente a bacterias de referencia internacional, la cual podría representar una alternativa importante para la industria Farmacéutica. Para el desarrollo este trabajo de investigación no se encontraron limitaciones.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Méndez, Brito y cols. (2016), publicaron un trabajo en la revista cubana de plantas medicinales, titulado Actividad modulador acerca de antibióticos por el extracto acuoso de las hojas de *Bauhinia unguolata* L. El objetivo fue confirmar el potencial modulador de las especies *B. unguolata* en asociación con otros fármacos probados contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esta investigación fue de tipo confirmatoria y un diseño de laboratorio, contemporáneo, transaccional, cuasi experimental y multivariable. Los investigadores utilizaron el extracto acuoso de hojas de la especie vegetal *B. unguolata* en asociación con antibióticos amikacina, gentamicina, imipinem y ciprofloxacina, con la esperanza que el extracto actuara con antagonismo o sinergismo, frente a los efectos de los antibióticos. Las hojas de *B. unguolata* Linn fueron recolectadas en el distrito de Arajara, Chapada do Araripe, estado de Ceará, Brasil. En este trabajo se realizó el ensayo de microdilución en caldo y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto acuoso de las hojas de *B. unguolata*, contra 3 bacterias patógenas, dicho extracto presentó relevante actividad sinérgica de los antibióticos utilizados (amikacina, gentamicina, ciprofloxacina y imipinem). Los autores concluyeron que el extracto en asociación con las drogas aumentó el efecto de estos, revelando una significativa actividad antibacteriana. Este estudio muestra correspondencia con la investigación finalizada, ya que los autores analizaron y confirmaron la actividad antibacteriana del extracto acuoso de

las hojas de *B. unguata* frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* en asociación con antibióticos.

Singh y col. (2016), publicaron un trabajo en la revista estadounidense de fitomedicina y terapéutica clínica, titulado Usos multidimensionales de plantas medicinales Kachnar (*B. variegata* Linn). El objetivo fue describir el estado actual de las investigaciones sobre el avance farmacológico (aspecto biológico) de *B. variegata* L. y su uso multidimensional en varias enfermedades. Esta investigación fue de tipo descriptiva y un diseño transversal descriptivo y multivariable. En este trabajo se describen los diferentes usos multidimensionales de la especie vegetal en diferentes enfermedades. En este trabajo quedó demostrado que los extractos metanólico, clorofórmico y acuoso de la especie vegetal *B. variegata* L., poseen actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, siendo el extracto metanólico más efectivo que el acuoso, así mismo, demostraron que de las diferentes partes de la planta, el extracto de las hojas mostró mejor actividad, además, los extractos revelaron actividad antifúngica contra dermatofitos. Por otra parte, la planta mostró actividad en el cáncer, diabetes, inflamación entre otras. Los autores concluyeron: considerando las propiedades biológicas y farmacológicas de *B. variegata* la planta puede ser defendida como una planta medicinal importante para la humanidad y que se requiere más exploración para establecer el o los metabolito(s) metabolitos activos responsables de su bioactividad. Este estudio tiene correspondencia con la investigación finalizada, ya que los autores describieron la bioactividad de la especie vegetal *B. variegata*, entre ella la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Antecedentes históricos

El descubrimiento de alcaloides de la amapola, ipecacuana, quinina, granada y de otras plantas, marcó el punto de inflexión a principios del siglo XIX, iniciando la investigación científica farmacéutica. Con la mejora de métodos químicos, otras sustancias activas fueron obtenidas desde plantas medicinales, en las cuales se descubrieron: taninos, saponinas, vitaminas y hormonas (Petrovska., 2012).

Diversas investigaciones han identificado el potencial biológico de diferentes compuestos como flavonoides, taninos, esteroides, naftoquinonas y sesquiterpenos presentes en los extractos naturales del género *Bauhinia*. Se ha reportado para la especie *B. variegata* la presencia de flavonoides con propiedades antidiabéticas y antivirales; sin embargo, el estudio del potencial antibacterial y citotóxico *in vivo* es incipiente, tanto para compuestos de flavonoides como de alcaloides. Experiencias particulares se han divulgado con el fin de dar a conocer la bioactividad de los extractos naturales de la especie de *B. variegata* L. Al respecto, varios investigadores demostraron que el extracto alcohólico de esta planta tiene actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* (ATCC 6635) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Typhi, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Vibrio Cholerae*. Se descubrió que la zona de inhibición más grande (18 mm) se exhibía contra *B. subtilis*. y con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,39 mg/mL. Se descubrió que el extracto era más eficaz contra bacterias gram positivas que gram negativas. Por otra parte, otros investigadores confirmaron que el extracto etanólicos de las hojas de esta planta (rico en alcaloides), no posee actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*. En tal sentido, los investigadores concluyeron que agentes activos antimicrobianos presentes en los extractos de la especie vegetal *Bauhinia* pueden tener gran potencial para el tratamiento de las infecciones

causadas por estos microorganismos (Pokhrel y col, 2002; Martínez, Ocampo, Galvis, Valencia, 2011).

Bases teóricas

Generalidades de la familia Fabaceae

Son una familia del orden de las *Fabales*. Reúne árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas. Es una familia de distribución cosmopolita con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies, lo que la convierte en la tercera familia con mayor riqueza de especies después de las compuestas (*Asteraceae*) y las orquídeas (*Orchidaceae*) (Stevens, 2001; Udd, Campbell, Kellogg, Stevens, Donoghue 2002).

La familia Fabaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en corteza, hojas y raíz. De esta familia se han caracterizado y reportado alcaloides, flavonoides y polifenoles. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas está asociada a su efecto antidiabético, antiinflamatorio y antimicrobiano. Sin embargo, aunque varios compuestos son conocidos, se sabe poco sobre la actividad farmacológica de la mayoría de las sustancias aisladas del género *Bauhinia*. (Martínez, y col, 2011).

Especie vegetal *Bauhinia variegata* Linn.

Bauhinia variegata, llamada vulgarmente falsa caoba, uña de vaca, árbol de las orquídeas, o casco de vaca, es un árbol de la familia de las Fabaceas, originario del sur y sureste de Asia, desde China meridional, Burma, India, Nepal, Pakistán y Sri Lanka. Se trata de un árbol de pequeño a mediano

tamaño que crece hasta los 10-12 m de altura, es de hoja caduca en la estación seca. Las hojas tienen de 10-20 cm de largo y ancho, redondeadas, y bilobuladas en la base y el ápice. Las flores son conspicuas, de color rosa brillante o blanco, de 8-12 cm de diámetro, con cinco pétalos. El fruto es una vaina de 15-30 cm de largo, conteniendo varias semillas (Pokhrel y col, 2002; Martínez, Ocampo, Galvis, Valencia, 2011).

B. variegata L. es un género pantropical y sub-pantropical, que reúne unas 300-350 especies en su amplia circunscripción, muy variables morfológicamente y en tipos de hábitat, distribuidas en América, Asia, África y Oceanía. En América se encuentra desde México hasta el norte de Argentina. *B. variegata* L. con sus dos variedades, la var. Típica y la var. *Candida* Voigt. Es la especie exótica ampliamente cultivada en la región noroeste de Argentina (Zapater y Lozano, 2013).

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Bauhinia variegata* Linn.

Reino	Plantae
Phylum	Spermatophyta
Subfilo	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Caesalpinioideae
Género	<i>Bauhinia</i>
Especie	<i>Bauhinia variegata</i>

Fuente: Zapater y Lozano, 2013.



Fig. 1. Aspecto general y detalle de la floración en Abril y detalle de los frutos en junio de la especie *Bauhinia variegata* L.

Fuente: http://www.ayto-murcia.es/medio-ambiente/parquesyjardines/material/Arbol_mes_2012/Bauhinia%20variegata_oct%202012.pdf

www.bdigital.ula.ve

Uso terapéutico de la especie *Bauhinia variegata* Linn.

Los productos terapéuticos son aquellos derivados de plantas o sus mezclas en forma de extractos. También, liofilizados, destilados, tinturas, cocimiento o cualquier preparación galénica que tienen utilidad terapéutica y una forma farmacéutica definida. Los productos que son mezclas de plantas y tengan incluido un principio químico no son considerados como fitoterapéuticos. (Albornos, 2001). En tal sentido, *B. variegata* L., conocida comúnmente como "casco de buey", "casco de vaca" o "mororó", es una de las plantas más comunes utilizada en la medicina tradicional como remedio para tratar distintas enfermedades (Martínez, y col., 2011). En cuanto a su corteza se describe como astringente, aliterativo, tónico y útil en escrófula, enfermedad en la piel y úlceras, por otra parte, la raíz se utiliza como refrescante, ayuda al estreñimiento, depurativo, antihelmíntico, antiinflamatorio y estético. La

información etnomédica también reporta su uso en el tratamiento de la hipertensión, disentería, agente diurético, diarrea, lepra, parásitos intestinales, heridas, úlceras, tumores, infecciones, tos y diabetes. (Pokhrel y col, 2002; Bhattarai, 1993; Manandhar, 1993; Manandhar, 1995).

Composición química de la especie *Bauhinia variegata* Linn.

B. variegata L., fue investigada en el año 2017, por Shahana y col., quienes reportaron la presencia de una amplia gama de componentes químicos como: β -sitosterol, kaempferol-3-glucósido, taninos, carbohidratos, amidas, azúcares reductores, vitamina C, proteína cruda, fibras, calcio, fósforo, quercetina, rutina, quercitrina, apigenina, apigenina-7-O-glucósido, heptatriacontan-12, 13-diol y dotetracontan-15-en-9-ol.

Recientemente Singh y col. 2019, en su revisión describen la composición química de diferentes partes de *B. variegata* L., las cuales se señalan a continuación:

Raíz: Flavanona. dihydrodibenzoxepina. flavanol glicósido-5. 7. 3'. 4' - tetrahydroxi-3-metoxi-7-O-alfa-L-rhamnopiranosil (1 - 3)-O-beta-galactopiranosido). (2S)-5,7-dimetoxi- 3'4'-metilenedioxiflavanona. dihydrodibenzoxepina. 5,6-dihidro- 1,7-dihidroxi- 3,4-dimetoxi-2-metildibenz [b,f]oxepina.

Tallo: 5, 7-Dihidroxi flavanona - 4'-O-a- L-rhamnopiranosil b-D-glucopiranosido, 5, 7 - dihidroxi y 5,7 dimetoxi flavanona-4-O-a-L-rhamnopiranosil-b-D-glucopiranosidos, hentriacontana, octacosanol, sitosterol. Stigmasterol, neringenina-5,7-dimetileter-4'-rhamnoglucosido, lupeol, 5,7,3',4'-tetrahydroxi-3-metoxi-7-O-alfa-L-rhamnopiranosil (1->3)-O-beta-galactopiranosido, 2,7-dimetoxi-3-metil-9,10-dihidrofenantreno -1,4-diona llamado bauhiniona.

Flores: Quercitrosido. Isoquercitrosido, rutosido, taxifolina rhamnosido, kaempferol-3-glucosido, miricetol glicosido, apigenin-7-O-glucosido, quercetin, rutin, quercetrin, apigenin, ascorbico, aspartico, glutamico, octadecanoico ácido, keto ácidos, aminoácidos, taninos, cianiding-3-glucosido, malvidin-3-glucosido, malvidin-3-diglucosido, peonidin-3-glucosido, peonidin-3-diglucosido, 3-galactosido y 3-rhamnoglucosideo de kaempferol.

Obtención de los extractos vegetales

Los extractos de las plantas completas o partes específicas (raíz, tallo, hojas, flores o frutos), son obtenidos a partir especímenes seleccionados, mediante técnicas especializadas de extracción y concentración química. Se utilizan diversos solventes de acuerdo a las características de la materia prima, a sus componentes, a sus posibles usos y si estos son secados por liofilización o por nebulización y valorados mediante técnicas cromatográficas. A este respecto, los métodos de extracción dependerán fundamentalmente de los objetivos de estudio de la planta (Palomino, 2001).

Métodos de extracción más utilizados para la preparación de extractos vegetales

Para lograr una concentración adecuada de los principios activos contenidos en las plantas y que su acción sea más efectiva es necesario realizar diversos procedimientos mediante los cuales sean extraídos aquellos con solventes adecuados que se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias beneficiosas. Los métodos de extracción permiten obtener los productos en formas farmacéuticas adecuadas para su administración oral o externa de acuerdo al lugar de acción que se recomiende.

- **Maceración**

Para lograr el proceso de maceración se coloca el material vegetal en forma de trozos o polvo, según sea la conveniencia, en un recipiente lleno del menstuo y se deja reposar por tres o más días, con agitación frecuente hasta completar la extracción del material vegetal. Al final de este período se cuela y el resto sólido se exprime hasta lograr quitar el líquido remanente. El líquido así obtenido se clarifica por decantación o filtración (Bruneton, 2001).

La maceración se realiza a temperatura ambiente y los líquidos que con más frecuencia se utilizan son el agua y el alcohol o combinación de ambos, aunque también pueden emplearse vinos tintos o blancos. La maceración en agua no debe alargarse por mucho tiempo pues puede presentar contaminación por hongos, lo cual no sucede en las soluciones de alcohol o hidroalcohólicas. El tiempo total de maceración está en dependencia del tipo de planta, parte de la misma o del principio activo a extraer. La proporción más usada es de 1:20 vegetal/líquido (Bruneton, 2001).

- **Percolación**

La percolación es el procedimiento más utilizado para la preparación de tinturas extractos fluidos. El percolador es un recipiente cónico con una abertura superior en la cual se puede colocar una tapa circular horadada que permite el paso del líquido y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él. Por la parte inferior posee un cierre regulable para permitir el paso del líquido a una velocidad conveniente (Bruneton, 2001).

El material vegetal se humedece previo a su colocación en el percolador con una cantidad apropiada del menstuo colocados en un recipiente bien cerrado y se deja en reposo por espacio aproximado de cuatro horas (Bruneton, 2001).

Pasado ese tiempo se empaqueta convenientemente en el percolador de manera que permita el paso uniforme del líquido y el total contacto de éste con el material vegetal. Se llena de líquido y se tapa el percolador. Se abre la salida inferior hasta lograr un goteo uniforme y se cierra. Se adiciona más menstuo hasta lograr cubrir todo el material y se deja en maceración con el percolador cerrado por 24 horas. Finalmente se deja gotear lentamente y se adiciona suficiente menstuo hasta un volumen proporcional a las 3/4 partes del volumen total requerido para el producto final. Se presiona la masa húmeda residual para extraer el máximo del líquido retenido y se completa con suficiente menstuo hasta obtener la proporción adecuada, se filtra o se clarifica por decantación (Bruneton, 2001).

- **Decocción**

La decocción se usa para principios activos que no sufran alteraciones con la temperatura. En este procedimiento se hierve la droga en agua por espacio de 15 a 60 minutos (según sea la planta o el principio activo a extraer), se enfría, se cuela y se añade suficiente agua fría a través de la droga hasta obtener el volumen deseado. Dependiendo de la consistencia de las partes a extraer, se darán tiempos de decocción más o menos largos; generalmente, las raíces, hojas, flores y pedúnculos foliados se hierven en agua durante unos 15 minutos, mientras que las ramas y otras partes más duras pueden precisar hasta una hora, tiempo durante el cual deberá ir reponiéndose el agua evaporada (Bruneton, 2001).

Una vez hecha la decocción hay que filtrar el líquido mediante un paño, exprimiendo bien el líquido obtenido (Bruneton, 2001).

Las dosis son similares a las de la infusión, es decir una parte de planta por cada diez de agua excepto con las plantas que tienen alto contenido en mucílagos que será de 1/20 para evitar que la solución tome mucha viscosidad. Las decocciones se preparan para ser utilizadas al momento y

no deben ser almacenadas por más de 24 horas. Popularmente se les conoce como cocimientos (Bruneton, 2001).

Bacterias

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se multiplican por reproducción asexual. La pared celular que rodea las bacterias es compleja y existe dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo en el interior de las células del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico (Murray, 2009).

El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente. También se encuentra bacterias en el ambiente como el aire que se respira, el agua que se bebe y los alimentos que se comen; aunque muchas de ellas son relativamente a virulentas, otras son capaces de provocar enfermedades potencialmente mortales. La enfermedad puede deberse a los efectos tóxicos de los productos bacterianos (toxinas) o bien a la invasión de regiones corporales que acostumbran a ser estériles (Murray, 2009).

Clasificación bacteriana

Para realizar una clasificación preliminar de las bacterias se utiliza su tamaño

(de 1 a 20µm o más), forma (esferas, bastoncillos, espirales) y disposición espacial (células aisladas, en cadenas y formando cúmulos); mientras que su clasificación definitiva se refiere a sus propiedades fenotípicas y genotípicas. En el proceso de identificación bacteriana se realizan distintas técnicas entre ellas la coloración de Gram, que va a originar dos grupos: las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas (figura 2) (Murray, 2009).

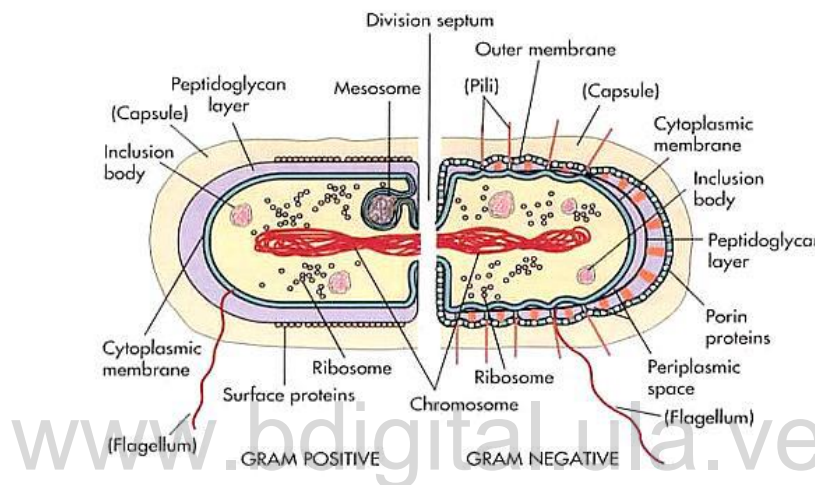


Fig. 2. Bacterias grampositiva y gramnegativa.
Tomada y modificada de Murray, 2009.

- **Bacterias Gram positivas**

Estas bacterias se caracterizan por presentar una pared celular gruesa y de estructuras más sencillas que las gramnegativas, constituyen un 60% de peptidoglicano y un porcentaje relativamente bajo de ácidos teicoicos y teicurónicos. El peptidoglicano representa un elemento clave para la supervivencia de las bacterias en el medio en el que prolifera la misma (Murray, 2009).

***Staphylococcus aureus*:** Cocos grampositivos, se presentan solos, en pares o en agrupaciones (Figura 3) inmóviles, anaerobios facultativos,

crecen en cloruro de sodio al 10 %, mesofílicos (temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 20 °C y 45 °C). Desde el punto de vista de la medicina, esta bacteria es la más importante de este género, que a diferencia de otras especies produce coagulasa, que hace que la fibrina se aglomere y forme un coágulo. La coagulasa es una proteína capaz de coagular al plasma citratado u oxalatado, con factores presentes en el suero. Con frecuencia participan en las enfermedades transmitidas por los alimentos; el hábitat es la piel de los humanos. Otro aspecto muy importante es que con gran facilidad puede crear resistencia a los antimicrobianos, lo que significa que la colonización en el hombre es un peligro (Murray, 2009).

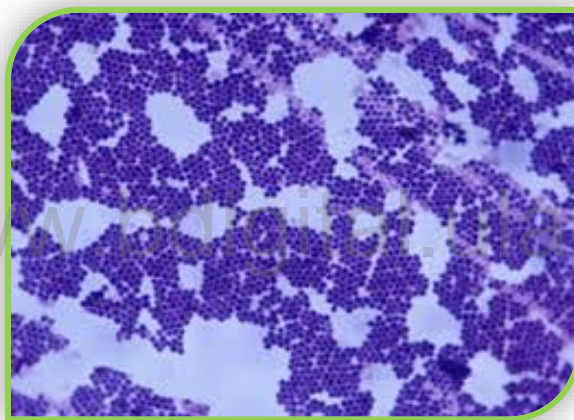


Fig. 3. *Staphylococcus aureus*, cocos grampositivos dispuestos en racimo.

Fuente:<http://cache2.allpostersimages.com/p/LRG/64/6466/ACNH100Z/posters/siegelman-arthur-staphylococcus-aureus-bacteria-gram-positive-cocci-lm-x500.jpg>

***Enterococcus faecalis*:** Cocos grampositivos, se disponen en pares y en cadenas cortas (Fig. 4). inmóviles, anaerobios facultativos, mesofílicos, componen el hábitat normal de los contenidos intestinales de seres humanos y revisten importancia porque esta especie muestra una resistencia inherente frente a la vancomicina. Presentan pared celular con antígeno específico de grupo (ácido teicoico con glicerol del grupo D), la virulencia está medida por

adhesinas de superficie y factores secretados (Murray, 2009).



Fig. 4. *Enterococcus faecalis*, cocos grampositivos dispuestos en cadena.

Fuente: <https://encryptedtbn3.gstatic.com/imagen>

- **Bacterias Gram negativas**

Estas bacterias presentan una pared celular química y estructuralmente más compleja que las grampositivas, compuestas por una capa fina de peptidoglicano que representa solo 5% a 10% del peso de la pared está unida a una membrana externa formada por una bicapa de fosfolípidos, proteína y polisacáridos. Cabe destacar que la membrana externa se separa del peptidoglicano por un espacio periplásmico o zona intermedia (Murray, 2009).

***Escherichia coli*:** Bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, fermentadores oxidasa negativa, el lipopolisacarido consiste en un polisacárido externo somático O, un antígeno común y el lípido A .Se encuentra en los contenidos intestinales de seres humanos, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño. Es importante señalar que la bacteria puede ser reconocida como un entero patógeno, se hace evidente que no todas las cepas son igualmente virulentas, y están implicadas en enfermedades de origen alimentario. Cuatro

síntomas clínicos pueden resultar de infecciones por cepas patógenas: infecciones de vías urinarias, sepsis, meningitis y enfermedades diarreicas (Figura 5) (Murray, 2009).

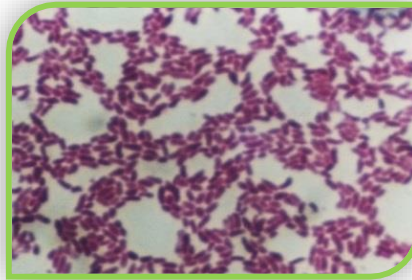


Fig. 5. *Escherichia coli*, bacilos Gram negativos.

Fuente: <http://1.bp.blogspot.com/rcreqcCOKwo/UnfWdpjNqWI/AAAAAAAAAiM/7fAA4zSZCh0/s1600/ESCHERICHIA%2BCOLI.jpg>

***Klebsiella pneumoniae*:** Esta especie posee una capsula prominente que confiere el aspecto mucoso a las colonias aisladas y la mayor virulencia de los microorganismos *in vivo*. Se presenta en bastoncillos medianos solos o pares (Figura 6), móviles, encapsulados, mesofilos, se encuentran en los contenidos intestinales de los seres humanos, los suelos y el agua. Este patógeno puede infectar diversos tejidos, especialmente a nivel del sistema respiratorio manifestándose por neumonías de alta gravedad (Murray, 2009)

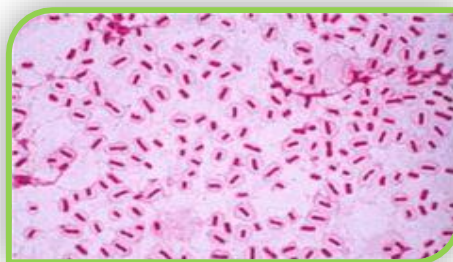


Fig. 6. *Klebsiella pneumoniae*, bacilos Gram negativos.

Fuente: <http://media-cache.ec0.pinimg.com/236x/f5/0e/4f/f50e4f3de854ce31fb0c3af56f0ec471.jpg>

Pseudomonas aeruginosa: Se caracteriza por presentar bacilos gramnegativos pequeños, agrupados en parejas (Figura 7), son aerobio obligado, oxidado por glucosa, presenta requerimientos nutricionales sencillos y capsulas mucoides de polisacáridos. Este patógeno es el más importante, se dan en infecciones nosocomiales y en pacientes inmunosuprimidos (Murray, 2009).



Fig. 7. *Pseudomonas aeruginosa*, bacilos Gram negativos.

Fuente: <https://encrypted-tbn1.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQfTxihtThZout5c-tT8kh5pm8KeL0Gdk-NmIWnA3ggjg15Lf9N>

Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, de modo que cada vez que se pone en uso de un nuevo agente antimicrobiano en la práctica clínica, el laboratorio de microbiología detecta cepas resistentes. Una cepa resistente se define como aquella que es capaz de multiplicarse en presencia de concentraciones mayores que las alcanzadas con dosis terapéuticas. En general todos los mecanismos de resistencia persisten o se modifican en la naturaleza, ya sea por transferencias de genes de resistencias o mutaciones, que pueden localizarse en cromosomas bacterianos o plásmidos. Por esto se puede suponer que los antimicrobianos tendrán actividad por un tiempo limitado, según la presión selectiva que esta ejerce sobre la población bacteriana (Pérez y col., 2014).

Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

Una prueba de susceptibilidad antimicrobiana es la determinación de cuál es la menor cantidad de un agente antimicrobiano que podrá inhibir el desarrollo de microorganismos *in vitro*. Diversas técnicas se han modificado con el objeto de lograr una metodología estándar para dar una información correcta. En un esfuerzo para brindar uniformidad y comprensión en el campo de las pruebas de sensibilidad, un estudio internacional bajo las directivas de la OMS, ha desarrollado, no un método estándar, sino indicaciones precisas que permitirá a los laboratorios evaluar su metodología y admitir un estándar como referencia, así como informar datos que tendrán bases comunes. El término sensible fue muy usado como sinónimo de susceptible. En general “susceptible” es aceptado por muchos investigadores para significar que un organismo podrá ser inhibido o muerto en las pruebas *in vitro* por una concentración de la droga fácilmente accesible en la sangre. Esta es la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se expresa en términos de μg o unidades del agente/mL. Como un factor de seguridad muchos investigadores recomiendan que un organismo debe considerarse como susceptible solo cuando la concentración adecuada de la droga en sangre excede la CIM *in vitro* de 2 a 4 veces. Los organismos que no son inhibidos *in vitro* son denominados resistentes. La determinación de la CIM permite tener un punto de referencia para evaluar la eficacia de un agente antimicrobiano para las pruebas *in vitro*, pero a menudo es impracticable informar los resultados de la susceptibilidad *in vitro* en términos de μg o Unid/mL. La mayoría de los laboratorios de análisis no tienen las facilidades o tiempo de realizar test cuantitativos en forma rutinaria. Por tanto es más razonable y más práctico emplear una técnica cualitativa estandarizada, basada en estudios cuantitativos, lo que indica aproximadamente la CIM y establece que un organismo es sensible o resistente a un agente antimicrobiano, cuando ese agente se administra en dosis usuales terapéuticas (CLSI, 2019).

El método de difusión en agar con discos satisface el requerimiento razonable y por supuesto se usa muchísimo en la mayoría de los laboratorios clínicos. Los tres métodos más utilizados para determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos son:

- a) Método de difusión en agar con discos.
- b) Método de difusión en agar con pozos.
- c) Método para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM)
 - c.1. Método de dilución en caldo: macrodilución o microdilución
 - c.2. Método de dilución en agar

a) Método de difusión en agar con discos

El principio del método de difusión, como el nombre lo dice, es dependiente de la inhibición del desarrollo en una placa de agar inoculada, por un agente antimicrobiano que difunde a partir del disco que lo contiene. La zona de inhibición es el resultado del grado de difusibilidad del agente en el medio y el grado de susceptibilidad del microorganismo. El grado de la zona de inhibición del desarrollo bacteriano puede relacionarse a la CIM determinada por los test de dilución en placas de agar o caldo. La zona de inhibición requiere una interpretación correcta y el resultado no debe informarse como indicando susceptibilidad al contenido del antibiótico en el disco.

El contenido de los discos usados en el método de difusión es generalmente especificado por organismos internacionales o por conclusión en congresos o jornadas científicas (CLSI, 2019).

b) Método de difusión en agar con pozos

El agar Mueller-Hinton se inocula masivamente en la superficie con la suspensión bacteriana y los controles (turbidez equivalente al patrón 0.5 McFarland), y se espera 15 minutos para permitir la absorción de este en

la superficie del medio. Con un sacabocados estéril se perfora el medio de cultivo buscando obtener un pozo de 6mm de diámetro, con bordes uniformes y hasta el fondo de la caja de petri. Se evalúa un extracto por caja, un pozo por concentración del mismo; en cada pozo se inoculan 20 μ L de la dilución del extracto a probar, usando un pozo para el DMSO como control negativo. Los medios se incuban a una temperatura aproximada de 37°C durante 18 - 24 horas. Finalmente se realiza la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana, por observación y medición del halo de inhibición alrededor de cada pozo (Murray, 2009)

c) Método para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM)

C.1. Método de dilución en caldo: microdilución o macrodilución

Microdilución en caldo: esta prueba se realiza en una placa de poli-estireno que contiene aproximadamente 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (sólo caldo). La mayoría de los sistemas tienen un volumen de 0.1 mL en cada celdilla. Para facilitar el uso de agentes antimicrobianos apropiados contra cepas específicas, un laboratorio por lo general tiene un tipo de placa para bacterias grampositivas y otro para bacterias gramnegativas. Para probar cepas aisladas de orina, algunos laboratorios tienen un tipo diferente de placa que contiene medicamentos apropiados para tratar infecciones de las vías urinarias bajas. Para probar bacterias fastidiosas se requieren paneles con medios especiales. El caldo Mueller-Hinton se recomienda como el medio preferido para pruebas de susceptibilidad de organismos comúnmente aislados, aeróbicos o facultativos de rápido crecimiento (Murray, 2009).

Macrodilución en Caldo: En este método, las dos diluciones finales del antibiótico son preparadas volumétricamente en el caldo. Para la prueba se requiere un volumen final mínimo de 1 mL de cada dilución. Dentro de los 15 minutos siguientes a la estandarización del inóculo, como se describió anteriormente, se añade 1 mL del inóculo ajustado a cada tubo que contiene el agente antimicrobiano. Cada tubo es agitado e incubado a 35°C por 16 a 20 horas en una incubadora de aire ambiental. La CIM es la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del organismo en los tubos detectada por observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico. Generalmente, la microdilución de CIM para bacilos gram negativos o la doble dilución son más bajas que la macrodilución comparable de CIM (Murray, 2009).

C2. Método de las diluciones en placas de agar

El principio del método es la inhibición del desarrollo sobre la superficie del agar por el antimicrobiano incorporado en el medio. Como el nombre del método así lo implica, las placas son generalmente preparadas en una serie de concentraciones decrecientes del agente quimioterápico. El fondo de la placa, puede dividirse en varios segmentos con un lápiz dermatográfico para identificar las áreas de inoculación. El organismo a ser probado se inocular en caldo tripteína soja y se deja incubar durante una noche. Diluir con caldo hasta una concentración de 10.000 y 100.000 organismos/mL. Algunos investigadores recomiendan un inóculo de 10.000.000 para asegurar un margen de seguridad. Una azada del cultivo diluido se toma con un asa estandarizada que contenga 0,001 mL o con un replicador mecánico y se deposita sobre un segmento de la placa. En contraste al método de difusión en agar, que mide cualitativamente la susceptibilidad de un organismo a varios antimicrobianos, el método de dilución en placa es un procedimiento cuantitativo que mide la específica CIM de un agente frente a varios

microorganismos. Esto solo es posible también con la técnica de agar en placa para dar una impresión de la homogeneidad del cultivo en prueba, porque un pequeño porcentaje de células más resistentes son realmente detectadas. El método de dilución en placas de agar requiere tener los antibióticos preparados en el congelador. (Lóvine, 1975).

Definición operacional de términos

Enfermedades infecciosas

Una enfermedad infecciosa es una enfermedad en la que los patógenos invaden a un huésped susceptible, como por ejemplo un ser humano o un animal. En el proceso el patógeno lleva a cabo al menos parte de su ciclo vital dentro del huésped y con frecuencia produce la enfermedad. (Tortora, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Extractos vegetales

Son sustancias químicas obtenidas desde una materia prima vegetal por métodos de extracción. Estas pueden tener diferentes usos, tales como: fortificantes, control de enfermedades y control de plaga. Se extraen de alguna porción de la planta (raíz, tallo, hojas, flores y frutos), que al someterse a procesos químicos permiten aislar compuestos característicos en forma concentrada y con la característica de conservar sus propiedades químicas. (Celis y col., 2008).

Operacionalización de las variables

La operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan a las variables de una

investigación. Esta definición operacional asigna significado a una variable, describiéndola en términos observables y comparables para poder identificarla. Para establecer el sistema de variables es necesaria la definición conceptual y la operacionalización de las mismas, es decir, de las dimensiones y los indicadores de cada una. Por lo tanto, las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos, con el fin de medirlos a través de un instrumento (Palella y Martins, 2010).

Las Tablas 2 y 3 representan la operacionalización de las variables presentes en la investigación desarrollada, en relación con la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* L, recolectadas en el municipio Libertador del estado Mérida, según los patrones de susceptibilidad en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, enero - septiembre de 2019.

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* Linn.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana	Dependiente discreta	Sustancia natural o sintetizada químicamente que inhibe el crecimiento bacteriano (Angles, 2018).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicadores
Método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer)	Sensible Resistente	Halo de inhibición expresado en mm
La concentración inhibitoria mínima (MIC): dilución del extracto metanólico a diferentes concentraciones	Sensible	La concentración más baja del extracto metanólico capaz de inhibir el desarrollo bacteriano

Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente: Composición química del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* Linn.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto metanólico obtenido de las hojas de <i>Bauhinia variegata</i> Linn.	Independiente continua	Es un contenido obtenido desde una materia prima vegetal por métodos de extracción; el cual contiene fracciones con bioactividad denominadas metabolitos secundarios (Oliveira y Coelho, 2008).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicadores
Los extractos metanólicos se obtuvieron por el método de maceración	Presencia de elementos químicos. Ausencia de elementos químicos.	Cantidad de elementos químicos presentes en el extracto.

Sistema de hipótesis

Hipótesis alternativa

(H₁) Probablemente el extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* Linn, recolectada en el municipio Libertador edo. Mérida posee actividad antibacteriana frente a bacterias de referencia internacional.

Hipótesis nula

(H₀) Probablemente el extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* Linn, recolectada en el municipio Libertador edo. Mérida no posee actividad antibacteriana frente a bacterias de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Particularmente, la investigación de tipo confirmatoria se lleva a cabo cuando ya existen investigaciones previas de carácter exploratorio, descriptivo y explicativo, y a la vez, se puede predecir el efecto a partir de la causa o inferir la causa a partir del efecto. En tal sentido, este proyecto corresponde con una investigación confirmatoria, ya que se confirmará la relación de causa-efecto entre la actividad antibacteriana de la especie localizada específicamente en la urbanización San Antonio, avenida Andrés Bello, municipio Libertador del edo. Mérida – Venezuela y el extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L., frente a bacterias de referencia internacional que pertenecen a la colección del Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Diseño de la investigación

Según Hurtado (2010), el diseño alude a las decisiones que se toman en cuanto al proceso de recolección de datos y de experimentación como en el caso de investigaciones confirmatorias y evaluativas. Estas permiten al investigador lograr la validez interna de la investigación, es decir, tener un

alto grado de confianza de que las conclusiones no son erradas. Es por ello que para fines de la presente investigación el diseño fue de campo, experimental, transversal – contemporáneo y monovariable. De campo porque las hojas de *B. variegata* L. Se recolectaron directamente en un sector del municipio Libertador del estado Mérida. También se considera experimental debido a que la especie vegetal fue sometida a determinados tratamientos, para observar los efectos o reacciones de la misma. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, con el fin de obtener el extracto metanólico. El diseño fue transversal y contemporáneo, ya que las muestras se procesaron en el presente y el dato se recolectó una sola vez, además el diseño fue monovariable ya que el evento de estudio estuvo conformado por una sola variable.

www.bdigitalula.ve

Población y Muestra

Unidad de investigación

Para Hernández y col (2010), la población es la totalidad del fenómeno a estudiar. En ella, la unidad de población posee una característica común, la cual se estudia y da origen a los datos de la investigación. En este sentido, la población en esta investigación estuvo representada por las hojas frescas y sanas obtenidas del árbol de *Bauhinia variegata* Linn, ubicado en la Urbanización San Antonio, Avenida Andrés Bello, Municipio Libertador, del Estado Mérida-Venezuela, y la colección de bacterias de referencia internacional (ATCC) disponibles en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del Tamaño Muestral

La muestra, según Hurtado (2010), es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible. En esta investigación, estuvo conformado por 101 g de hojas secas y trituradas de *B. variegata* L. La N muestral está representada por cinco bacterias: dos Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y tres Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) disponibles en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Profa. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

SISTEMA VARIABLE

Variable independiente:

La composición química del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* Linn.

Variable dependiente:

Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* Linn.

MATERIALES Y MÉTODOS

Instrumento de recolección de Datos

Recolección de la planta y preparación del material

El material vegetal (hojas) de *Bauhinia variegata* Linn, fue recolectado en el mes de junio de 2019, de un árbol ubicado en la urbanización San Antonio, avenida Andrés Bello, municipio Libertador, del estado Mérida – Venezuela. Una muestra fue depositada en el Herbario Dr. Ruíz Terán - MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, la cual fue identificada por el Dr. José Ramón Grande (Fig. 8).

El material recolectado (430 g) se sometió a desecación en una estufa a 38°C durante 7 días, luego se separaron las hojas, las cuales fueron molidas hasta su pulverización, obteniendo 101 g de material seco y molido.

Método de extracción

Para la obtención del extracto se empleó el método de maceración, se colocó el material seco y molido (101 g) en metanol (700 mL) durante 4 días. Cumplido el primer tiempo de maceración, se filtró esta suspensión y al remanente se le colocó nuevamente metanol hasta obtener un volumen final de 700 mL, durante 4 días. Luego se realizó una nueva filtración y se mezcló con la anterior, obteniendo un volumen final de 1300 mL de solución de extracto metanólico de *B. variegata* L. La solución se concentró en un rotavapor sobre un baño de María a una temperatura de 60°C, a 60 rpm durante 6 horas, se destiló el solvente, el extracto metanólico se colocó en un envase ámbar y se mantuvo en a 4 °C resguardado de la luz hasta su uso. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del

Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Prof^a. Janne Rojas (Fig. 9).



Fig. 9. Destilación del solvente con rotavapor. (Foto tomada por el autor).

Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar con discos

Se evaluó la actividad antibacteriana del extracto obtenido a partir de las hojas de la especie *B. variegata* L, por el método de difusión en agar con discos descrita por Velasco y col. 2005, utilizando cinco bacterias de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las cuales pertenecen a la colección de microorganismos del Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Prof^a. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Fig. 10).



Fig. 10. Bacterias de referencia internacional (ATCC) preservadas en agar conservación. (Foto tomada por el autor)

Preparación del agar Müller Hinton (Himedia®). Se preparó el agar Müller Hinton siguiendo las instrucciones del fabricante, se envasó en placas de Petri cuidando que las mismas quedaran con un espesor de 4 mm, una vez solidificadas a temperatura ambiente, se realizó el control de esterilidad y se mantuvieron preservadas en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

Preparación de los discos de papel de filtro. Para determinar la actividad antibacteriana, los discos de papel filtro de 7mm de diámetro y 2 mm de espesor, se impregnaron con 20 µL del extracto metanólico (670 mg/mL) obtenido de las hojas de la especie *B. variegata* L. Del mismo modo se impregnaron discos con el solvente (metanol), el cual se usó como control negativo. Los discos impregnados se dejaron secar a temperatura ambiente durante 18 horas y bajo luz ultravioleta (LUV) 1 hora previa al ensayo (Fig. 11).

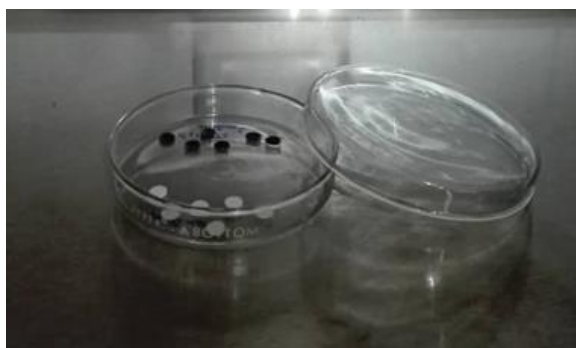


Fig. 11. Discos impregnados con 20 μ L del extracto metanólico de *Bauhinia variegata* L y discos con 20 μ L del solvente (metanol), usados como control negativo. (Foto tomada por el autor).

Preparación del inóculo bacteriano. Posterior a la reactivación de las bacterias de referencia internacional mantenidas en agar conservación a temperatura ambiente, se procedió a realizar una siembra de cada una de ellas en caldo Müller Hinton (2.5 mL), se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Para evaluar la actividad antibacteriana se preparó el inóculo de cada microorganismo en solución salina fisiológica (SSF) estéril a fin de obtener una turbidez equiparable al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Siembra del medio y disposición de los discos. Una vez preparado el inóculo bacteriano se procedió a inocular cada bacteria en la superficie del agar Müller Hinton con un hisopo estéril, para obtener un crecimiento homogéneo. Sobre la superficie del agar se colocaron los discos de papel de filtro previamente impregnados con el extracto. Adicionalmente, se colocó un disco estándar del antibiótico de referencia según el CLSI 2019 para cada microorganismo como control positivo (Tabla n° 5) y un disco impregnado con el solvente (control negativo)(Fig. 12). El medio de cultivo inoculado se sometió a una preincubación durante 18 horas a 4°C y luego se incubó a 37°C durante 24 horas (Fig. 13).

TABLA 4. Antibióticos utilizados como control positivo en el estudio de la actividad antibacteriana.

Microorganismos	Código ATCC	Antibiótico
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Linezolid
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Vancomicina
<i>Escherichia coli</i>	25922	Ampicilina
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357	Aztreonam
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Cefepime

Linezolid 30 µg (OXOID®), Vancomicina 30µg (Liofilchem s.r.l.), Ampicilina 10 µg (OXOID®), Aztreonam 30µg (BD BBL™), Cefepime 30 µg (BBL™) (Tomado de CLSI 2019).

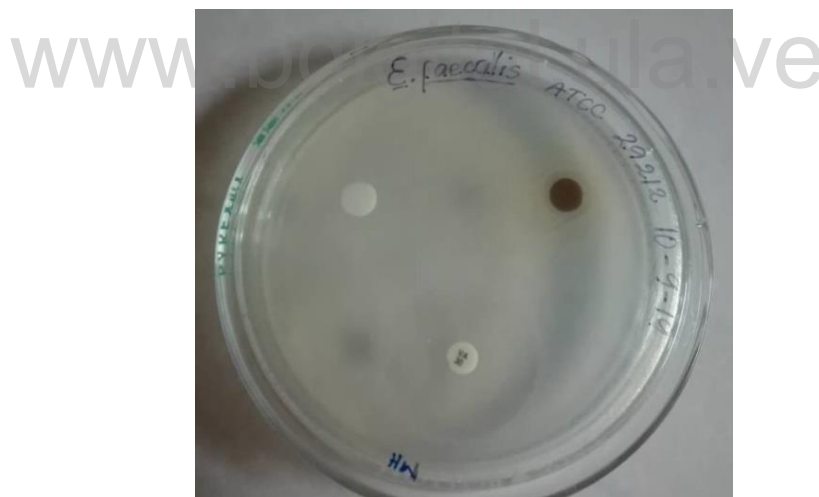


Fig. 12. Disposición de los discos en el agar Mueller-Hinton. Extracto metanólico de las hojas de *B. variegata* L. (disco marrón), Metanol (disco blanco), Compuesto de referencia (antibiótico comercial).



Fig. 13. Preincubación de las placas 4°C e Incubación de las placas inoculadas con las cepas bacterianas a 37°C.

Lectura de la prueba. Posterior al periodo de incubación se realizó la lectura de los halos de inhibición del desarrollo bacteriano alrededor del disco y se expresó en mm (Figura 14 y 15).

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Se determinó la CIM del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L. frente a los microorganismos que mostró actividad antibacteriana. En tal sentido, se realizaron diluciones del extracto con metanol en un rango de concentración de 50 – 500 mg/mL, a partir de cada dilución se impregnaron discos con 20 μ L y se realizó la metodología descrita en el paso anterior (Fig. 16 y 17).

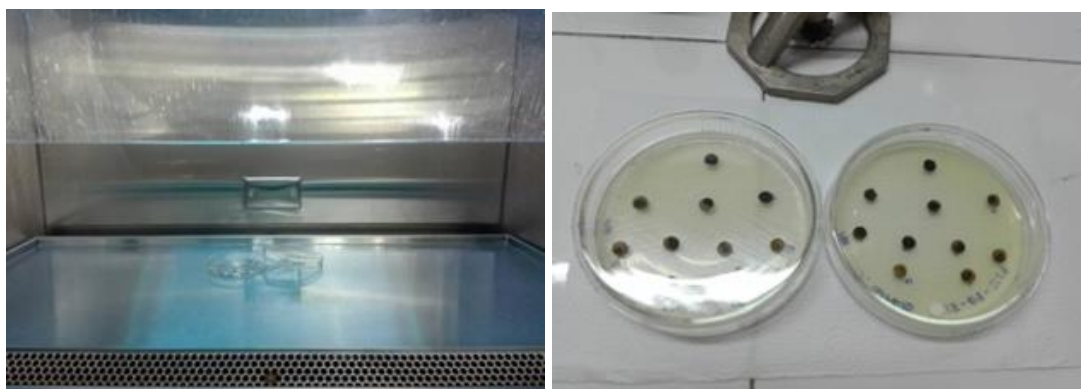


Fig. 16. Esterilización de los discos en campana con luz UV y discos impregnados con extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn a distintas concentraciones para determinar la CIM.

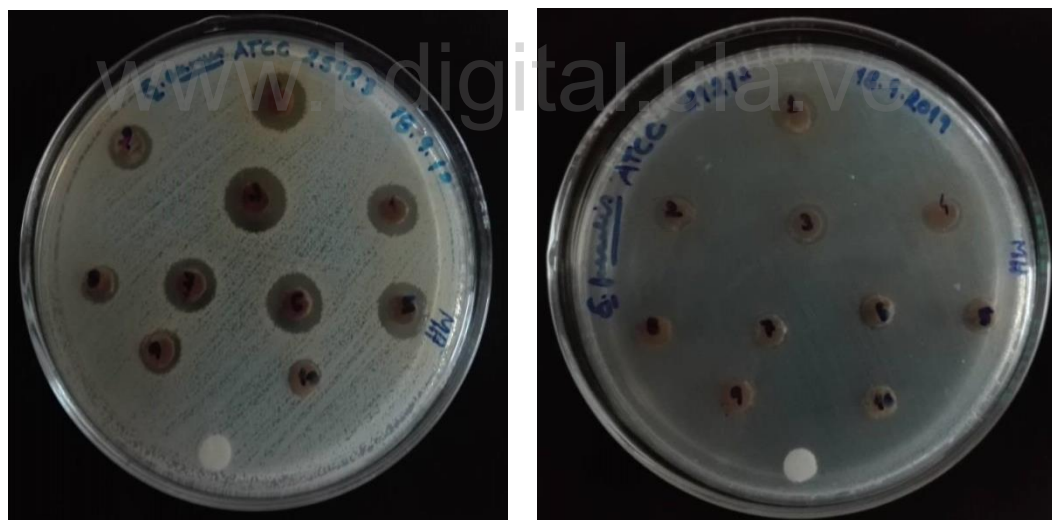


Fig. 17. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima del extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, por el método de difusión en agar con discos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L. frente a las bacterias de referencia internacional, muestran que inhibió solo el desarrollo de las bacterias Gram positivas, *S aureus* y *E. faecalis*, con un rango de halos de inhibición de 13,5 - 10 mm y valores de CIM de 100 y 250 mg/mL, respectivamente (Tabla 6).

TABLA 5. Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de *Bauhinia variegata* L.

Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)*					CIM (mg/mL)	
	EM	Compuestos de referencia					
		LNZ	VA	AM	ATM		CFP
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,5*	45*	-	-	-	-	100
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10*	-	30*	-	-	-	250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA	-	-	24*	-	-	NP
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	NA	-	-	-	53*	-	NP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NA	-	-	-	-	39*	NP

EM: Extracto metanólico de obtenido de las horas de *Bauhinia variegata* L (670 mg/mL); *mm de los halos de inhibición (discos de 7 mm de diámetro); NA: no activo; LNZ: Linezolid; VA: Vancomicina, AM: Ampicilina; ATM: Aztreonam; CFP: Cefepime; CIM: Concentración inhibitoria mínima, Rango de concentración: 50 – 500 mg/mL, NP: No probado.

Discusión

Debido al incremento de bacterias multirresistentes que limitan el tratamiento de las infecciones que producen, la búsqueda de alternativas terapéuticas ha motivado a la comunidad científica internacional, al respecto las plantas brindan una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana demostrada.

Diferentes partes de la especie vegetal de *B. variegata* L. son utilizadas en la medicina folklórica para el tratamiento de diferentes patologías, y se le atribuyen varias propiedades biológicas. Para contribuir con el conocimiento del estudio de la actividad antibacteriana de *B. variegata* L. localizada en los andes venezolanos, esta investigación muestra que el extracto metanólico obtenido de las hojas inhibió el desarrollo sólo de los microorganismos Gram positivos, *S. aureus* y *E. faecalis*. La ausencia de actividad frente a las bacterias Gram negativas se correlaciona con el estudio realizado por Martínez y col 2011, este grupo de investigadores evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *B. variegata* L. que recolectaron en el municipio Manizales, departamento Caldas, Colombia, y no observaron actividad del extracto crudo frente a *E. coli*.

Sin embargo, se observa discrepancias con los resultados obtenidos de esta especie recolectada en la India, así lo señala Dhale, 2011, quien reportó que el extracto alcohólico obtenido de las hojas de *B. variegata* L., fue activo frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, mostrando el mayor halo de inhibición frente a *S. aureus*. El estudio fitoquímico de dicho extracto reveló la presencia de: alcaloides, aceite, glucósido graso, carbohidratos, fenoles, taninos, lignanos y saponinas. La actividad

antibacteriana la atribuyeron a la presencia de varios metabolitos secundarios.

En el mismo año, Pahwa y col (2011) reportan los resultados obtenidos del estudio de la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos de diferentes partes de *B. variegata* L., recolectada en otra región de la India. En relación al estudio del extracto metanólico de las hojas mostró actividad frente a bacterias gramnegativas de la familia Enterobacteriaceae (*Shigella* spp., *Salmonella* Typhi, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* y *Proteus vulgaris*), *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas* spp. y bacterias grampositivas (*S. aureus* y *Bacillus* spp.).

Ambos estudios tienen en común la actividad de los extractos metanólicos de las hojas de *B. variegata* L., frente a bacterias grampositivas dentro de las que resalta la actividad frente a *S. aureus*, en este aspecto se correlacionan con los resultados obtenidos en la presente investigación. Sin embargo, señalan además actividad frente a bacterias gramnegativas de varios miembros de la familia Enterobacteriaceae, familia Vibrionaceae y no fermentadores como especies de *Pseudomonas*, esta diferencia podría atribuirse a que la composición química y la actividad biológica de una especie vegetal puede variar dependiendo de las condiciones climáticas, la composición de los suelos, el entorno donde se desarrolla, entre otros (Figueredo y col 2008, Sampaio y col. 2016, Yang y col 2018, Isah 2019). En tal sentido, surge la necesidad de realizar un estudio fitoquímico de las hojas de esta especie vegetal recolectada en Mérida - Venezuela ya que las condiciones medioambientales puede influir en la composición química y que podrían justificar la ausencia de actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas, observada en este estudio.

Al respecto, Mishra y col. 2013 coinciden en señalar la actividad antibacteriana observada de extractos con diferentes solventes obtenidos de las hojas de *B. variegata* L., recolectada en la India, frente a bacterias Gram negativas: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus* spp. y *Pseudomonas* spp. El estudio fitoquímico reveló la presencia de azúcares reductores, antraquinonas y saponinas en los extractos polares, y los terpenos y alcaloides fueron observados en los extractos no polares y en el extracto etanólico.

Se podría considerar que las condiciones climáticas y la composición del suelo bajo las cuales se desarrolló el árbol de *B. variegata* L. seleccionado en el presente estudio, favorecieron la presencia de metabolitos secundarios, los cuales fueron extraídos de las hojas con metanol y que en conjunto actuaron para inhibir la síntesis del peptidoglicano, componente principal de las bacterias grampositivas como *S. aureus* y *E. faecalis*. El mecanismo descrito que podría explicar la actividad antibacteriana solo frente a este grupo bacteriano.

Se han reportado diferencias en la actividad antibacteriana dependiendo de la parte de la planta de *B. variegata* L. estudiada, flores, hojas o corteza, como lo describen Pahwa y col (2011), quienes señalan que de las tres partes analizadas, los resultados revelaron que el extracto metanólico de la corteza de esta especie posee un espectro amplio de actividad antimicrobiana, ya que inhibió el desarrollo de bacterias (grampositivas y gramnegativas) y hongos. Al respecto, Pokhrel y col. 2002, indican que el extracto etanólico obtenido de la corteza fue más efectivo contra bacterias grampositivas que frente a las bacterias gramnegativas. Parekh y col 2006, también observaron que los extractos de la corteza fueron activos frente a ambos grupos de bacterias.

S. aureus y *E. faecalis* son importantes patógenos humanos, se encuentran asociados a infecciones intrahospitalarias con elevadas tasas de resistencia antimicrobiana. Según los resultados obtenidos en la presente investigación, el extracto metanólico de las hojas de *B. variegata* L. proporciona una alternativa terapéutica la cual puede ser explotada con propósitos comerciales. En este orden de ideas, es necesario realizar el estudio fitoquímico y evaluar los efectos tóxicos del mismo.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Las conclusiones refieren el conocimiento nuevo generado durante las fases operativas de la investigación. En tal sentido, representan la respuesta al enunciado holopráxico, y los sublogros relacionados con los objetivos específicos. También la verificación de la hipótesis en el caso de las investigaciones confirmatorias (Palella y Martins, 2010; Hurtado, 2010).

Considerando la interpretación de los resultados obtenidos en esta investigación, las autoras mencionan las siguientes conclusiones:

- El extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn recolectada en el municipio Libertador edo. Mérida inhibió el desarrollo de *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 100 y 250 mg/mL, respectivamente.
- Este es el primer reporte sobre el estudio de la actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn, en el Municipio Libertador del Estado

Mérida - Venezuela, contribuyendo con el conocimiento de esta especie.

Recomendaciones

Debido a la actividad antibacteriana descrita en otras especies del género *Bauhinia* y la composición química descrita en *Bauhinia variegata* Linn, se sugiere en primer lugar realizar el estudio fitoquímico de la especie recolectada en Mérida- Venezuela y segundo modificar las condiciones del ensayo en relación a: la parte botánica sometida al estudio, emplear otros solventes en el proceso de extracción de los principios activos y otras metodologías para determinar la actividad antibacteriana.

Evaluar el extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn, en investigaciones con bacterias multirresistentes de origen nosocomial.

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albornoz, A. (2001). **Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas**. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Al-Snafi, A. (2013). The Pharmacological Importance of Bauhinia variegata. A Review. **International Journal of Pharma Sciences and Research**. 4 (12).
- Angle, E. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? **Revista Medica Hered** 2018. 29 (3-4).
- Azevedo, C. (2006). Isolatín and intracelular localization of insuline- like proteins from leaves of Bauhinia variegata. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**.
- Barragan, H., Murillo, E., & Méndez, J. (2010). Taxonomía y funcionalidad del género Bauhinia. **Revista Tumbaga Ciencias-Quimica**.5: 119-134.
- Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia, 2ª edición**. España, Zaragoza, Acribia, 500-501.
- Bhattarai, N.K. 1993. Herbal remedies for diarrhea and dysentery in Central Nepal. **Fitoterapia**. 64 (3):243-250.
- Celis, A., Mendoza, C., Panchón, M., Cardona, J., Delgado, W., y Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis a la familia Piperaceae. **Bdigital**, 26 (1), 97-99.
- CLSI. (2019). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement**. M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Corzo Barragán, D.C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**. 43 (3). Recuperado de scielo.org.mx/scielo.php. ISSN 1870-0195.
- Dasa, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. **Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud**. 22 (3), 57-67.
- Dhale, D. (2011). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Bauhinia variegata* Linn. **Journal of Ecobiotechnology**. 3(9): 04-07. ISSN: 2077-0464.
- Eloffid. (1998). Whict extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. **Jornal of Ethnopharmacology**. 60(1):1-8.
- Figueredo, A., Barroso, J. Pedro, L. & Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour And Fragrance Journal**. 23: 213–226. DOI: 10.1002/ffj.1875.
- Hada, D. & Sharma, K, (2017). Effect of Different Physical Factors on Cassia Fistula Fruit Pulp Extract and their Herbal. **Research Article**. Volume 4 Issue 2 . DOI: 10.19080/GJPPS.2017.04.555632.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2010). **Metodología de la investigación**. México: Editorial Mc Graw Hill, 173-179.
- Hurtado, J. (2010). El “como”, o los procesos metodológicos de la investigación. **En el proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la investigación**. Bogotá- Caracas: Ediciones Quirón. Pág 97-123.
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, 52(1). DOI: 10.1186/s40659-019-0246-3.
- Lindmeier, C., (2018). **Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo**. Responsable de

Comunicación

OMS.

- Lóvine, E., Selva, A. (1975). ***El Laboratorio en la Clínica***, Editorial Panamericana S.A. – Buenos Aires, Madrid: 655 – 660.
- Manandhar, N. (1993). Herbal remedies of Surkhet District, Nepal. ***Fitoterapia***. 64 (3): 266-272.
- Manandhar, N.P. 1995. Medicinal folklore about the plants used as anthelmintic agents in Nepal. ***Fitoterapia***. 66 (2): 149-155.
- Martínez, M., Ocampo, D., Galvis, J., & Valencia, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). ***Revista Cubana de Plantas medicinales***. 16 (4). ISSN 1028-4796.
- Martínez, N., Gil, A., Celis, L., Rodríguez, L., Romero, F., Espino, C., & Requena, D. (2014). Efecto hipoglucemiante de un fitofármaco (DIAMET). ***Comunidad y Salud***. 12 (2): 18-22.
- Marchese, A., Arciola, C., Barbieri, R., Silva, A., Nabavi, S., Tsetegho S. & Nabavi, S. (2017). Update on monoterpenes as antimicrobial agents: A particular focus on *p*-cymene. ***Materials***, 10:947-962.
- Murray, P. (2009). ***Microbiología Médica. 5ta edición***. España. Editorial Elsevier Mosby, 961.
- Oliveira R. & Coelho, M. (2008). ***Constituintes químicos de Licania tomentosa Benth.*** Quim. Nova, Vol. 31, No. 1, 66-69.
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2012). ***Resistencia a los antimicrobianos (RAM)***. Nota descriptiva N° 194.
- Pallela, S., y Martins, F. (2010). ***Metodología de la investigación cuantitativa***. Caracas: Fedupel.
- Palomino, O. (2001). ***Métodos analíticos para la identificación de plantas medicinales***. España: Apuntes del curso de la asociación española de farmacéuticos de la industria.

- Pahwa, S., Mazumder, R. & Bhattacharya, S. (2011). Evaluation of in vitro antimicrobial activity of different parts of *Bauhinia variegata* Linn. ***International Journal of PharmTech Research***. Vol.3: 4(1971-1977).
- Parekh, J., Karathia, N. & Chanda, S. (2006). Evaluation of antibacterial activity and phytochemical analysis of *Bauhinia variegata* L. bark. ***African Journal of Biomedical Research***, Vol. 9: 53 – 56. ISSN 1119 – 5096.
- Pérez, A., Pérez, M. & Delgado, D. (2014). **Resistencia bacteriana *in vitro* frente a cefalosporinas en aislamientos nosocomiales durante el período 2003-2014.** *Hospital Universitario Clínico-Quirúrgico “Dr. Miguel Enríquez”*.
- Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants’ usage. ***Pharmacognosy reviews***, 6 (11), 1.
- Pokhrel, N., Adhikari, R. & Baral, M. (2002). In-vitro evaluation of the antimicrobial activity of *Bauhinia variegata*, locally known as koiralo. ***World Journal of Microbiology & Biotechnology*** 18: 69–71.
- Ramírez, L. & Díaz, H. (2007). Actividad antimicrobiana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). ***Scientra Et Technica***. 13(33): 397-400.
- Romeu, B., Salazar, P., Lugo, D., Rojas, N., & Eslava, C. (2012). Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* 69 procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. ***Revista Cubana de Medicina Tropical***, 64:132-141.
- Sampaio, B., Edrada, R. & Batista, F. (2016). Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. ***Scientific Reports***.6:29265. DOI: 10.1038/srep29265.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. ***BioMed Research International***, 1-8 .

- Shahana, S. & Nikalje, A. (2017). A Brief Review on Bauhinia variegata: Phytochemistry, Antidiabetic and Antioxidant potential. **American Journal of PharmTech Research**. 7 (1). ISSN: 2249-3387.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia de conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. **Revista Habanera de Ciencias Médicas**.16 (3). ISSN 1729-519X.
- Singh, K., Singh, D.&Singh, V. (2016). **Multidimensional Uses of Medicinal Plant Kachnar (Bauhinia variegata Linn.)**. Recuperado 31 octubre, 2016, de <http://www.imedpub.com/articles/multidimensional-uses-of-medicinal-plantkachnar-bauhinia-variegata-linn.pdf>.
- Tortora, G.; Funke, B.; y Case C.; (2007). **Introducción a la Microbiología**. 9a Edición, Editorial Médica Panamericana. 988.
- Yang L., Wen K., Ruan X, Zhao Y., Wei F. y Wang Q.(2018). Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**. 23(4). .DOI: 10.3390/molecules23040762.
- Zaragoza, R., Ramírez, P., & López-Pueyo, M. (2014). Infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**. 32:320-327.
- Zapater, M. & Lozano, E. (2013). Bauhinia variegata var. candida (Caesalpinioideae, Cercideae), nueva adventicia en las Yungas de Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. 48 (3-4): 585-589. ISSN 0373-580.

ANEXOS

www.bdigital.ula.ve



CERTIFICADO DE DETERMINACION

Quien suscribe Dr. José Grande, investigador del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, hace **CERTIFICA** que la especie involucrada en el Trabajo de Grado II, "Determinacion de la actividad antibacteriana del extracto metilico de *Bauhinia variegata*", realizado por las alumnas Anyely Martínez y María Garrido, bajo la tutoría de la Dra. Judith Velazco, corresponde efectivamente a *Bauhinia variegata* L. (LEGUMINOSAE).

Certificado que se realiza en Mérida a los 29 días del mes de julio de 2019, a petición de las mencionadas alumnas.

José Ramón Grande

Atentamente

Dr. José Grande

C.I.: V-16.435.553



Fig. 8. Comprobante de identificación de la muestra botánica por el investigador del herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

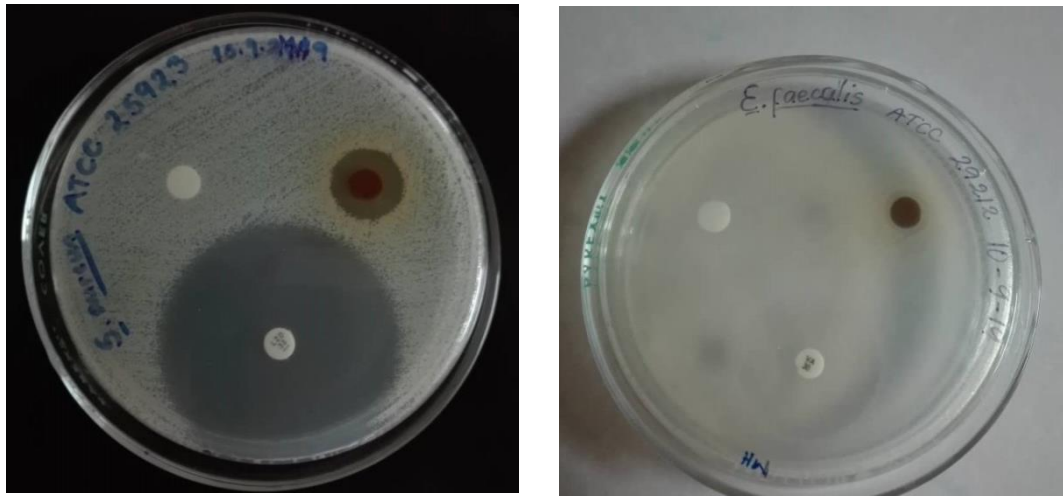


Fig. 14. Actividad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de las hojas de la especie *Bauhinia variegata* Linn contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, por el método de difusión en agar con discos.

www.bdigital.ula.ve



Fig. 15. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de de *Bauhinia variegata* Linn (disco marrón), halo de inhibición del antibiótico (control positivo), el control negativo (disco blanco) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.